



2  
2-9

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

Facultad de Estudios Superiores  
"CUAUTITLAN"

**"Detección de Anticuerpos de Aujeszky por el  
Método de Elisa y su Comparación con  
Seroneutralización e Inmunodifusión"**

**T E S I S**

Que para obtener el Título de:

**Médico Veterinario Zootecnista**

P r e s e n t a :

**Evelín Fabiola Aguilar Romero**

Asesor: M. V. Z. Marco Antonio Fajardo Román

Coasesores:

M. V. Z. Jorge Muñoz Muñoz

M. V. Z. Gabriela Loera y Chávez Sesma

---

Cuautitlán Izcalli, Edo de Méx.

1989.

**SELLA DE CRISTAL**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E .

|                         | Pagina |
|-------------------------|--------|
| 1. RESUMEN .....        | 1      |
| 2. INTRODUCCION .....   | 2      |
| 3. OBJETIVO .....       | 8      |
| 4. MAT. Y METODOS ..... | 9      |
| 5. RESULTADOS .....     | 22     |
| 6. DISCUSION .....      | 26     |
| 7. CONCLUSION .....     | 28     |
| 8. BIBLIOGRAFIA .....   | 29     |

R E S U M E N

Se evaluaron las técnicas de diagnóstico : ELISA, Seroneutralización e Inmunodifusión para la detección de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky, se utilizaron 170 sueros provenientes de Mérida Yucatán y se obtuvieron los siguientes resultados :

122 positivos por la prueba de ELISA

102 positivos por la prueba de Seroneutralización

56 positivos por la prueba de Inmunodifusión

El análisis estadístico utilizando el modelo de  $\chi^2$  comprobó que la técnica más precisa y confiable para la detección de anticuerpos de Aujeszky fue la prueba de ELISA, por una diferencia significativa entre la prueba de ELISA y Seroneutralización.

De lo anterior se concluye :

Que de los tres métodos analizados, estadísticamente, la prueba de ELISA resultó ser la más precisa y confiable para la detección de anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky.

El trabajo se realizó en el Centro Nacional de Salud Animal, ubicado en el Km. 37.5 de la carretera México-Pachuca, Santa Ana Tecamac (Departamento de Virología).

## 2.- INTRODUCCION

### ANTECEDENTES

En 1902 el Dr. Aujeszky reporta y describe un síndrome de bovinos en Hungría cuya designación es la enfermedad de Aujeszky ( 1 ). Investigaciones posteriores , lo llevaron a reproducir ésta enfermedad en diferentes especies como - - -  
ovinos, perros , gatos , además adaptó el agente causal en conejos estableciendo así la sintomatología diferencial con otra enfermedad, la rabia.

En 1931 Shope notificó la presencia de ésta enfermedad en América.

En 1945 Bachtold reportó la enfermedad en México, describiendo los signos -  
clásicos en bovinos procedentes de los Estados de Guerrero y Aguascalientes , a partir de esa fecha no se volvieron a reportar más datos hasta el año de 1971, en el estado de Guerrero ( 18 ).

En 1973 se presentó un brote en el estado de Jalisco en cerdos procedentes de Estados Unidos.

Durante los dos años siguientes la enfermedad prevaleció en la zona, provocando una mortalidad de 3,500 lechones ( 3 ).

En 1975 la enfermedad se extendió a los estados de Guanajuato y Michoacán -  
afectando al ganado porcino y canino con una alta mortalidad y la rápida diseminación de la enfermedad a otras áreas porcícolas del País ( 4 ).

(3)

En 1976 la incidencia disminuyó así como las pérdidas económicas debido a la inmunidad parcial que hubo en la población.

En 1980 se reportó un nuevo brote en los estados de México y Nuevo León y - posteriormente en 1986 en los estados de Yucatán y Tlaxcala, ya que se transportan animales de la zona del Bajío hacia dichos estados, por lo cual podemos suponer que la enfermedad de Aujeszky se encuentra ampliamente distribuida en la mayor parte de la República Mexicana.

#### SINONIMIAS .

La enfermedad de Aujeszky recibe varios nombres, tales como : Seudorrabia , Prurito furioso, Comenzón loca ó Parálisis bulbar infecciosa ( 4 ).

Los cerdos son significativamente más resistentes que otras especies susceptibles y algunos desarrollan infecciones latentes a partir de las cuales pueden liberar el virus mientras permanecen asintomáticos ( 1 ).

#### ETIOLOGIA

El agente causal es el Herpes virus, de cadena doble DNA, que se replica en una amplia variedad de cultivos celulares de mamíferos y produce corpúsculos de inclusión intranucleares eosinofílicos. El virus se hace aparente cuando se observa efecto citopático en el cultivo celular (9) (12) (18).

### HUESPEDES

Afecta de manera natural a cerdos, bovinos, perros, gatos y cabras; experimentalmente a conejos, cobayos, ratas, ratones y aves. Las especies refractarias al agente causal son el chimpancé y los insectos ( 10 ).

### TRANSMISION

El medio más importante, es el contacto directo entre los cerdos infectados y los susceptibles. La más alta concentración y persistencia larga del virus disponible para la infección, se encuentra en los exudados nasofaríngeos de los cerdos infectados ( 2 ) ( 12 ).

Algunos cerdos recuperados diseminan grandes cantidades de virus propagándolo así a otros animales.

