

52
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

PRODUCCION Y COMPARACION DE TRES METODOS DIFERENTES PARA LA ELABORACION DE UN ANTIGENO DE AUJESZKY PARA INMUNODIFUSION



V N A M

T E S I S QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA P R E S E N T A MARIA DE LA LUZ HERNANDEZ SALCEDO

ASESORES:

M.V.Z. MARCO ANTONIO FAJARDO ROMAN
M.V.Z. JORGE MUÑOZ MUÑOZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 1987



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.

I N D I C E

I	RESUMEN	1
II	INTRODUCCION	2
III	MATERIAL	6
IV	DESARROLLO	8
V	RESULTADOS	14
VI	DISCUSION	29
VII	BIBLIOGRAFIA	31

RESUMEN

Este trabajo se desarrolló en el Centro Nacional de Salud Animal -- (CENASA), de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos -- (SARH) ubicada en Santa Ana Tecamac, Estado de México.

El objetivo de este trabajo, fue encontrar un método para la producción, de un antígeno de aujeszky más económico y fácil de adquirir.

Los procesos utilizados para extraer los antígenos en estos tres métodos, han sido investigados para determinar las diferencias entre ellos.

En las tres preparaciones hechas a partir de las células de cultivo infectado, se obtuvo una gran cantidad de antígeno. En los métodos de extracción enzimática y precipitación con polietilén glycol, se observó que el antígeno obtenido presentaba anticuerpos inespecíficos contra el antisuero y el método de precipitación por sulfato de amonio fue el mejor ya que presentó una sensibilidad y una especificidad para la prueba de inmunodifusión.

Este antígeno fue sometido con suero de campo en la técnica de inmunodifusión, la cuál podremos recomendar en forma rutinaria, la realización de ésta para todos los sueros recibidos en el laboratorio y la prueba de sueroneutralización, podría ser aplicada solamente en los sueros que resultaran negativos en la técnica de inmunodifusión.

INTRODUCCION.

En el año de 1902 el Dr. Aujeszky, publicó el primer artículo acerca de la pseudorrabia, realizando la descripción de la enfermedad al observarla en bovinos afectados en Hungría su país natal. Las investigaciones realizadas por Aujeszky al reproducir la enfermedad en ovinos, perros y gatos y al adaptar el agente causal al conejo, lo llevaron a demostrar la sintomatología diferencial entre este padecimiento y la rabia, enfermedad viral ya conocida y descrita por Pasteur. (15 y 24)

Actualmente la enfermedad de Aujeszky se encuentra ampliamente distribuida en el continente Europeo, ocasionando en algunos países, graves pérdidas económicas. (7 y 24)

En América, fué reportada inicialmente por Shope en 1931, aunque existen pruebas de su presencia en los Estados Unidos por lo menos desde 1813, en donde era conocida con la sinonimia de "comezón loca". (Mad itch) (24)

Los primeros reportes sobre la enfermedad de Aujeszky en México, fueron realizados por Bachtold en 1945, quien describió la sintomatología clásica del padecimiento de bovinos de los estados de Aguascalientes y Guerrero. (7 y 16)

Debido a que la pseudorrabia es mortal en el bovino, en México no se reportaron nuevos casos de la enfermedad durante aproximadamente 25 años, hasta la aparición de un brote en bovinos del estado de Guerrero en el año 1971. (16)

Durante 1973 se reportó un brote grave de la enfermedad de Aujeszky en cerdos, ocurrido en una granja del estado de Jalisco que frecuentemente importaba animales para pie de cria procedentes de los Estados Unidos de Norteamérica.

Durante este año y el siguiente la enfermedad prevaleció en la zona provocando la muerte de 3500 lechones. (7)

Posteriormente la pseudorrabia se extendió en los primeros meses de 1975 a los estados de Guanajuato y Michoacán afectando porcinos y perros.

Hacia finales del mismo año se reportó en granjas del estado de Guanajuato una alta mortalidad de lechones, después de la llegada de un verraco procedente del estado de Iowa, E.U.

