



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores
"Cuautitlán"



179
201

"COMPARACION DE DOS TECNICAS INMUNOLOGICAS PARA
UN DIAGNOSTICO RAPIDO DE INMUNIDAD CONTRA LA
ENFERMEDAD DE AUJESZKY EN CERDOS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

ANGELICA BELTRAN BALVANERA

ASESORES: QBP MVZ GUILLERMO VALDIVIA ANDA
QBP JOSE NAZARIO FELIX SOTO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Comparación de dos técnicas inmunológicas para un diagnóstico
rápido de inmunidad contra la enfermedad de Aujeszky en cerdos."

que presenta la pasante: Beltrán Balvanera Angélica.

con número de cuenta: 8857832-5 para obtener el TITULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 15 de marzo de 1994

PRESIDENTE	M.V.Z. Sergio Cortés Huerta.	
VOCAL	M.V.Z. José Antonio Licea Vega.	
SECRETARIO	Q.B.P. Guillermo Valdivia Anda.	
PRIMER SUPLENTE	M.C. Tonatiuh Cruz Sánchez.	
SEGUNDO SUPLENTE	M.V.Z. Raúl Radillo Rodríguez.	

"PELEA LA BUENA BATALLA DE LA FE, ECNA MANO DE LA VIDA ETERNA, A LA CUAL ASIMISMO FUISTE LLAMADO, HABIENDO HECHO LA BUENA PROFESION DELANTE DE MUCHOS TESTIGOS"

10. DE TIMOTEO 6:12

Dedico este trabajo :

Al Creador de todas las cosas.

A mis padres.

A mis hermanas.

A Luis.

A mis amigos:

María Elena.

Mauricio.

Gina.

Gabriel.

Ricardo.

Omar.

Homero.

Juan Manuel.

Agradezco por la dirección de este trabajo a:

QBP MVZ Guillermo Valdivia Anda.

QBP José Nazario Félix Soto.

Por el apoyo en la realización de este trabajo:

QBP Luis Mejía Castillo.

MC Diana Mercedes Soriano Becerril.

MVZ María Elena Chávez Gómez.

Por su amor durante mi vida

A mis padres.

INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Objetivos.....	13
Material y Métodos.....	14
Resultados.....	22
Discusión.....	27
Conclusiones.....	30
Bibliografía.....	41

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, en la ciudad de México.

Se evaluaron tres técnicas inmunológicas para la detección de anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky en calostro de cerdas; éstas técnicas fueron: Inmunodifusión en agar, ELISA (inmunoensayo ligado a enzimas) con un equipo de diagnóstico comercial y seroneutralización.

Para realizar éstos análisis, se obtuvieron 100 muestras de calostro de cerdas de diversas razas y edades, provenientes de los estados de México, Hidalgo y Guanajuato; de las cuales sólo fué posible analizar 62.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Por la técnica de Inmunodifusión: 3 positivos.

Por la técnica de ELISA: 32 positivos.

Por la técnica de Seroneutralización: 59 positivos.

El análisis estadístico demostró que si existe diferencia significativa entre los títulos y la absorbancia de anticuerpos detectados por las técnicas de Seroneutralización y ELISA, respectivamente.

La técnica de Inmunodifusión en agar resultó ser muy poco sensible en éste tipo de muestras.

INTRODUCCION

El virus de la pseudorrabia es un patógeno importante de los suinos; ya que al aparecer en una granja ocasiona pérdidas importantes en el área económica, pues afecta a animales reproductores, tanto hembras como machos, animales en crecimiento y aún animales que se encuentran en el útero de las hembras. (4, 14).

El primer reporte de la enfermedad en literatura científica fue hecho por Aujeszky en 1902, quien describió la enfermedad al observarla en bovinos en Hungría. Posteriormente, al reproducir la enfermedad en otras especies como ovinos, caninos y felinos, y al adaptar al agente causal en conejos, dejó bien claro que existía una diferencia entre ésta enfermedad y una muy conocida hasta entonces: la rabia. (3, 11, 14).

En 1931, Shope notificó la presencia de ésta enfermedad en América. (3).

Bachtold, en 1945 detectó la enfermedad por primera vez en México, en bovinos en Aguascalientes y Guerrero. A partir de ésta fecha no se presentaron más datos sino hasta 1971, año en el que se reportó un brote en bovinos del estado de Guerrero. (3, 4, 11, 26).

En 1973 se presentó un brote en cerdos en una granja del estado de Jalisco, que frecuentemente importaba animales para pie de cria procedentes de los Estados Unidos de América. (3, 4).

Durante éste año y el siguiente, la enfermedad prevaleció en la zona, provocando una mortalidad de 3500 lechones. (3, 4, 11, 26).

En el año de 1975 la enfermedad se extendió a los estados de Guanajuato y Michoacán, afectando a porcinos principalmente e inclusive algunos caninos. (3, 4, 11).

En consecuencia, se estableció una clara zona enzootica en el Bajío del país (3, 4, 11).

Para el año de 1976, se registraron nuevos casos en el estado de México y para 1977 se detectaron en Aguascalientes, Sn. Luis Potosí y Oaxaca. (3, 4, 11).

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. El transporte de animales del Bajío hacia otras zonas del país, ha contribuido a diseminar la enfermedad ampliamente en casi toda la República Mexicana. (3, 4, 11).

Distribución.

La enfermedad se encuentra en toda Europa, ha sido reportada en Irán, en el Oriente Medio, en Norteamérica, Centroamérica y Sudamérica; está presente en la India, en el Sureste de Asia y Taiwan. La enfermedad no ha sido reportada en Australia ni en Canadá, pero sí en Nueva Zelanda y más recientemente en Japón en 1981. Hay reportes de su presencia aún en naciones del norte de Africa. (2, 14).

Sinónimos:

La enfermedad es conocida también como pseudorrabia, prurito loco, comezón loca, parálisis infecciosa bulbar, y en los Estados Unidos principalmente como Umad itchú. (3, 14, 26).

Etiología:

el agente causal de la Pseudorrabia es un virus perteneciente a la familia Herpesvirus, y a la subfamilia Alfa herpesviridae, especie Herpesvirus porcino. El virus posee un núcleo de 75 nm de diámetro y una doble cadena de DNA. La cápside rodea al núcleo y consiste en un icosaedro de 162 capsómeros, mide de 105 a 110 nm. Tiene una membrana externa o envoltura que rodea la cápside. El virión completo con su envoltura mide 180 nm. Es sensible a los disolventes de lípidos, fluorocarbonos, enzimas como la tripsina, pronasa, fosfolipasa C, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida. Afectan al núcleo del virus de la enfermedad de Aujeszky, el bromuro de etidio, el ácido nítrico y el 5 fluoruracil. Desnaturalizan al virus completo el dietilretol, la urea y los detergentes. (5, 14, 26).

Es sensible al calor, se inactiva por rayos gamma, rayos X, luz UV (ultravioleta) y lámparas germicidas. El agar, la heparina y otros polianiones sulfonados impiden la absorción del virus a las células. (5, 14, 26).

El ciclo de infección celular requiere de 15 a 19 horas; el ciclo de replicación viral es de 8 a 9 horas. (26).

Este virus es más termoestable y resistente a los cambios de pH que otros herpesvirus, y puede resistir fenol al 3% y sobrevivir durante siete semanas en carnes y lugares infectados. (5).

El virus se replica y produce cuerpos de inclusión eosinofílicos intranucleares en una amplia variedad de cultivos celulares aviáres y de mamíferos. (14).