La mortalidad es más alta en lechones que en cerdos al destete, la infección generalmente se ha adquirido 48 horas antes de que se presenten los primeros signos de tos y estornudos, seguidos de piroxia, anorexia y embotamiento; posteriormente hay afección neurológica que se manifiesta por temblores de incoordinación, espasmos tónico-clónicos, convulsiones, coma y muerte.

Las cerdas gestantes pueden presentar abortos con fetos macerados. Los principales problemas que representa esta enfermedad en la Porcicultura son : la baja fertilidad en las hembras y la reducción en el número de lechones ( 10 ).

DIAGNOSTICO

Dentro de los métodos de laboratorio más usuales para el diagnóstico de la enfermedad están : la Prueba Biológica, el Exámen Histopatológico, la Inmunofluorescencia, la Seroneutralización, la Inmunodifusión y la más recientemente descrita prueba de ELISA.

Prueba Biológica :

Es la inoculación de un macerado, proveniente del encéfalo de un animal sospechoso a animales susceptibles y observados diariamente para detectar signos de enfermedad ( 10 ) .

Exámen Histopatológico :

Lo más importante del exámen consiste en encontrar corpúsculos de inclusión eosinofílicos, en las neuronas, con una meningoencefalomielitis no supurativa difusa y focos necróticos en células de órganos parenquimatosos ( 13 ) ( 14 ) .

Técnica de Inmunofluorescencia directa :

Es la técnica histológica citoquímica, para la identificación y localización del antígeno con anticuerpos específicos combinados con un compuesto fluorescente, resultando un trazador sensible que se puede detectar por medio de fluorometría ( 13 ) .

Técnica de Seroneutralización :

Es el proceso por el cual un anticuerpo neutraliza la capacidad infectante del virus, para ello se trabaja con suero sospechoso que se enfrenta al virus de -



-Aujesky en un sistema de cultivo celular. Si el suero presenta anticuerpo, éstos neutralizan al virus y no permiten que entre a las células, evitando que se propagen por lo que las células no presentan cambios en su morfología ( 14 ).

#### La prueba de ELISA (ENZYMA-LINKEN SORBENT ASSAY)

Es una de las pruebas más recientemente descritas, para detectar anticuerpos. En 1971 Aurameas y Gilbert publicaron un artículo que señala la Inmunoabsorción de protefnas. En 1972 Enguall y Perlmann son considerados los pioneros - de ésta técnica, ya que realizaron trabajos para la detección de Inmuglobulinas del tipo IgG usando una enzima marcada, que al activarse les daba cierta coloración y que al leerse en el espectrofotómetro les indicaba la presencia de IgG (1) (7) (8).

En 1976 Saunders y Clinard reportan un micrométodo rápido para la detección de anticuerpos de diferentes enfermedades ( Toxoplasmosis , Lupus Eritematoso , Bruceosis , Colibacilosis , etc.) conocido como ELA test, en el mismo año - Snyder reporta un método semi-automático para detectar anticuerpos de Cólera Porcino. A partir de 1976 a la fecha la técnica de ELISA se ha venido perfeccionando cada vez más ( 6 ).

En la actualidad su empleo se ha generalizado por ser una técnica rápida y - que permite trabajar grandes volúmenes de suero en pocos días.

En la medicina humana se utiliza en diversas áreas tales como : Endocrinología, la cual se encarga de la detección de hormonas gonadotropina coriónica humana y de niveles de estrógenos ( 7 ) ; Inmunopatología, en la detección de niveles de IgG, en la detección del DNA de anticuerpos del Lupus Eritomatoso y en la -

cuantificación de la alfafetoproteínas ( 8 ); Hematología , a nivel experimental en el proceso de degradación del fibrinógeno; Microbiología, para la detección de anticuerpos de Salmonella tipo "O" , Escherichia Coli, Brucella y Treponema ( 9 ); Virología , para la detección de anticuerpos contra la Rubeola, Encefalitis Japonesa tipo "B" , Citomegalovirus, Herpes Simplex, Adenovirus, Virus de Hepatitis tipo "B" , Coxsackie, Virus de Sarampión ( 10 ); Parasitología, para la detección de antígeno de Trichinella Spiralis, Shistomoniasis, Nemátodos, Onchoserca, Malaria y Tripanosomiasis ( 11 ) ( 19 ) ( 26 ) .

En la medicina veterinaria, se utiliza para detección de anticuerpos de Aujeszky, Colera Porcino, Rinotraqueítis Viral Bovina, Infección de la Boisa de Fabricio, Enfermedad de Marek, Gastroenterítis Transmisible, Leucosis Bovina, - Tuberculosis y Toxoplasma ( 12 ) ( 15 ) ( 23 ) .

En México actualmente se utiliza para el diagnóstico de Aujeszky y Toxoplasmosis.

Desde el punto de vista epizootiológico, se sabe que los cerdos que presentan anticuerpos pueden ser considerados como reservorios y eliminadores de virus por lo que reviste mucha importancia.

Se han descrito muchas técnicas diagnósticas, como se señaló anteriormente, sin embargo, es necesario para el diagnóstico de rutina elegir aquella ó aquellas que reúnan ciertas características que las demás, tal es el caso de la sensibilidad y de fácil operacionabilidad; en algunos casos el costo es la limitante en algunos laboratorios.

3.- OBJETIVO

El presente trabajo tiene por objetivo .-

Comparar tres métodos; Inmunodifusión, Seroneutralización y ELISA Indirecta, para la detección de anticuerpos de Aujeszky; a partir de sueros sanguíneos - de cerdos de campo.