Por tales motivos se tomaron algunas medidas para evitar su diseminación, pero para entonces ya había penetrado a la mayor área porcícola de México, infectando a 37,000 hembras y causando la pérdida de 20,000 lechones. (7)

En 1976 dicho Estado continuó padeciendo la enfermedad de Aujeszky pero la repercusión económica para los poricultores fué menor debido a una población parcialmente inmune. (7)

Al año siguiente se reportan casos en los Estados de México, San Luis Potosí y Oaxaca. Para 1978 y 1979 se constituyó una clara zona enzótica en el Bajío, donde probablemente la vacunación ha colaborado a reducir las pérdidas. *

En 1980 se presentó un brote en el estado de Nuevo León y se reportó nuevamente la enfermedad en el Estado de México. *

En la mayoría de las especies afectadas como bovinos, ovinos, perros, gatos, zorras, conejos, etc., la pseudorabia se caracteriza por presentar trastornos nerviosos; prurito intenso que llega a provocar la automutilación y el curso inevitablemente fatal. (2,7 y 24)

En el ganado porcino la gravedad clínica de la enfermedad es muy variable, siendo en ocasiones desde muy severa (convulsiones, coma y muerte en 24 horas) en animales de pocos días de edad, hasta inaparente o subclínica en cerdos adultos, manteniéndose estos últimos como portadores asintomáticos y presentando la fuente potencial de infección para otros cerdos y para las demás especies susceptibles. (1,7,13,16 y 24)

Entre los principales problemas que causa la enfermedad de Aujeszky en cerdos, se encuentra una baja capacidad de muchas hembras para quedar gestantes, aumento de mortinatos y/o fetos momificados y la frecuente reducción del número de lechones al nacimiento, que aunado al retraso en el crecimiento de los animales recuperados y a la muerte de un alto porcentaje de lechones; hacen de la pseudorabia uno de los principales enemigos de la industria porcícola. (7,13,

(*) Notas no publicadas.

15 y 24)

Tomando en cuenta la variabilidad de los signos clínicos y que los cambios anatomopatológicos se consideran netamente microscópicos (24), es necesario recurrir a las técnicas de laboratorio como inmunofluorescencia, seroneutralización, inoculación a conejos e inmunodifusión, para corroborar la presencia de la enfermedad en una explotación pecuaria.

Por lo anteriormente expuesto, resulta necesario establecer un diagnóstico preciso y oportuno de la enfermedad en los cerdos, para lo cual es posible recurrir a dos métodos:

- 1.- El diagnóstico clínico. (4,5,7,11,15 y 30)
- 2.- El diagnóstico de laboratorio. (3,12,17,19 y 30)

En el caso del diagnóstico clínico, contamos con los signos clínicos y sintomatología; de estornudo y tos, seguido rápidamente por pirexia, anorexia y embotamiento, y luego por desórdenes neurológicos que se manifiestan por temblor, marcha excitada, incoordinación, espasmos tónico-clónicos, convulsiones, coma y muerte.

Los animales en destete exhiben un cuadro similar pero mueren menos y si sobreviven más del 60. día de la enfermedad, es frecuente que se produzca la recuperación.

Los cerdos destetados y los animales maduros exhiben una mayor capacidad de recuperación.

Las cerdas preñadas cuando son infectadas pueden abortar embriones y fetos macerados, según la fase de gestación al momento de la exposición.

Signos menos comunes son el prurito, y en los casos prolongados la ceguera.

El inconveniente del diagnóstico clínico consiste en que algunos de los síntomas pueden ser comunes a otras enfermedades por lo que -- existe posibilidad de confusión.

El diagnóstico más preciso y seguro es el de laboratorio; disponiéndose de las pruebas de inmunofluorescencia, inoculación de conejos, seroneutralización e histopatología.

Estas pruebas son sensibles, precisas y seguras, pero tienen como inconveniente, la dificultad para realizarse en cualquier laborato-

rio, por la necesidad de equipo adecuado y de reactivos de alto costo, la disponibilidad de personal especializado, así como de animales de laboratorio y de las instalaciones para su confinamiento y su alimentación. (*)

La prueba de inmunodifusión presenta una sensibilidad de 85% y una especificidad de 89%, factores que colocan a esta técnica dentro de las idóneas para realizar el diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky presentando además otras ventajas como son su sencillez, economía, seguridad y rapidez. (*)

La finalidad del presente trabajo consistió en una evaluación de tres métodos diferentes (Extracción enzimática, precipitación con polietilén glycol y precipitación con sulfato de amonio) para la elaboración del antígeno de Aujeszky, y determinar cual de ellos nos proporciona el medio de diagnóstico más eficiente y rápido.