Este virus crece fácilmente en células de riñón de cerdo y conejo, en células testiculares de cobayo y conejo y en

fibroblastos de embrión de pollo. Produce pústulas en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo y en policariocitos de cultivos de células infectadas. (4, 5, 14).

El efecto citopático del virus de la pseudorrabia es similar al que presentan otros herpesvirus. Se observan muchas células redondas y brillantes, también se aprecian células gigantes multinucleadas e inclusiones intranucleares, las cuales son características de una infección por herpesvirus. (4, 14).

Huéspedes:

Especies susceptibles naturalmente:

- Animales de granja: bovinos, ovinos, caprinos, suínos.
- Animales de compañía: perros, gatos.
- Otros: tejón, coati, coyote, venado, ratón, conejo, mapache, rata. (14).

Animales infectables experimentalmente:

- Animales de laboratorio: ratón, rata, cobayo, hurón, mono marmoset, mono rhesus.
- Animales silvestres: ciervo, marmota de América, puerco espín, chacal, rata almizclera, zarigüeya, murciélago.
- Aves: alfanque, gallina, ganso, pato, halcón, gorrión, paloma, pavo. (14).

Especies experimentalmente refractarias:

- Mamíferos: mono de Gibraltar, chimpancé.
- Poiquiloterms: rana, víbora, sapo, tortuga.
- Insectos: piojo, garrapata. (14).

Signos clínicos:

En los porcinos la enfermedad es enzoótica y contagiosa. en general. se observan dos presentaciones de la enfermedad. ésto es en base a la edad de los animales afectados. (5, 14, 26).

Los cerditos recién nacidos procedentes de cerdas infectadas con el virus de Aujeszky presentan signos aproximadamente a las 36 horas post-infección. Estos signos son: fiebre, disnea, hipersalivación, anorexia, vómito, diarrea o constipación, seguida de depresión, ataxia, nistagmos, movimientos de remadura, convulsiones intermitentes, coma y muerte. (14, 26).

En animales destetados y en engorda, la muerte puede ocurrir hasta el octavo día. Los signos que se presentan son muy similares a los de los cerdos lactantes, se eleva la temperatura hasta 41-42 grados C, la fiebre es acompañada por constipación, los cerdos dejan de comer y puede haber vómito. A las 96 horas puede observarse temblor de la cola y/o los flancos, y los animales permanecen quietos o recumbentes. Al 5o. día hay signos claros de neuropatía, generalmente hay incoordinación, convulsiones, coma y muerte. En éstos animales la mortalidad es de 80 % ; en los lactantes es de 100 %. (14, 19, 26).

En los animales adultos la mortalidad es de 0.2 %. Se observan signos respiratorios como tos y estornudos; fiebre, anorexia, constipación, salivación excesiva y depresión. En algunos cerdos puede haber espasmos musculares, ataxia, opistótonos, presión de la cabeza contra objetos inmóviles y ceguera; pérdida del control de la postura, coma y muerte. Algunos animales pueden recuperarse de 5-6 semanas después pero nunca alcanzan el peso promedio. (14, 26).

En cerdas adultas gestantes, el virus cruza la barrera placentaria e infecta a los nuevos individuos. Si la infección ocurre dentro de los primeros 30 días de la gestación, los embriones son reabsorbidos. Si la infección ocurre a los 40 días de la gestación, habrá muerte de los productos; y si ocurre a los 60-80 días de la gestación, se presentan abortos en las cerdas infectadas o los fetos sufrirán una maceración. Si la cerda se infecta en una fecha muy cercana al parto, los cerditos pueden nacer vivos, pero al mamar, se infectarán con el virus presente en la leche. (9, 14, 26).

La secuela más importante de las infecciones durante la gestación es la infertilidad, pues aproximadamente 20 % de las cerdas recuperadas serán infértiles durante el siguiente periodo estral. (9, 14, 26).

Los animales recuperados quedan como portadores asintomáticos y son fuente potencial de infección para otros cerdos y para las demás especies susceptibles. (11, 14 19, 26).

Signos clínicos en otras especies (Caninos y felinos).

Prurito intenso, lo que los obliga a lacerarse la piel gravemente, especialmente en el área perioral. Cuando se presenta la parálisis bulbar, se observa parálisis mandibular y faríngea, no hay fiebre, emiten gemidos y no hay ptialismo. Los animales infectados no atacan, se mantienen conscientes hasta morir, lo cual ocurre aproximadamente a las 24 a 36 horas después del inicio de la enfermedad. La mortalidad es del 100 %. (14, 26).

Patogénesis:

Los medios naturales de infección son mediante la introducción del virus en la cavidad nasal por inhalación o en la cavidad oral por ingestión. Incluso puede entrar por piel lesionada. Durante la enfermedad el virus se elimina en la leche materna y en las secreciones nasal, vaginal y prepucial. (14, 26).

El sitio primario de replicación viral es en el tracto respiratorio superior; de éste lugar el virus viaja vía neuronal a las células del Sistema Nervioso Central. (14, 26).

Esto es posible por la presencia de los nervios craneales, los pares involucrados son el I (olfatorio), V (trigémino), VII (facial), IX (glossofaríngeo) y X (vago). La infección se disemina hacia el cerebro a través de éstas cinco puertas de entrada. Por vía sanguínea, el virus de Aujeszky puede llegar a todos los tejidos del organismo. En condiciones naturales el virus se ha aislado a partir de los ganglios nerviosos del nervio trigémino de cerdos aparentemente sanos. Otros virus herpes de la familia *Alfaherpesviridae* también han demostrado tener un patrón de latencia neural. Al presentarse un período de estrés, o ante el tratamiento con corticosteroides, éstos virus latentes pueden migrar por vía nerviosa y producir nuevamente signos clínicos, lesiones y diseminación del virus. (14, 19, 26).

Diagnóstico:

Puede establecerse un diagnóstico, en base a la historia clínica, signos, mortalidad y morbilidad por etapas, etc. El inconveniente de éste tipo de diagnóstico, es que debe diferenciarse de otras enfermedades. (4, 11, 14, 26).

Por la importancia de ésta enfermedad, lo más común es hacer pruebas de laboratorio para tener un diagnóstico preciso. Las pruebas que pueden realizarse son las siguientes:

- Virus-neutralización: ésta es la prueba oficial aprobada en los Estados Unidos por el United States Department of Agriculture. Es el proceso por el cual un anticuerpo neutraliza la capacidad infectante del virus, para ello se requiere de suero sospechoso que se enfrenta al virus de Aujeszky en un sistema de cultivo celular. Si el suero posee anticuerpos, éstos neutralizan al virus, y no permiten que penetre a las células; con esto se evita la propagación y las células no presentan cambios en su morfología. (2, 14, 33).

- Inmunofluorescencia: la prueba directa puede ser usada para resolver reacciones indefinidas y para detectar el virus de Aujeszky en especies diferentes al cerdo. En 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 fluorescencia. (3, 14).

- ELISA: en ésta prueba se utilizan anticuerpos conjugados a una enzima, en estas condiciones el anticuerpo conserva su capacidad de unión específica al antígeno, mientras la enzima es capaz de catalizar la reacción, en la cual, el sustrato se transforma en un producto colorido. Otra característica importante del sistema es la unión del antígeno a una fase sólida-insoluble, en la cual, los componentes de la reacción inmunológica son retenidos. (14, 15, 34).