4.- MATERIAL Y METODO

4.1.- TECNICA DE ELISA

Materiales

a) Material Biológico :

- 170 sueros procedentes de Mérida Yucatán.
- Conjugado (anti-inmunoglobulinas IgG de cerdo marcadas con una peroxidasa'
- Suero bovino libre de IBR'
- Suero positivo a anticuerpos de Aujeszky'
- Suero negativo a anticuerpos de Aujeszky'
- Antígeno positivo de Aujeszky'
- Antígeno negativo de Aujeszky'

b) Reactivos :

- Solución de Tween -20 (polioxietileno Sorbital Monolaurato)'
- Solución Buffer de Fosfatos (PBS)
- Acido Sulfúrico ( $H_2SO_4$ )
- Acido Cítrico ( $COOHCH_2CCH$ ) ( $COOH$ )  $CH_2COOH-H_2O$
- Fosfato de Sodio ( $NaH_2PO_4$ )
- Difenílaminoperoxidasa (O.P.D.)
- Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ )

c) Material de Laboratorio :

- Microplacas de fondo plano (marca Petra)'

- Lector Micro ELISA (Auto-Reader MR-580)
- . Cristalería.
- Multipipeta de ocho canales (Titertek Autodrop)
- Puntas de pipetas

### MÉTODOS

#### a) Producción de Antígeno Positivo

- Inocular 1 ml de virus de Aujeszky con título de  $10^7$  DICC 50% / ml. al cultivo celular (línea PK<sub>15</sub>) con una confluencia del 100% en botella rox grande.
- Dejar en adsorción a 37°C durante 60 minutos
- Adicionar el medio de mantenimiento
- Incubar a 37°C por 48 hrs.
- Revisar diariamente el cultivo hasta que presente un 80% de efecto - citopático
- Colectar el fluido
- Someter el fluido a dos ciclos de congelación-descongelación para des- prender células
- Colectar el fluido
- Someter el fluido a dos ciclos de sonicación cada uno de 45 seg
- Centrifugar a 1000 gravedades por 20 minutos
- Someter a ultracentrifugación el sobrenadante a 57,000 gravedades - durante 90 minutos
- Eliminar el sobrenadante

- Incubar a 4°C por 18 horas
- Lavar cuatro veces con Tween -20
- Almacenar a -70°C hasta su uso

e) Realización

- Centrifugar los sueros problemas a 1,500 rpm por 10 minutos
- Inactivar a 56°C por 30 minutos
- Diluir 1:100 el suero sospechoso con P.B.S. al 10% de suero bovino
- Colocar el suero problema según corresponda en la microplaca preparada
- Incubar a 30°C durante 60 minutos en cámara húmeda
- Lavar cuatro veces con Tween -20
- Dejar secar la microplaca
- Adicionar el conjugado previamente diluido 1:100 en P.B.S. con suero bovino al 10%, incubar 20 minutos a 30°C en cámara húmeda
- Eliminar el exceso de conjugado
- Lavar cuatro veces con Tween -20
- Adicionar el sustrato previamente preparado (ver f)

f) Preparación del sustrato

- En un frasco ámbar se miden 25 ml de ácido cítrico
- Posteriormente 25 ml de fosfato de sodio se mide el pH a 5
- Se adiciona 20 mg de O.P.D.
- Adicionar 0.1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



|   | 1               | 2               | 3               | 4               | 5               | 6               | 7               | 8               | 9               | 10              | 11              | 12              |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| A | B               | B               | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            |
| B | B               | B               | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            |
| C | C.S.P.          | C.S.P.          | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            |
| D | C.S.P.          | C.S.P.          | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            |
| E | C.S.P.          | C.S.P.          | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            |
| F | C.S.P.          | C.S.P.          | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            |
| G | C.S.N.          | C.S.N.          | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            |
| H | C.S.N.          | C.S.N.          | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            | S.P.            |
|   | Ag <sup>+</sup> | Ag <sup>-</sup> | Ag <sup>+</sup> | Ag <sup>-</sup> | Ag <sup>+</sup> | Ag <sup>-</sup> | Ag <sup>+</sup> | Ag <sup>-</sup> | Ag <sup>+</sup> | Ag <sup>-</sup> | Ag <sup>+</sup> | Ag <sup>-</sup> |

B-Blancos

C.S.P.- Control de suero positivo

C.S.N.- Control de suero negativo

S.P.- Suero problema

Ag<sup>-</sup>.- Antígeno negativo

Ag<sup>+</sup>.- Antígeno positivo

g) Obtención de resultados

- Leer los blancos
- Leer control de suero positivo
- Leer cada uno de los sueros problema, con antígeno positivo y con - antígeno negativo
- Comparar los valores obtenidos de cada uno de los sueros problema con



el antígeno positivo de acuerdo al siguiente ejemplo :

| Valores | Valores con Antígeno + | Valores con Antígeno - | Valor final |
|---------|------------------------|------------------------|-------------|
| 1       | 1.128                  | 0.209                  | 0.919       |
| 2       | 0.202                  | 0.158                  | 0.044       |
| 3       | 0.097                  | 0.115                  | - 0.018     |
| 4       | 0.066                  | 0.100                  | - 0.034     |
| 5       | OVER                   | > 0.283                | W 1.500     |
| 6       | OVER                   | 0.171                  | W 1.500     |

h) Valorar los testigos

- Leer los blancos, deberán tener un valor final entre 0.20 hasta 0.000
- Leer los controles positivos, se suman y se obtiene el promedio de los cuatro, con los valores finales obtenidos
- Leer los controles negativos en su valor final

i) Obtención de los valores de los controles para su interpretación

- Tomar el valor del promedio de los controles positivos y multiplicarlos por 0.2
- Y el valor obtenido estará entre 0.200 a 0.299

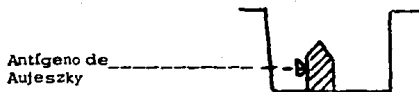
j) Interpretación

Ejemplo :

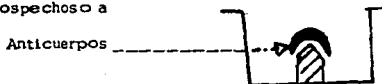
Si el valor obtenido en el promedio de los controles positivos fue de 0.261: los valores finales de los sueros problemas iguales o mayores a 0.261 serán considerados positivos y resultados menores negativos.

Principio de la prueba de ELISA INDIRECTA (Enzyme-linked Immunosorbent assay) para detección de Anticuerpos de Aujeszky.

1) Antígeno fijado a la microplaca

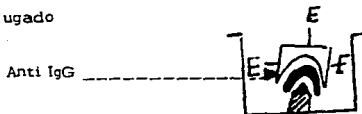


2) Agregar suero sospechoso a



3) Agregar el conjugado

(Anti-IgG)



4) Agregar sustrato

Presencia de  
Coloración



5) Adicionar ácido sulfúrico

(para detener la reacción)

4.2.- Material y Método para la técnica de Seroneutralización

a) Material

- Virus de Aujeszky cepa Tecamac, con título de  $10^{7.5}$  DICC 50%/ml
- Línea celular PK<sub>15</sub> (riñón porcino)

Medio de Cultivo

- Suero fetal bovino 10%
- Caldo triptosa (T.P.B.) 10%
- Bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3$ ) 1.5 %
- Micostatin 1%
- Antibiótico 2 %
- Medio mínimo de Eagle (MEM) c.b.p. 100%

Medio de dilución

- Caldo de triptosa 10%
- Bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3$ ) 1.5%
- Micostatin 1%
- Antibiótico 2%
- Medio mínimo de Eagle (MEM) c.b.p. 100%

Medio de mantenimiento

- Suero fetal bovino 5%
- Caldo de triptosa (T. P. B.) 5%
- Bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3$ ) 2%
- Micostatin 1%

- Antibiótico 2%
- Medio mínimo de Eagle (MEM) c.b.p. 100%

Materiales de laboratorio

- Microplacas de fondo plano (Marca Falcon)
- Multipipetas de ocho canales
- Cristalería

b) Método

b.1.- Preparación de antígeno para la técnica de Seroneutralización (2)

- Inocular una botella de roux, con 100% de **confluencia** de células PK<sub>15</sub>, con virus de Aujeszky (cepa Tecamac, previamente titulado con  $10^{7.5}$  DICC 50%/ml)
- Incubar a 37°C durante 24-48 horas y revisar la presencia de efecto citopático
- Realizar tres ciclos de congelación-descongelación cuando se observe del 80 al 90% de efecto citopático
- Centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 15 minutos
- Obtener el sobrenadante y depositar en viales de 1 ml
- Almacenar a -70°C hasta su uso
- Titular

b.2.- Inactivación de sueros

- Centrifugar a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos
- Someter a 56°C durante 30 minutos

**b.3.- Preparación de la microplaca**

- Colocar 0.05 ml del medio de dilución
- Colocar 0.05 ml del suero problema
- Realizar diluciones dobles de los sueros problema de 1:2 a 1:128
- Colocar 0.05 ml del virus de Aujeszky , con no menos de 200DICC 50%
- Incubar a 37°C durante 60 minutos en estufa de CO<sub>2</sub> al 5%
- Agregar 0.1 ml de suspensión de células PK<sub>15</sub>
- Incubar 48 horas a 37°C con CO<sub>2</sub>

**b.4.- Realizar la lectura**

- Se considerará como positivo a anticuerpos cuando no se observe efecto citopático
- Se considerará como negativo a anticuerpos cuando se observe efecto citopático

**b.5.- Interpretación**

- Considerar como positivos aquellos sueros con títulos a partir de 1:2

#### 4.3.- Material y Método para la técnica de Inmunodifusión

##### Material

##### a) Material Biológico

- Antisuero de Aujeszky con título mínimo de 1:8 (elaborado en conejo)
- Antígeno de Aujeszky con título mínimo de 1:16

##### b) Reactivos y medios

- Agar noble especial al 1%
- Solución de Buffer de Fosfatos (P.B.S.) c.b.p. 100%

##### c) Material de Laboratorio

- Sacabocados
- Laminillas
- Pipetas
- Cámara húmeda
- Lámpara

##### Método

##### Preparación de Antígeno

A continuación se describen tres métodos, los cuales pueden ser utilizados indistintamente :

- a).- A una botella Roux con 100% de confluencia de células PK<sub>15</sub> inocular con 1 ml de virus de Aujeszky
- b).- Dejar absorber durante 60 minutos a 37°C
- c).- Adicionar medio de mantenimiento e incubar a 37°C durante 48-72 horas
- d).- Revisar diariamente, cuando se observe de un 90 - 100% de efecto citopático cosechar.