- Inmunodifusión en agar: la prueba involucra reacciones de precipitación entre un antígeno y su anticuerpo en un medio semisólido. Es la difusión en un gel de un antígeno y su anticuerpo homólogo con la siguiente aparición de una banda de precipitado en el sitio donde se alcanzan las concentraciones óptimas de ambos reactivos. La prueba puede analizar sueros citotóxicos, hemolisados o contaminados, los resultados se obtienen en 24 a 48 horas, es económica, el inconveniente es que es mucho menos sensible que ELISA y seroneutralización. (10, 14, 15, 21).
- Fijación de complemento: esta prueba requiere de 24 horas para realizarla y de personal capacitado para ello. Los reactivos utilizados requieren de un manejo cuidadoso. (14).
- Intradermorreacción: esta prueba está basada en una inmunidad mediada por células. No es tan sensible como seroneutralización o ELISA. Se ha usado como una prueba para monitoreo del hato. La prueba es barata y fácil de realizar; aunque los animales que resulten negativos es necesario realizarles más pruebas para determinar su inmunidad real. (6, 14).
- Pruebas biológicas: éstas se realizan en animales de laboratorio (ratones, conejos), a los cuales se les inocula una suspensión de tejido de animales sospechosos. Los animales inoculados se observan diariamente para comprobar signos de la enfermedad. (3, 14).
- Examen histopatológico: la parte más importante del examen consiste en encontrar corpúsculos de inclusión eosinofílicos en las neuronas, con una meningoencefalitis no supurativa difusa y focos necróticos en células de órganos parenquimatosos. (3, 14).

Existen otras pruebas de laboratorio que pueden realizarse, tales como microinmunoensayo en fase sólida directa, contraelectroforesis, análisis de restricción de endonucleasas. El inconveniente de estas pruebas, es que son caras, y requieren personal capacitado para realizarlas y no se ha comprobado que su sensibilidad pudiera desplazar a la sensibilidad más efectiva de las pruebas de ELISA y seroneutralización. (14, 20, 22).

Prevención:

La enfermedad puede prevenirse mediante la vacunación. Los antígenos aplicados para desarrollar resistencia contra la enfermedad han sido producidos por una gran variedad de técnicas. La vacunación no previene la infección, pero los animales expuestos al virus virulento, sobreviven a la infección pero permanecen con una infección latente. Las vacunas inactivadas son tan eficientes como las atenuadas, pero con menos riesgos. Una dificultad que se presenta en ambos casos es el bloqueo de la inmunización activa, por el paso de anticuerpos maternos a través del calostro. (4, 32).

Se ha reportado que el virus vacunal (inactivado) genera anticuerpos con títulos entre 1:10-1:40 (evaluados por seroneutralización) y que el virus silvestre induce y origina títulos mayores o iguales a 1:128. (4, 22).

Se conoce que la relación es baja entre los títulos de anticuerpos vacunales y la protección conferida contra la enfermedad de Aujeszky. (4).

A pesar de que en ocasiones los títulos de anticuerpos se manifiestan bajos, esto no implica que los animales estén carentes de protección. (4).

La erradicación de la enfermedad de Aujeszky no se logra únicamente vacunando, ya que además de los infectados, los cerdos vacunados pueden presentar una infección latente, de manera que la vacunación solamente reduce los casos clínicos y no previene la diseminación del virus. (4).

OBJETIVOS

- 1.- Emplear la prueba de inmunodifusión en agar para detectar anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky en calostro de cerdas.
- 2.- Determinar la presencia de anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky en el calostro de cerdas utilizando la prueba de ELISA en un kit comercial.
- 3.- Detectar la presencia de anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky en el calostro de cerdas, utilizando la técnica de seroneutralización.
- 4.- En base a los resultados obtenidos, comparar las pruebas antes mencionadas.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL:

- . Material biológico.
- Cien muestras de calostro de cerdas de diversas razas y edades.
- Virus de la enfermedad de Aujeszky cepa Tecamac con un título de 10 Exp 8 donado por el Centro Nacional de Salud Animal (Santa Ana, Tecamac, Estado de México).
- Células VERO, provenientes del laboratorio de virología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.
- Eritrocitos de ratones cepa BALB/C donados por el bioterio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Virus de Aujeszky cepa Shope.

. Reactivos.

Solución PBS (solución buferada de fosfatos) "A":

- Cloruro de sodio 80.0 g (J.T. Baker).
- Cloruro de potasio 2.0 g (J.T. Baker).
- Fosfato dibásico de sodio 11.5 g (Baker y Adamson).
- Agua destilada aforar a 1000 ml.

Solución PBS (solución buferada de fosfatos) "B":

- Cloruro de calcio 1.0 g (J.T. Baker).
- Cloruro de magnesio 1.0 g (J.T. Baker).
- Agua destilada 1000 ml.

- Renina comercial (Cuamex).
- Agarosa (Sigma Chemical Company).
- Medio de crecimiento adicionado con suero fetal bovino al 5 % (Gibco).

- Medio de mantenimiento M-100 base Earle. (Gibco).
- Bicarbonato de sodio al 4.4 %. (J.T. Baker).
- Solución de penicilina 100,000 U.I./ml y estreptomina 100,000 microgramos/ml. (Lab Lakeside).
- Solución de tripsina al 5 % (Tripsina-verseno 1:50). (Merck de México).
- Mezcla de alcohol-acetona (50:50). (Merck de México).
- Hielo seco.

Solución de Alsever:

- Glucosa 20.50 g (J.T. Baker).
- Citrato de sodio dihidratado 8.0 g (J.T. Baker).
- Acido cítrico monohidratado 0.55 g (J.T. Baker).
- Cloruro de sodio 4.20 g (J.T. Baker).
- Agua destilada llevar hasta un litro.

. Material y equipo de laboratorio:

Material de cristalería de laboratorio de uso general.

- Botellas Roux.
- Portaobjetos.
- Puntas para micropipetas.
- Microplacas.
- Kit comercial para la realización de la prueba de ELISA, para el diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky en cerdos. (Tolvid Diagnostic)
- Papel whatmann no. 1 o 2.
- Cien filtros de plástico Millipore de 2.5 cm. de diámetro.
- Cien membranas para filtro Millipore de 2.5 cm. de diámetro. type HA, de 0.45 micrómetros de poro.
- Campana de extracción.
- Microscopio invertido.

-Centrífuga.

-Lector de la prueba de ELISA.

METODO:

Método para la obtención y preparación de las muestras a analizar:

Las muestras de calostro proceden de cerdas de diferentes razas y edades, de las siguientes cuatro granjas:

Granja no. 1 Sn Juan Teotihuacan, Estado de México.

No se realiza vacunación contra la enfermedad de Aujeszky.

Granja no. 2 Tlaxcoapan, Hidalgo.

Vacunan cada 6 meses a hembras y sementales.

Granja no. 3 Tepetzotlán, Estado de México.

Cuentan con programa de vacunación contra la enfermedad de Aujeszky, vacunan cada 6 meses y revacunan 4 semanas antes del parto.

Granja no. 4 Santa Ana, Guanajuato.

Realizan vacunación contra la enfermedad de Aujeszky antes del parto.

Las muestras de calostro fueron recolectadas en recipientes de plástico limpios, con tapón de rosca y boca ancha, con capacidad de 20 ml. Las muestras se obtuvieron el día del parto o el día siguiente a éste, de varias tetillas, en cantidad de 10 a 15 ml. por cerda. El calostro obtenido de cada cerda fue tratado con renina comercial, se agregaron 0.8 ml de renina por cada 10 ml. de calostro, ésta mezcla fue incubada a 37 grados C hasta la formación de coágulo (2-2:30 hrs.) (4).

El suero fue separado por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante fue identificado y conservado en

congelación a -20 grados C y después a -70 grados C hasta su uso. (4).

El suero obtenido del calostro, fué utilizado sin otro tratamiento para las pruebas de inmunodifusión en agar y ELISA. Para la prueba de seroneutralización se requirió de un tratamiento adicional que será descrito dentro del método de seroneutralización. (4).