- e).- Someter a tres ciclos de congelación-descongelación
- f).- Sonificar por dos minutos a 15 Kcl/seg
- g).- Centrifugar a 1,500 r.p.m. por 10 minutos
- h).- Obtener el sobrenadante
- i).- Adicionar polietilenglycol más cloruro de sodio
- j).- Agitar durante 90 minutos a 4°C
- k).- Centrifugar a 2,000 r.p.m. durante 30 minutos
- l).- Desechar el sobrenadante y colocar sedimento en una membrana de diálisis
- ll).- Diálizar durante 24 horas a 4°C cambiando la solución lavadora
- m).- Pasar a una caja de tinción con Polietilenglycol (P.G.E.) durante dos horas.

Para el segundo método se realizará de la "a" a la "g" de la misma forma :

- h).- Eliminar el sobrenadante
- i).- Adicionar 5 ml. de Tripsina versene en 1:250
- j).- Incubar a 37°C durante 60 minutos
- k).- Centrifugar a 5,700 r.p.m. por 30 minutos a 4°C
- l).- Eliminar el sobrenadante
- ll).- El sedimento suspenderlo en P.G.E. por dos horas
- m).- Almacenar a -70°C

En el último método se procede de la misma forma de a-g

- h).- Obtener el sobrenadante y adicionar sulfato de amonio  
48.5 gr por 100 ml de sobrenadante
- i).- Agitar durante toda la noche

- j).- Centrifugar a 2,000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C
- k).- Colocar en membrana de diálisis el sedimento
- l).- Dializar durante 24 horas a 4°C
- ll).- Colocar en una caja de tinción con P.G.E. el antígeno durante una hora
- m).- Almacenar a -70

Preparación de sueros

- a) Centrifugar a 1,500 r.p.m. por 10 minutos

Preparación de laminillas

- a) Colocar 4 ml de agar noble especial al 1% sobre la laminilla
- b) Dejar solidificar
- c) Realizar siete perforaciones con el sacabocado (una central y seis periféricas)
- d) Colocar los sueros problemas
- e) Colocar el suero testigo positivo (arriba y abajo del pozo central)
- f) Colocar el antígeno ( en el pozo central)
- h) Someter las laminillas en una cámara húmeda a temperatura ambiente -  
24 hrs - 48 horas.

Efectuar la lectura entre los sueros problemas y el antígeno y el suero.

- Identificar la línea de identidad
- Identificar la línea de no identidad
- Ausencia de reacción



Interpretación

Considerar como positivos aquellos sueros que muestren línea de identidad y negativos aquellos que muestren línea de no identidad o ausencia de reacción.

5. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de los 170 sueros analizados fueron :

Mediante la prueba de ELISA 122 positivos

Mediante la prueba de SERONEUTRALIZACION 102 positivos

Mediante la prueba de INMUNODIFUSION 56 positivos

METODO ESTADISTICO

Dada la marcada diferencia entre el número de sueros positivos obtenidos por la prueba de INMUNODIFUSION y las otras dos pruebas, sólo se realizó el análisis estadístico para las pruebas de ELISA y SERONEUTRALIZACION. En el presente trabajo se utilizó la prueba de  $Z^2$  en la cual se analizaron los datos en base al número de positivos (6,22).

Las hipótesis propuestas son :  $H_0 = P_1 = P_2$

$$H_A = P_1 \neq P_2$$

Donde  $P_1$  = número de sueros positivos por ELISA

y  $P_2$  = número de sueros positivos por SERONEUTRALIZACION.

Y para obtener el valor de  $Z_c$  se utilizó la siguiente fórmula :

$$Z_c = \frac{\hat{P}_1 - \hat{P}_2}{\sqrt{\frac{\hat{P}_1(1-\hat{P}_1)}{n_1} + \frac{\hat{P}_2(1-\hat{P}_2)}{n_2}}}$$

Donde  $\hat{P}_1 = 122/170$   
y  $\hat{P}_2 = 102/170$

En el caso de la  $Z^2$ , el valor obtenido con nivel de significancia de 0.05 fué de 1.96 y dado el valor calculado de  $Z_c$  fué de 2.306 por lo tanto se rechazó la  $H_0$  y se acepta la  $H_A$  que nos indica que si existe una diferencia significativa entre las pruebas de ELISA Y SERONEUTRALIZACION. Por lo tanto queda estadísticamente comprobado que la técnica más precisa y confiable para la detección de anticuerpos de Aujeszky es la prueba de ELISA.

RESULTADOS .

(24)

Cuadro 1

| ELISA     | SERONEUTRALIZACION . | INMUNODIFUSION . | ELISA     | SERONEUTRALIZACION . | INMUNODIFUSION . |
|-----------|----------------------|------------------|-----------|----------------------|------------------|
| 1) 0.015  | negativo             | negativo         | 44) 0.095 | negativo             | negativo         |
| 2) 0.015  | negativo             | negativo         | 45) 0.097 | negativo             | negativo         |
| 3) 0.015  | negativo             | negativo         | 46) 0.102 | negativo             | negativo         |
| 4) 0.015  | negativo             | negativo         | 47) 0.107 | negativo             | negativo         |
| 5) 0.015  | negativo             | negativo         | 48) 0.117 | negativo             | negativo         |
| 6) 0.017  | negativo             | negativo         | 49) 0.132 | negativo             | negativo         |
| 7) 0.022  | negativo             | negativo         | 50) 0.132 | negativo             | negativo         |
| 8) 0.023  | negativo             | negativo         | 51) 0.143 | negativo             | negativo         |
| 9) 0.023  | negativo             | negativo         | 52) 0.163 | negativo             | negativo         |
| 10) 0.023 | negativo             | negativo         | 53) 0.193 | negativo             | negativo         |
| 11) 0.025 | negativo             | negativo         | 54) 0.202 | negativo             | negativo         |
| 12) 0.029 | negativo             | negativo         | 55) 0.202 | negativo             | negativo         |
| 13) 0.034 | negativo             | negativo         | 56) 0.205 | negativo             | negativo         |
| 14) 0.034 | negativo             | negativo         | 57) 0.213 | negativo             | negativo         |
| 15) 0.034 | negativo             | negativo         | 58) 0.213 | negativo             | negativo         |
| 16) 0.035 | negativo             | negativo         | 59) 0.214 | negativo             | negativo         |
| 17) 0.038 | negativo             | negativo         | 60) 0.228 | negativo             | negativo         |
| 18) 0.043 | negativo             | negativo         | 61) 0.239 | negativo             | negativo         |
| 19) 0.045 | negativo             | negativo         | 62) 0.241 | negativo             | negativo         |
| 20) 0.045 | negativo             | negativo         | 63) 0.245 | negativo             | negativo         |
| 21) 0.045 | negativo             | negativo         | 64) 0.254 | negativo             | negativo         |
| 22) 0.047 | negativo             | negativo         | 65) 0.255 | negativo             | negativo         |
| 23) 0.049 | negativo             | negativo         | 66) 0.262 | negativo             | negativo         |
| 24) 0.052 | negativo             | negativo         | 67) 0.276 | negativo             | negativo         |
| 25) 0.053 | negativo             | negativo         | 68) 0.280 | 1:2                  | negativo         |
| 26) 0.053 | negativo             | negativo         | 69) 0.285 | 1:2                  | negativo         |
| 27) 0.053 | negativo             | negativo         | 70) 0.312 | 1:2                  | negativo         |
| 28) 0.057 | negativo             | negativo         | 71) 0.319 | 1:2                  | negativo         |
| 29) 0.058 | negativo             | negativo         | 72) 0.334 | 1:2                  | negativo         |
| 30) 0.058 | negativo             | negativo         | 73) 0.396 | 1:2                  | negativo         |
| 31) 0.060 | negativo             | negativo         | 74) 0.429 | 1:2                  | negativo         |
| 32) 0.060 | negativo             | negativo         | 75) 0.430 | 1:4                  | negativo         |
| 33) 0.060 | negativo             | negativo         | 76) 0.518 | 1:4                  | negativo         |
| 34) 0.062 | negativo             | negativo         | 77) 0.565 | 1:4                  | negativo         |
| 35) 0.067 | negativo             | negativo         | 78) 0.579 | 1:4                  | negativo         |
| 36) 0.073 | negativo             | negativo         | 79) 0.621 | 1:4                  | negativo         |
| 37) 0.078 | negativo             | negativo         | 80) 0.632 | 1:4                  | negativo         |
| 38) 0.083 | negativo             | negativo         | 81) 0.655 | 1:4                  | negativo         |
| 39) 0.087 | negativo             | negativo         | 82) 0.679 | 1:4                  | negativo         |
| 40) 0.087 | negativo             | negativo         | 83) 0.686 | 1:4                  | negativo         |
| 41) 0.089 | negativo             | negativo         | 84) 0.726 | 1:4                  | negativo         |
| 42) 0.091 | negativo             | negativo         | 85) 0.745 | 1:4                  | negativo         |
| 43) 0.093 | negativo             | negativo         | 86) 0.757 | 1:4                  | negativo         |