Método para la propagación y titulación viral:

Método para la propagación viral.

En las botellas Roux fueron crecidas células VERO, formandose un monoestrato al 100 % de confluencia, pasadas las 72 hrs. de incubación. (3, 4, 15).

Las botellas fueron infectadas con virus de Aujeszky, 200 microlitros por botella. Fueron incubadas durante 60 minutos, y se adicionaron 7 ml. de medio de mantenimiento por botella. (4, 33).

A las 48 hrs. el efecto citopático (ECP) fué de 80 % y se realizó la cosecha del virus. (4, 33).

Para la cosecha, a las botellas se dieron ligeros golpes para despegar las células y se efectuaron tres ciclos de congelación-descongelación utilizando hielo seco y una mezcla de alcohol-acetona (50 %-50 %). (4).

Posteriormente se efectuó una centrifugación durante 15 minutos a 5000 rpm, el sedimento fué deshechado y el sobrenadante se almacenó a -70 grados C en tubos estériles. Ya que éste era el que contenía el virus. (4, 33).

Método para la titulación viral por hemaglutinación:

Se emplearon 3 ratones cepa BALB/C, que fueron sacrificados por decapitación para obtener los glóbulos rojos. La sangre se colectó en un tubo de ensaye que contenía solución de Alsever en cantidad de 10 ml. (31).

Esta mezcla se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, se lavó con solución PBS (PBS ''A'' + PBS ''B''), éste proceso se repitió durante 3 ocasiones, es decir 2 veces más. Con una micropipeta se midieron y tomaron 30 microlitros del sedimento (glóbulos rojos), que fueron diluidos con una solución PBS para obtener así una concentración de glóbulos rojos de 0.3 %. (31).

En una placa para hemaglutinación se colocaron 0.025 ml. de virus de Aujeszky, cepa Tecamac más 0.025 ml. de PBS, a partir de éste pozo se realizaron diluciones dobles tomando 0.025 ml. de la solución contenida en cada pozo y pasando al pozo siguiente. En cada pozo se depositaron 0.025 ml. de PBS, usándose de ésta forma 8 pozos. A un noveno pozo que sirvió como testigo, se adicionaron 0.025 de PBS, finalmente a cada tubo, del primero al noveno se agregaron glóbulos rojos en cantidad de 0.05 ml. a cada uno. La placa se incubó durante 2 hrs. a temperatura ambiente, posteriormente la prueba fué leída. (31).

Método para la titulación del virus por seroneutralización:

Para determinar la concentración del virus, se diluyó decimalmente la cepa viral en tubos de ensaye con medio de mantenimiento. Ocho pozos fueron usados de la microplaca para cada dilución viral. (4, 33).

Se colocaron 25 microlitros de medio de mantenimiento en cada pozo para compensar la dilución del suero. El mismo volumen de cada dilución viral fue añadido respectivamente a los pozos correspondientes. Células VERO previamente preparadas se agregaron en cantidad de 0.15 ml. a cada pozo. (33).

Después de tres días de incubación la dilución viral fue leída por efecto citopático. El número de pozos infectados es expresado como una razón del número de pozos inoculados por dilución viral. (33).

El título viral obtenido fue de 10^{-6}

Método para la inmunodifusión en agar:

En portaobjetos limpios y desengrasados se aplicó una precapa de agarosa al 0.1 % adicionada con merthiolate, esto se realizó con un pincel. (4, 15, 21).

Una vez que la precapa hubo secado, en los mismos portaobjetos, con una pipeta se vaciaron 4 ml. de agarosa al 1 % (conteniendo también merthiolate). Los portaobjetos se introdujeron al refrigerador para ayudar a la gelificación. Se realizaron 14 perforaciones con la ayuda de un molde, 7 por placa, un pozo central y 6 periféricos, haciéndolo por duplicado en cada portaobjeto. En el pozo central se colocó el antígeno de Aujeszky y en cada uno de los pozos periféricos una muestra de cada uno de los sueros, al final y nuevamente el antígeno de Aujeszky en el pozo central. Cada uno de los portaobjetos fue dejado en cámara húmeda y la prueba se leyó a las 48 hrs. (4, 10, 21).

Método para la realización de ELISA:

Para la realización de ésta prueba, se siguieron las instrucciones del fabricante. Para ésta prueba se emplearon los sueros tal y como se obtuvieron después del tratamiento con renina. En cada una de estas placas pueden analizarse 96 muestras en aproximadamente 2:30 hrs. (23, 24).

Método para la realización de la seroneutralización:

Los sueros colostrales deben recibir un tratamiento previo a la realización de la técnica. A cada una de las muestras se le realizó un prefiltrado con papel whatmann del no. 1 o 2, después de éste filtrado se filtraron nuevamente las muestras pero ahora empleando filtros millipore de 2.5 cms. de diámetro con membranas millipore de 0.45 micrómetros de diámetro en su poro. Este último paso se realizó en condiciones de esterilidad. (4, 33).

Después de éste filtrado fué necesario inactivar los sueros a 56 grados C durante 30 minutos, y adicionar a cada muestra solución de penicilina-estreptomicina para evitar contaminaciones. (4, 33).

Una vez que los sueros fueron inactivados, se realizó la seroneutralización. (1, 4, 33).

Para la realización de ésta prueba, se tripsinizaron botellas conteniendo células VERO en monocapa confluyente, dándoseles el mismo tratamiento para su obtención mencionado en el apartado de titulación por el método de neutralización.

A partir de la muestra ya descongelada, se montaron 6 diluciones dobles utilizando medio de mantenimiento como diluyente en un

volúmen de 25 microlitros. (4, 33).

A cada dilución se le adicionó el antígeno en cantidad de 300 DI 50 %. Se incubó a 37 grados C durante 1 hora con agitación moderada cada 15 minutos. (4, 33).

Las células se adicionaron en cantidad de 150 microlitros por pozo. (4, 33).

Se montaron también testigos, positivo con el virus de la enfermedad de Aujeszky y negativo con medio de mantenimiento. (4, 33).

Las muestras a analizar se dejaron en incubación durante 72 hrs. La lectura se realizó visualmente con la ayuda de un microscopio invertido, observando la presencia o ausencia de efecto citopático. (4, 33).

Método estadístico para la comparación de las técnicas realizadas:

Para la realización del análisis estadístico, se utilizó una computadora personal, empleándose el programa NWA Statpak. (8, 8).

RESULTADOS

Resultados de la titulación del virus por hemaglutinación:

El título del virus de la enfermedad de Aujeszky cepa Tecamac fué de 64 unidades hemaglutinantes/0.025 ml de virus; ó 2560 unidades hemaglutinantes/ml de virus.

Los títulos positivos se leyeron visualmente como una clara mallia en el fondo de la placa. (15)

Resultados de la titulación del virus por seroneutralización:

El título del virus cepa Tecamac fué de 10^6

A las 72 horas postinfección, la presencia o ausencia del efecto citopático (ECP) consistente en células que se redondean y se desprenden de la monocapa formando acúmulos, células gigantes y multinucleadas que en algunos campos se observaron con extensiones filamentosas. (5, 14).

Los resultados para cada muestra y por cada técnica se presentan en la siguiente tabla:

TABLA # 1 Resultados obtenidos por granja después del análisis de las muestras por las técnicas de inmunodifusión, ELISA y seroneutralización

	Programa de vacunación	Inmunodifusión		ELISA		Seroneutralización	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Granja # 1 Sn. Juan Teotihuacán	No tiene	0	17	3	14	14	3
Granja # 2 Tlaxcoapan Hgo.	Vacunan cada 6 meses a machos y hembras	0	9	2	7	8	1
Granja # 3 Santa Ana Gto.	Realizan vacunación a hembras 4 semanas antes del parto.	1	27	21	7	27	1
Granja # 4 Tepetzotlán Mex..	Vacunan cada 6 meses a machos y hembras	2	8	8	2	8	0
No. de muestras analizadas: 62							

La evaluación de las técnicas de inmunodifusión en agar, ELISA y seroneutralización en cuanto a sensibilidad y especificidad se observan a continuación en las tablas 2, 3 y 4.

TABLA # 2 Comparación entre las técnicas de inmunodifusión y ELISA en base a su sensibilidad y especificidad.

	Resultados (+) a ELISA	Resultados (-) a ELISA
Resultados (+) a inmunodifusión	3	0
Resultados (-) a inmunodifusión	29	29
No. de muestras analizadas: 62		

Sensibilidad = 9.37 %

Especificidad = 100 %

TABLA # 3 Comparación entre las técnicas de inmunodifusión y seroneutralización en base a su sensibilidad y especificidad.

	Resultados (+) a seroneutralización	Resultados (-) a seroneutralización
Resultados (+) a inmunodifusión	3	0
Resultados (-) a inmunodifusión	54	54
No. de muestras analizadas: 62		

Sensibilidad = 5.26 %

Especificidad = 100 %

TABLA # 4 Comparación entre las técnicas de ELISA y seroneutralización en base a su sensibilidad y especificidad.

	Resultados (+) a seroneutralización	Resultados (-) a seroneutralización
Resultados (+) a ELISA	31	1
Resultados (-) a ELISA	25	4
No. de muestras analizadas: 62		

Sensibilidad = 55.35 %

Especificidad = 80 %

Resultados de la comparación estadística entre granjas que vacunan y la granja en que no se vacuna, tomando en cuenta los datos obtenidos en las técnicas de ELISA y seroneutralización. (5, 8).

Técnica de ELISA:

Promedio de absorbancia \bar{X}

Granjas que vacunan X_1

Granjas que no vacunan X_2

$H_0: X_1 = X_2$

$H_a: X_1 \neq X_2$

$t_c = -5.2877 > |t| = 1.6707$

Se rechaza H_0 , se acepta H_a .

Por lo tanto existe una diferencia significativa entre las absorbancias registradas en las granjas que vacunan y la granja que no vacuna.

Técnica de seroneutralización:

Promedio de título de anticuerpos X

Granjas que vacunan X_1

Granjas que no vacunan X_2

$H_0: X_1 = X_2$

$H_a: X_1 \neq X_2$

$t_c = 3.72 > t_t = 1.6794$

Se rechaza H_0 , se acepta H_a

Por lo tanto existe una diferencia significativa entre los títulos de anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky entre las granjas que vacunan y la granja que no vacuna.

DISCUSION

La toma de muestras para el diagnóstico de alguna enfermedad, o para realizar monitoreos en la especie porcina, siempre ha sido un problema de consideración, independientemente del tipo de muestra que se requiera para el análisis (sangre, orina, heces, etc.), por el manejo que se debe realizar en cada animal y porque en general el número de animales que es necesario muestrear es muy elevado. (29, 30).

Por ello, en este trabajo experimental, el calostro fue elegido como una alternativa de muestra para los animales a analizar. El calostro se obtuvo de hembras de diferentes razas y edades. Las muestras se obtuvieron justo al momento del parto, en el transcurso del día en que éste ocurrió, o alternativamente el día siguiente a éste (4).

Obtener la muestra así, representa una gran ventaja, pues los animales están tranquilos, en jaulas individuales, limpias la mayoría de las veces y el manejo que se hace con ellos es mínimo (6).

El calostro es la secreción acumulada en la glándula mamaria en las últimas semanas de gestación, junto con proteínas transferidas de la corriente sanguínea, bajo la influencia de estrógenos y progesterona. El calostro contiene un número elevado de anticuerpos, predominando en esta especie la inmunoglobulina G (IgG), en menor cantidad la inmunoglobulina A (IgA) y algunas cantidades de inmunoglobulinas M y E (IgM e IgE) (32).

Los recién nacidos incorporan el calostro a su intestino. En estos animales, el nivel de actividad proteolítica en el tubo digestivo es bajo, y se reduce aún más porque el calostro posee

inhibidores de la tripsina. Por esta razón, las proteínas del calostro no se degradan ni se utilizan como fuentes de alimento, sino que llegan intactas al intestino delgado. En el ileon son captadas en forma activa por las células epiteliales, mediante un proceso de pinocitosis, y a través de éstas células pasan a los canales linfáticos y posiblemente a los capilares intestinales. Por último, las inmunoglobulinas absorbidas llegan a la circulación sistémica, y los animales recién nacidos obtienen una transfusión masiva de inmunoglobulinas de origen materno. (32).

El tipo de placentación en cerdos es epiteliochorial, y el epitelio coriónico fetal se encuentra en contacto con el epitelio uterino intacto, así que en los animales con este tipo de placentación, se evita por completo el pasaje transplacentario de las moléculas de inmunoglobulina, y los recién nacidos de esta especie, dependen por completo de los anticuerpos que puedan recibir en el calostro. (32).

La protección conferida por las madres a sus lechones, es pues una inmunización pasiva pero vital para ellos. (32).

Por lo antes expuesto, consideramos válido usar calostro como una fuente para detectar anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky en cerdos, y así hacer una valoración del estado inmune de la hembra con respecto a esta enfermedad.

El tratamiento realizado a los calostros fué el empleado por Alvarez (4) que es la única referencia encontrada en que se trabajó con este tipo de muestras.

Aún deben realizarse pruebas para detectar si es que la renina (la enzima utilizada para separar el coágulo del calostro) además de precipitar a la caseína, también precipita otras proteínas, inclusive inmunoglobulinas. En el presente trabajo experimental,

se siguieron las indicaciones mencionadas para la utilización de calostro como una alternativa para detectar anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky. (4, 17).

En la bibliografía consultada a éste respecto, no se reporta interferencia de algún tipo, por lo que es necesario realizar más análisis siguiendo la metodología de utilizar calostro en lugar de suero como una opción más para detectar anticuerpos no sólo contra la pseudorrabia, sino para varias otras enfermedades más (4).

No se encontraron reportes de la utilización de la técnica de ELISA para detectar anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky en calostro.

Existe la posibilidad de que la renina ejerza alguna acción o efecto sobre las inmunoglobulinas, pero aún deben realizarse muchas pruebas para determinar si la renina sólo afecta la caseína o si puede tener algún efecto sobre los demás componentes del calostro. (17).

Debemos tener en consideración que los animales jóvenes y los machos no pueden ser analizados por ésta técnica.

Para la cuantificación de inmunoglobulinas contra la enfermedad de Aujeszky se ha empleado la inhibición de la hemaglutinación como una opción nueva que inclusive podría sustituir a la titulación por seroneutralización. La primera es una técnica que requiere de personal con un adiestramiento básico para realizarla. La prueba es muy clara en sus resultados y muy rápida. Su realización total lleva aproximadamente 5 horas, aunque el tipo de eritrocitos requeridos para que la hemaglutinación se lleve a cabo son necesariamente de ratones cepa BALB/C, una cepa de ratones que se obtiene de

bioterios con cierto grado de especialización. (31,33).

Esta técnica no necesita de condiciones de esterilidad, sin embargo sería interesante realizar un estandarización entre las unidades en que se realiza la lectura de ésta prueba (Unidades Hemaglutinantes), con las unidades empleadas en la técnica de titulación por seroneutralización.