Cuadro 2

| ELISA | SERONEUTRALIZACION. | INMUNODIFUSION. | ELISA    | SERONEUTRALIZACION. | INMUNODIFUSION. |          |
|-------|---------------------|-----------------|----------|---------------------|-----------------|----------|
| 87)   | 0.786               | 1:4             | negativo | 130) 1.500          | 1:16            | positivo |
| 88)   | 0.807               | 1:8             | negativo | 131) 1.500          | 1:16            | positivo |
| 89)   | 0.843               | 1:8             | negativo | 132) 1.500          | 1:16            | positivo |
| 90)   | 0.900               | 1:8             | negativo | 133) 1.500          | 1:16            | positivo |
| 91)   | 0.902               | 1:8             | negativo | 134) 1.500          | 1:16            | positivo |
| 92)   | 0.955               | 1:8             | negativo | 135) 1.500          | 1:16            | positivo |
| 93)   | 0.956               | 1:8             | negativo | 136) 1.500          | 1:16            | positivo |
| 94)   | 0.958               | 1:8             | negativo | 137) 1.500          | 1:16            | positivo |
| 95)   | 1.048               | 1:8             | negativo | 138) 1.500          | 1:32            | positivo |
| 96)   | 1.061               | 1:8             | negativo | 139) 1.500          | 1:32            | positivo |
| 97)   | 1.109               | 1:8             | negativo | 140) 1.500          | 1:32            | positivo |
| 98)   | 1.124               | 1:8             | negativo | 141) 1.500          | 1:32            | positivo |
| 99)   | 1.232               | 1:8             | negativo | 142) 1.500          | 1:32            | positivo |
| 100)  | 1.262               | 1:8             | negativo | 143) 1.500          | 1:32            | positivo |
| 101)  | 1.283               | 1:8             | negativo | 144) 1.500          | 1:32            | positivo |
| 102)  | 1.319               | 1:8             | negativo | 145) 1.500          | 1:32            | positivo |
| 103)  | 1.359               | 1:8             | negativo | 146) 1.500          | 1:32            | positivo |
| 104)  | 1.114               | 1:8             | negativo | 148) 1.500          | 1:32            | positivo |
| 105)  | 1.411               | 1:8             | negativo | 149) 1.500          | 1:32            | positivo |
| 106)  | 1.500               | 1:8             | negativo | 150) 1.500          | 1:32            | positivo |
| 107)  | 1.500               | 1:8             | negativo | 151) 1.500          | 1:32            | positivo |
| 108)  | 1.500               | 1:8             | negativo | 152) 1.566          | 1:32            | positivo |
| 109)  | 1.500               | 1:8             | negativo | 153) 1.604          | 1:32            | positivo |
| 110)  | 1.500               | 1:8             | negativo | 154) 1.653          | 1:32            | positivo |
| 111)  | 1.500               | 1:8             | negativo | 155) 1.789          | 1:32            | positivo |
| 112)  | 1.500               | 1:8             | negativo | 156) 1.860          | 1:32            | positivo |
| 113)  | 1.500               | 1:8             | negativo | 157) 1.861          | 1:32            | positivo |
| 114)  | 1.500               | 1:8             | positivo | 158) 1.880          | 1:32            | positivo |
| 115)  | 1.500               | 1:8             | positivo | 159) 1.904          | 1:32            | positivo |
| 116)  | 1.500               | 1:16            | positivo | 160) 1.988          | 1:32            | positivo |
| 117)  | 1.500               | 1:16            | positivo | 161) 2.000          | 1:32            | positivo |
| 118)  | 1.500               | 1:16            | positivo | 162) 2.111          | 1:32            | positivo |
| 119)  | 1.500               | 1:16            | positivo | 163) 2.111          | 1:64            | positivo |
| 120)  | 1.500               | 1:16            | positivo | 164) 2.179          | 1:64            | positivo |
| 121)  | 1.500               | 1:16            | positivo | 165) 2.199          | 1:64            | positivo |
| 122)  | 1.500               | 1:16            | positivo | 166) 2.205          | 1:64            | positivo |
| 123)  | 1.500               | 1:16            | positivo | 167) 2.403          | 1:64            | positivo |
| 124)  | 1.500               | 1:16            | positivo | 168) 2.520          | 1:64            | positivo |
| 125)  | 1.500               | 1:16            | positivo | 169) 2.553          | 1:64            | positivo |
| 126)  | 1.500               | 1:16            | positivo | 170) 2.662          | 1:64            | positivo |
| 127)  | 1.500               | 1:16            | positivo |                     |                 |          |
| 128)  | 1.500               | 1:16            | positivo |                     |                 |          |
| 129)  | 1.500               | 1:16            | positivo |                     |                 |          |

6. DISCUSION

Como se señaló en el objetivo, el presente trabajo tuvo como fin evaluar - tres métodos empleados para la detección de anticuerpos para la enfermedad de Aujeszky; se eligieron las técnicas de ELISA, SERONEUTRALIZACION E INMUNODIFUSION, en el momento en que se decidió realizar éste trabajo; rutinariamente se utilizaban las dos últimas y se adquirió el equipo y material para la de ELISA; resultaba por lo tanto " de alguna manera " necesario justificar el uso y adquisición de dicho equipo. Por otro lado, el aumento en el volumen de trabajo requería verificar la utilización del mismo bajo - condiciones diferentes, en México.

Como se lee claramente en los cuadros de resultados, de 170 sueros, 122 - resultaron positivos utilizando la prueba de ELISA, mientras que, con la prueba de Seroneutralización sólo 102 y con la prueba de Inmunodifusión sólo 56. Lo cual quiere decir que evidentemente en el caso de ELISA, hay mayor sensibilidad.

Utilizando el análisis estadístico se comprueba que la prueba de ELISA - resultó más precisa y confiable. El resultado obtenido coincide con los publicados en otros trabajos (2)(21) (24)

De la misma manera, se coincide con diferentes autores que señalan que para la prueba de ELISA se requiere la elaboración de material y equipo de alto - costo, lo que da un límite para que los laboratorios de diagnóstico la rea

licen rutinariamente. Sin embargo, cuando se habla de laboratorios de diagnóstico de referencia es así lugar a duda una herramienta indispensable.

La Seroneutralización es una técnica ampliamente conocida y empleada. Es muy adecuada cuando se requiere obtener el título del suero pero, no es muy conveniente cuando se trabaja un número grande de sueros, porque resulta fatigante para el técnico que la evalúa, ya que requiere de evaluación visual a través del microscopio.

De otra manera la técnica de Inmunodifusión es una prueba fácil de realizar y evaluar sin embargo, su sensibilidad en comparación con las otras dos anteriores, resulta pobre aunque, su costo es sumamente bajo. Por lo tanto esta técnica puede emplearse como una alternativa más.

7. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se concluye que :

- a) De los tres métodos analizados, estadísticamente, la prueba de ELISA resultó ser la más precisa y confiable para la detección de anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky.
- b) La Seroneutralización, se recomienda cuando se desee conocer el título de anticuerpos.
- c) La prueba de Inmunodifusión resultó la menos sensible, ya que sólo - detecta sueros con título de más de 1:16
- d) Los laboratorios que cuentan con el equipo y material para la técnica de Elisa, utilizan preferentemente ésta por su precisión y confiabilidad, - además por su capacidad de trabajo.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Auramea S. and Gilbert, B. : 1971 Dosage enzym Immunologique de proteíns al' aide d' Immunosorbents etd' antigens marque aux enzymes, C.R. Acad. Sci. Ser. D. pag. 273-275
2. Bankes. S. Cartwright; 1903; Comparison and Evaluation of Four serologi cal tests, for detection of antibodies to Aujeszky' diseases virus; The Vet Record julio 9, 113; pag. 38-41
3. Briare J. Meloen R.H. and Bartoling S.J. 1979; An enzyme-Linked Immuno sorben assay (ELISA) for the detection of antibody against Aujeszky's - Disease virus in pig sera; Zbl. Vet. Med. B.26; pag. 76-81.
4. Blood D.C. and Herderson; 1978 JA. Medicina Veterinaria. Editorial Inte- ramérica. México 5a. edición. pag. 62 - 277.
5. Bulletin of the world Health Org. 1977, 55 (5); " Le titrage avec Immuno ad sorbent liea une enzyme (ELISA)".
6. Daniel W. Bioestadísticas; Ed. Limusa, Méx. pag. 485.
7. Enguall Eva and Peerlann; 1970, Enzyme-Linked Immunosorbent assay - (ELISA); Journal of Immunology . Vol. 109, Wum I July; pag. 119-135
8. Engual Eva and P. Perlmann; 1971, Enzyma Linked Immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of Immunochemistry, Vol. 8 pag. 871-878.



9. Genty G.A. and Rundall C.C. 1973, The Herpes viruses; Ed. A.S. Kaplan; New York Academic Press; pag. 42-97.
10. Gustafson D.P. 1981; Pseudorabies viral diseases; Section 2 cap. 14; pag. 209-223.
11. Harvey J. Olander, J.R. 1982 Pathologic Findings in Swiner affected with a virulent strain of Aujeszky's virus , Path. Vet. Vol. 3 No. 1 pag. 64-82.
12. Homoin W. Dunne; 1982 Enfermedades del cerdo, cap. 14 pag. 292-301
13. Hurst. E.W. 1933; Studies on pseudorabies I; Histology of the diseases W. with a note on the Symptomatology J. Exp. Med. 5; pag. 415-438.
14. Hugh Fundenberg, 1982; Inmunología Clínica. Edit.M.M. 3a. Edición; pag. 759-754.
15. Kimatahashi and Yuj Kano; 1985, Development of practical ELISA for detection of antibodies to Leukemia Viral Bovine; Comparison of the sensitivity with that of virusneutralization and agarose, test; National Institute of Animal health Ibaraki Japan 305; JPN. Vte.Sci. 47 (2) pag. 193 - 200.
16. Kodama Y. Dum.PhD. M. Ogata. DVMPHD; y Shimizu; 1980; Detection of antibody against Transmissible Antibody test; American Journal of Vet. Research. Vol. 41, W.O.1 pag. 133-135.
17. Komanina Hideo, Tomomitsi Mekabe; Masahiko Fukuda; 1986, Levels of passive antibodies against Aujeszky's Diseases virus in piglets Derived from infected sows; JPN.J.Vet.Sci. 48(3) pag. 633-635.
18. Martell D.M. Alcosre, B.R. Cerón M.F. Al; 1971, Aislamiento y caracterización del virus de la enfermedad de Aujeszky o Pseudorabia en -

México. Técnica Plenaria Num. 5 pag. 27-31.

19. Marguadt W.W.; R.B. Jhonson, W.F.; 1986, Odenmaid and indirect - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Mea Suring Antibodies In Chickens Infected the Infection Bursa Diseases Vol. 24 Nom. 2 pag. 375-385.
20. Merck Manual de Veterinaria M.S.D. Aavet, Edición 1981; pag.233-234.
21. Moenning U.P. Woldesenbet; 1982; Comparative evluation of ELISA and seroneutralization test for the diagnosis of Aujeszky's Diseases; G. - Mittmann S.A. Hall eds. Brucelus, Res. Vol. 43 Wo.2.
22. Parker R. Estadfsticas para biólogos; ed. Omega. 2a. ed. 1981 pag. 136
23. Swyder, M.L. Stemort, W.C. and J.I.; 1977; Transmissible Gastroente-ritis Virus a Protocol. A. phis USL. O.P. Box 70 Ames IOWA 50010.
24. Swyder M.L. and W.C. Stemorti; 1980; Rapid enzyme labeled antibody screening test for the detection of Pseudorrabies. From the Vet. Serv. Lab. Animal and Slont, Dep the Agriculture, Po Box 70 Ames IOWA.
25. Toma B, Serological diagnosis of Aujeszky's Disease Using Enzyme-Linked Immunosorbentn (ELISA) G. Whitmann S.A. Hall I.S.-B.W. 90 247-26, pag. 38-37.
26. Vuller A.D.E. Bidwell 1976; Enzyme Immuno Assay in diagnostic Medici- ne Theory and practice; J.Bull World Health Org. Vol.153 pag. 55-65.