Existen otros virus registrados en la literatura como hemaglutinantes, además del virus de la enfermedad de Aujeszky; ejemplos de éstos son el Herpesvirus bovino, Herpesvirus equino (virus de aborto equino) y el virus de la laringotraqueitis infecciosa. Por ello, ésta prueba se utiliza como una opción para el diagnóstico de virus de éste tipo, y tal vez pudiera usarse también para probar sueros, pues la reacción de la hemaglutinación puede ser inhibida con el antisuero específico. (15).

La titulación viral por seroneutralización, requiere por otra parte, de un laboratorio con equipo adecuado para la realización de ésta prueba, que además debe efectuarse en condiciones de esterilidad. (2, 22, 33).

Por las precauciones que deben tenerse en cuenta con los cultivos celulares, se requiere también de personal capacitado para efectuarla correctamente.

La prueba es lenta, pues las células tardan aproximadamente 48 horas en crecer y la lectura de la prueba se realiza 48 horas después de que se han colocado las muestras de suero en las placas junto con el antígeno y el medio. (2, 22).

La lectura sin embargo, es muy clara y es además una prueba cuantitativa.(33).

La primera de las técnicas inmunológicas empleada fué la inmunodifusión en agar, que es una prueba fácil de realizar, y que ultimamente se ha convertido en una alternativa importante en el diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky, demostrando que posee una alta especificidad y sensibilidad; aunque en éste trabajo experimental se obtuvieron sólo tres resultados positivos por ésta técnica. Sin embargo, no debemos olvidar que los resultados altamente específicos y sensibles que reporta la literatura son en base a suero y no a calostro, que fué la fuente de anticuerpos a demostrar en éste experimento. (4, 11, 22).

Las muestras aún estando contaminadas o tóxicas pueden ser analizadas mediante inmunodifusión en agar, y no se requieren condiciones de esterilidad. (22).

El gel que constituye el medio para la difusión en ésta prueba es barato y de fácil preparación, al igual que el resto del material requerido. La lectura se efectúa a las 48 horas de haber realizado la prueba, aunque los resultados son sólo cualitativos. (10).

Los resultados obtenidos como positivos en ésta prueba fueron sólo tres, pero no se consideran como concluyentes, pues no debemos olvidar que ninguna de las muestras provenía de animales enfermos o sospechosos. Las muestras se obtuvieron a partir de animales clínicamente sanos no vacunados y animales clínicamente sanos vacunados contra la enfermedad de Aujeszky.

Esta prueba detecta títulos de anticuerpos altos en enfermedad ocasionada por virus de campo, lógicamente el título de anticuerpos contra ésta enfermedad en animales vacunados, es mucho menor. (4, 22).

Una variante de la prueba de difusión en gel, la prueba conocida como inmunodifusión radial, ha sido utilizada experimentalmente

para el diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky y ha sido comparada con la seroneutralización encontrándose una especificidad y sensibilidad altas al compararla con la prueba mencionada. Este ensayo es fácilmente reproducible y simple de realizar. (13).

Para obtener mejores resultados, la inmunodifusión se ha utilizado después de realizar una inmunoelectroforesis, para así separar muestras muy complejas. (35).

Debemos tener en cuenta que en esta prueba las líneas de identidad se desarrollan donde hay concentraciones óptimas de antígeno y anticuerpo, y tal vez por no encontrarse los reactivos en este rango de concentración, en las muestras obtenidas y analizadas, las líneas de identidad no fueron evidentes en este trabajo experimental. (10).

En la actualidad se encuentran disponibles en los Estados Unidos en forma comercial, para ser empleadas en el diagnóstico de diversas enfermedades en las que son útiles este tipo de placas incluyendo contra la enfermedad de Aujeszky, las placas listas con el gel para difundir en dos variantes: con los pozos ya hechos, o sin ellos. En nuestro país aún no es posible obtenerlas ya preparadas. (10).

La prueba de ELISA (Inmunoensayo ligado a enzimas) es una de las pruebas más recientemente utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky. (22).

En medicina humana también ha sido ampliamente utilizada para el diagnóstico de enfermedades diversas tales como toxoplasmosis, lupus eritematoso, brucelosis y colibacilosis. Ha sido empleada también en endocrinología, hematología e inmunopatología. (34).

En medicina veterinaria, la prueba de ELISA ha tenido una difusión muy amplia, y se ha probado que es una herramienta muy útil para el diagnóstico de enfermedades tales como el cólera porcino (fiebre porcina clásica), rinotraqueítis infecciosa bovina, infección de la bolsa de Fabricio, triquinosis, tuberculosis, brucelosis, cisticercosis, enfermedad de Newcastle, rotavirus bovina, babesiosis, tripanosomiasis, fasciolosis y micoplasmosis; en ésta lista se incluye recientemente la enfermedad de Aujeszky. (34).

En el año de 1977, la técnica de ELISA comenzó a ser utilizada en los Estados Unidos para el diagnóstico del virus de la pseudorrabia; desde entonces, ha tenido ciertas modificaciones hasta llegar a poder ser utilizada en pequeños kits o equipos de diagnóstico compactos, siendo en ésta última presentación como la utilizamos en el presente trabajo experimental. (1, 2).

La prueba de ELISA, junto con seroneutralización y aglutinación en látex, son en la actualidad la tres técnicas únicas que son reconocidas en los Estados Unidos como las oficiales para realizar el diagnóstico contra la enfermedad de Aujeszky. (22).

La técnica de ELISA se ha reportado que es más sensible que la seroneutralización, aunado esto a que es más sencilla y que puede ser automatizada; por lo que ha ido reemplazando en algunos países a la seroneutralización. (1, 2).

Cuando ésta prueba comenzó a realizarse en México, era necesario preparar cada uno de los reactivos a ser empleados en ella, en consecuencia esto ocasionaba una gran pérdida de tiempo. (3, 11).

En la actualidad, los equipos de diagnóstico comerciales incluyen todos los reactivos necesarios para realizar la prueba, además de muestras controles positiva y negativa; por lo que solamente se requiere de agregar las muestras a analizar y finalmente leer la

prueba. (23,24).

En el presente trabajo experimental, el equipo de diagnóstico utilizado para la prueba de ELISA fue una microplaca con capacidad para analizar 96 muestras. Es necesario seguir las indicaciones del fabricante para así obtener unos resultados correctos pues actualmente, existen ya varios laboratorios que distribuyen este tipo de equipos de diagnóstico, y aunque el fundamento de la prueba es el mismo, pueden existir variaciones entre los distintos laboratorios que fabrican o distribuyen el equipo comercial. (23).

El tiempo empleado en la realización de la prueba, utilizando los calostros con su tratamiento previo hasta la lectura de esta, fue de aproximadamente 3 horas. (23).

Para que esta prueba pueda llevarse a cabo, no es necesario un laboratorio que cuente con equipo muy sofisticado, sólo es indispensable que este laboratorio o el lugar destinado a la realización de la prueba cuente con un lector de la prueba de ELISA. (23).

Para llevar a efecto esta prueba, no es necesario mantener las muestras en condiciones de esterilidad; se requiere de una cantidad muy pequeña de muestra para su análisis; no se requieren cultivos celulares ni mantener líneas de virus vivo para esta prueba. El tiempo que tarda en realizarse es mínimo, comparándola con la seroneutralización. Pueden analizarse muestras que por la técnica de seroneutralización no es posible hacerlo por ser consideradas como tóxicas o contaminadas. (23, 33)

No es necesario que la persona que realice la técnica de ELISA tenga una alta capacitación o un adiestramiento especial, es una prueba muy sencilla en su realización y altamente reproducible.

(22)

Esta prueba sin embargo, presenta algunas desventajas. Según estudios realizados en los Estados Unidos, los equipos de diagnóstico que detectan glicoproteína I (gI), especialmente, pueden dar resultados falsos positivos. (22)

Aunque los avances en la investigación y las modificaciones a la prueba de ELISA son muy amplios, esta prueba aún no ha podido ser adaptada para realizarse in situ. Su especificidad es ligeramente más baja cuando el equipo de diagnóstico detecta glicoproteína X (gX), aunque esto también guarda relación estrecha con la capacidad de estimulación del sistema inmune del huésped. (16,22).

La prueba de ELISA puede usarse para realizar monitoreos serológicos de hatos y para vigilancia epidemiológica. (2).

Esta prueba ha constituido también la base para diferenciar anticuerpos estimulados por un virus de campo y anticuerpos estimulados por un virus vacunal. Es posible detectar esta diferencia con ciertos equipos de diagnóstico usados en combinación con vacunas elaboradas por el mismo laboratorio mediante ingeniería genética; es decir, las partículas virales no son completas, se les suprime una parte para de esta forma poder distinguir los tipos de anticuerpos producidos de los anticuerpos desarrollados por infección natural. (22).

Antes de que la prueba de ELISA sea aceptada como prueba de uso rutinario, deben ser analizadas un gran número de muestras de campo para determinar en el diagnóstico su especificidad y sensibilidad.

La vacunas comerciales están elaboradas en su mayoría, a base de virus inactivados, esto es, virus muerto. La prueba de ELISA

detecta anticuerpos contra toda la partícula viral, es por ello que utilizamos este equipo de diagnóstico comercial que detecta anticuerpos contra la glicoproteína X. Este equipo fue utilizado porque aún en ninguna de las granjas de donde fueron obtenidas las muestras, realizan vacunación contra Aujeszky utilizando vacunas obtenidas por ingeniería genética, vacunas hechas con partículas virales incompletas; porque aunque se encuentran disponibles en forma comercial, en estos tres ranchos aún utilizan las vacunas convencionales completas. (23, 24, 25).

Las vacunas obtenidas por ingeniería genética suprimen una pequeña porción del virión, en este caso si el equipo de diagnóstico detecta la gX, la vacuna ideal para trabajarse y realizar un diagnóstico diferencial de anticuerpos vacunales y anticuerpos de campo, sería una vacuna fabricada a partir de una partícula viral a la cual se la haya suprimido la gX, ya que este tipo de vacunas al entrar en contacto con el organismo y ser estimulada la producción de anticuerpos, éstos no codificarán para la fracción viral que falta. De esta forma, al usar el equipo de diagnóstico elaborado juntamente con la vacuna, resultarán negativas las muestras de animales vacunados con vacunas incompletas, pero los animales que han sido expuestos a virus de campo, es decir, virus completo, resultarán positivos; pudiéndose diferenciar anticuerpos de animales vacunados de anticuerpos de animales expuestos a virus de campo. (22,24,25).

Los resultados que la prueba de ELISA registra se leen en un lector de la prueba de ELISA, y las unidades son llamadas absorbancia, porque se mide intensidad de color. Las absorbancias resultantes no son las mismas que las registradas en suero, aunque se registraron resultados positivos y negativos, muestras controles positivas y negativas, sin embargo no debemos olvidar que la prueba está diseñada para ser trabajada con muestras de suero y no para calostro, por esta razón, resultaría interesante

que en trabajos posteriores, se realice un muestreo doble, es decir, analizar suero y calostro del mismo animal, y estas muestras ser analizadas con equipos de diagnóstico del mismo laboratorio, así, poder comparar los resultados y de ser posible, realizar equivalencias de los resultados obtenidos a partir de dos muestras por animal. Para que estas equivalencias puedan ser empleadas en análisis posteriores. (22, 23, 24).

Para la prueba de seroneutralización es necesario trabajar con cultivos celulares, mantener líneas celulares específicas vivas (en este trabajo utilizamos células VERO) y una cepaviral viva también, para esto es necesario, realizar pases, cosechar y adicionar medio de mantenimiento o de cracimiento, según sea necesario. Es indispensable que las muestras a analizar sean inactivadas por calor a 56 grados C durante 30 minutos. Muestras consideradas como citotóxicas o contaminadas no pueden ser analizadas mediante esta técnica (1, 2, 22).

Para trabajar la seroneutralización se necesita un laboratorio equipado con estufa para incubar células, microscopio invertido y campana de extracción.

La seroneutralización es una prueba lenta, que tarda cuatro días por lo menos en su realización, además debe realizarse bajo condiciones de esterilidad, y por su complejidad esta prueba no ha podido ser automatizada. (22).

La seroneutralización es una prueba confiable, altamente específica pero la menos sensible de las tres pruebas aprobadas en los Estados Unidos para el diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky; aunque los resultados son cuantitativos. (22, 33).

La popularidad de la prueba de seroneutralización está basada en la habilidad que tiene la prueba en proporcionar una

cuantificación aproximada de los anticuerpos específicos contenidos en una muestra de suero; de esta forma, ha sido posible hasta cierto punto diferenciar los animales vacunados no infectados de los animales infectados mediante la estimación del título de anticuerpos en el hato. (2).

Los resultados de la prueba de seroneutralización se ven influenciados por la metodología seguida en la realización de la prueba. Por ejemplo, si el tiempo de incubación del virus con el suero es de 24 horas, los títulos obtenidos siguiendo esta metodología pueden ser significativamente más altos que aquellos obtenidos de una prueba común es decir, en la que la incubación es de una hora. Otras modificaciones que afectan los resultados de la prueba, son la cepa de virus de la pseudorrabia empleada, la dosis para el desafío y el tiempo después de la incubación en el cual son leídas las pruebas. (2).

En la actualidad, se han realizado esfuerzos para obtener un mismo protocolo de la prueba de seroneutralización, y ahora éste es seguido en todos los laboratorios de diagnóstico donde se realiza la prueba para la enfermedad de Aujeszky. (2).

También se han ideado nuevas pruebas de diagnóstico para suplir a la seroneutralización en consideración a su costo, tiempo y propensión a la interferencia por utilizar muestras tóxicas. (2) Si la muestra a analizar es tomada en etapas tempranas de la infección ya sea que se analice por seroneutralización o ELISA, puede dar resultados falsos negativos. Por otro lado, la prueba de aglutinación en látex permite una detección temprana a la exposición del virus de la enfermedad de Aujeszky probablemente por la habilidad especial de los anticuerpos IgM de producir reacciones de aglutinación y porque éstos anticuerpos son la primera clase de anticuerpos producidos en respuesta a la infección. (2).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

El tratamiento realizado en el calostro fue efectivo para obtener el suero suficiente para llevar a cabo las tres pruebas inmunológicas.

La técnica de nemaglutinación para la titulación viral se muestra como una buena alternativa para sustituir a la técnica de seroneutralización.

La inmunodifusión en agar resultó ser una técnica fácil en su realización, pero no concluyente al emplear los calostros tratados como fuente de anticuerpos.

La técnica de ELISA con equipo de diagnóstico comercial se efectúa en muy poco tiempo, y resultó ser efectiva para la detección de anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky en calostros tratados.

La técnica de seroneutralización fue aún más sensible que la técnica de ELISA, ya que reportó más resultados positivos que esta última, aunque la primera fue mucho más lenta.

Al comparar las técnicas de inmunodifusión en agar y ELISA, en relación a su sensibilidad y especificidad, la inmunodifusión resultó ser altamente específica pero poco sensible para detectar anticuerpos calostrales.

De la comparación entre las pruebas de inmunodifusión y seroneutralización en base a sensibilidad y especificidad, la técnica de inmunodifusión resultó poco sensible aunque muy específica.

La técnica de ELISA comparada con la seroneutralización resultó tener una especificidad de 80% y una sensibilidad de 55.35% para detectar anticuerpos en calostro.

En base al análisis estadístico se estableció que existe una diferencia significativa entre las granjas que vacunan y la granja que no vacuna en base a la absorbancia registrada y el título de anticuerpos detectado por las pruebas de ELISA y seroneutralización, respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

1. - AFSHAR, A., WRIGHT, P.F., and DULAC, G.C.: Development and evaluation of an indirect enzyme immunoassay for detection of porcine antibodies to Pseudorabies virus. Can. J. Vet. Res., 50: 422-426 (1988).
2. - AFSHAR, A., WRIGHT, P.F. and DULAC.: Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of antibodies to Pseudorabies virus in porcine field sera. Can. J. Vet. Res., 51: 539-541 (1987).
3. - AGUILAR, R.E.F.: Detección de anticuerpos de Aujeszky por el método de ELISA y su comparación con seroneutralización e inmunodifusión. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., 1989.
4. - ALVAREZ, S.L.M. : Enfermedad de Aujeszky: demostración de anticuerpos mediante dos técnicas inmunológicas en cerdos. Tesis de licenciatura. Es. Nal. de Cienc. Biol. Instituto Politécnico Nacional. Mex. D.F., 1990.
5. - BIBERSTEIN, E. AND CHUNG, Y.Z.: Review of Veterinary Microbiology. Blackwell Scientific Publications Inc., U.S.A., 1990.
6. - CHAVEZ, G. M. E.: Manual de uso del paquete estadístico NWA con orientación a la carrera de Médico Veterinario Zootecnista. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán, Izcalli, Edo. de Mex., 1994.
7. - CRANDELL, R.A., GUSTAFSON, D.P., WHITE, R.C. and ADAMS, F.F.: Results of field trials with a Pseudorabies virion skin test antigen. J.A.V.M.A., 184: 692-694 (1984).
8. - DANIEL, W.W.: Bioestadística. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. 3a. ed. Editorial Limusa, México D. F., 1990.
9. - ENGLISH, P.R., SMITH, W.J. and MAC LEAN, A.: La Cerda, cómo mejorar su Productividad. 2a. ed. Editorial Manual Moderno, México D.F., 1990.

- 10.- GARVEY, S.J., CREMER, N.E. and SUSSDORF, D.H. : Methods in Immunology. 3rd. ed. Addison Wesley Publishing Company, New York, 1977.
- 11.- HERNANDEZ, S.M.L. : Producción y comparación de tres métodos diferentes para la elaboración de un antígeno de Aujeszky para inmunodifusión. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Edo.de Mex., 1987.
- 12.- IGLESIAS, S.G. : Estudio comparativo de la virulencia de dos cepas del virus de la enfermedad de Aujeszky. Vet. Mex. **18**: 101-107 (1987).
- 13.- JOO, H.S., MOLITOR, T.W. and LEMAN, A.D.: Radial immunodifusion enzyme assay for detection of antibodies to Pseudorabies virus in swine serum. Am. J. Vet. Res. **45**: 2098-2099 (1984).
- 14.- LEMAN, A.D., STRAW, W., GLOCK, R.D., MENGELING, W.L., PENNY, R.H. and SCHOLL, E.: Diseases of Swine. 5th. ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1986.
- 15.- MANUAL DE PRACTICAS DE INMUNOLOGIA. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., 1983.
- 16.- MELLENCAMP, M.V., PFEIFFER, N.E., SUITER, T.B., HARNESS, J.R. AND BECKENHAUER, W.H.: Identification of Pseudorabies virus exposed swine with a gI glycoprotein enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microb. **27**: 2208-2213 (1989).
- 17.- MELLER, M.R.: Elaboración de Productos lácteos. Editorial Trillas, México D.F., 1988.
- 18.- NAKAJIMA, K., KWEON, C. H., AN, S. H., SHIBAYAMA, T., WAKAMIYA, N., KATO, S. and HIRAI, K.: Identification of the cross reactive antigen between Marek's disease virus and Pseudorabies virus by monoclonal antibodies. Av. Dis. **34**: 479-484 (1990).
- 19.- NARITA, M., IMADA, T., TAKADA, M., ISHIBASHI, K., NEMOTO, F., HARITANI, M. and KOBAYASHI, M.: Detection of reactivating Pseudorabies virus in tissue by immunoperoxidase technique. J. Comp. Path. **101**: 151-159 (1989).
- 20.- NEILL, J.D., KELLING, C.L. and RHODES, M.B.: Specificity of Pseudorabies virus serotests. Am. J. Vet. Res. **45**: 2675-2676 (1989).

21. - OCHOA, H.Z. : Estudio inmunológico del síndrome de ascitis en pollo de engorda. Tesis de licenciatura. Esc. Nal. de Cienc. Biol. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F., 1989.
22. - OSORIO, F.A. : Diagnosing testing for Pseudorabies virus infections. Vet. Med. August.: 672-678 (1993).
23. - PSEUDORABIES (Aujeszky's) VIRUS GLYCOPROTEIN X ANTIBODY TEST KIT (Tolvid Diagnostic). Agdia Inc., Elkhart, IN., U.S.A.
24. - PSEUDORABIES VIRUS gI ANTIBODY TEST KIT. IDEXX Corporation., Portland, Maine, U.S.A.
25. - PRONTUARIO DE ESPECIALIDADES VETERINARIAS. 11a. ed. Centro Profesional de Publicaciones, S.A. de C.V., México D.F., 1988.
26. - RAMIREZ, N. R. y PIJOAN, A.C.: Enfermedades del Cerdo. Editorial Diana, México D.F., 1988.
27. - RAUH, I. and METTENLEITER, T.C.: Pseudorabies virus glycoproteins-gII and gp 50 are essential for virus penetration. J. of Vir. **65**: 5348-5356 (1991).
28. - SATO, K., TANAKA, Y., KUROGI, H., TOKUHISA, S., NUMBA, K., INABA, Y. and MATUMOTO, M.: Detection of antibody to pseudorabies virus in swine sera by indirect immunoperoxidase plaque staining. J. Clin. Microb. **26**: 79-81 (1988).
29. - SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS: Casos de Aujeszky reportados durante 1992.
30. - SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS : Penetración de vacuna de Aujeszky durante 1992.
31. - TETSU, N., INABA, Y., YUKAWA, M., OHBA, S., YOSHIKI, K., HIRAHARA, T., IZUMIDA, A., FURAYA, Y. and ITOH, N.: An improved hemagglutination inhibition test for Pseudorabies virus. Jpn. J. Vet. Sci., **51**: 1271-1274 (1989).
32. - TIZARD, I.: Inmunología Veterinaria. 3a. ed. Editorial Interamericana., México D.F., 1992.
33. - U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, National Veterinary Services Laboratories: Serologic microtitration techniques. Ames, Iowa, 1992.
34. - VOLLER, A., BIDWELL, D. E. and BARTLETT, A.: The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Dynatech Laboratories Inc., Alexandria, Virginia, 1979.

35. - WILLIAMS, P.P., CORIA, M.F., PIRTLE and ERICKSON, G.A.: Comparison of a modified counterimmunoelectrophoresis test and a micrcimmunodifusion test for detection of Pseudorabies virus antibodies in porcine sera. Can.J. Comp. Med. 48: 92-96 (1984).