(*) Nota verbal de CENASA.

MATERIAL.

1.- Material Biológico:

- 1.1 Virus: Se trabajó con virus de Aujeszky cepa Tecamac adaptada a la línea celular Pk₁₅ con un título de 10^{-7} .
- 1.2 Células: Se empleó la línea celular Pk₁₅
- 1.3 Sueros: 200 muestras de cadao.

2.- Material Químico:

2.1 Medio de crecimiento:

Suero Fetal Bovino	10%
Tripticaseína fosfato	10%
Bicarbonato	1.5%
Antibiótico	1%
Fungizone	0.25%
Medio Esencial Mínimo aforar a:	1200ml.

2.2 Medio de mantenimiento:

Suero Fetal Bovino	5%
Tripticaseína fosfato	5%
Bicarbonato	2%
Antibiótico	1%
Fungizone	0.25%
Medio Esencial Mínimo aforar a:	1200ml.

2.3 Solución de Fosfato Buffer:

Cloruro de Sodio	80gr.
Cloruro de Potasio	2gr.
Fosfato de Sodio	11.5gr.
Fosfato de Potasio	2gr.
Agua Destilada	1000ml.

2.4 Agar para Aujeszky:

Agarosa	0.69%
Tris Buffer	0.05Molar
Azida de Sodio	0.025%

2.5 Tripsina:

Tripsina 1:250	10
EDTA	10
Solución de Fosfatos Buffer	100ml.

2.6 Polietilen Glycol 6000.

2.7 Cloruro de Magnesio.

2.8 Sulfato de Amonio.

3.- Material y Equipo de Laboratorio:

3.1 Botellas Roux	12
3.2 Matraz de fondo plano de 500 ml.	4
3.3 Pipetas graduadas de 1ml. y 10 ml.	50
3.4 Probeta graduada de 500ml.	3
3.5 Tubos de centrifuga de 25ml.	10
3.6 Vaso de precipitado de 500ml.	2
3.7 Agitador Magnético	1
3.8 Baño María	1
3.9 Centrifuga refrigerante	1
3.10 Columna de cristal 1.3 x 30 cm.	1
3.11 Fuente de luz	1
3.12 Incubadora de 37°C.	1
3.13 Magneto 5 bala	2
3.14 Microscopio	1
3.15 Refrigerador	1
3.16 Ultracongelador	1
3.17 Soporte universal	2

DESARROLLO

Los pasos previos para la obtención del antígeno incluyeron siembra de las células, infección y cosecha.

Cabe destacar que estos pasos son comunes para cualquiera de los métodos de extracción.

Proceso común para los tres métodos:

Se sembraron cuatro bo ellas roux con células de la línea Pk₁₅, formando un monoestrato al 100% pasadas 72 horas a una temperatura de 37°C.

Posteriormente se realizó la inoculación de las células con 200 unidades infectantes del virus de Aujeszky cepa Tecamac teniendo un título de 10^{-7} TCID. Mismas que fueron aplicadas a cada una de las botellas con 10ml. cada una, dejandose a 37°C., durante una hora para la absorción del virus.

Pasando este tiempo se adicionaron a cada botella 100ml. de medio de mantenimiento y nuevamente se mantuvieron a 37°C. hasta que aparecieron los efectos citopáticos al 100%.

Finalmente se realizó la cosecha del fluido y de las células por medio de decantación.

1.- Método de Extracción Enzimática:

El fluido y las células cosechadas se sometieron a una centrifugación de 1500 rpm. durante 10 minutos.

Se obtuvo el paquete celular al cual se le adicionaron 20 ml. de tripsina versen, y se incubó a 37°C., en estufa Roller por dos horas, durante este tiempo se adicionó bicarbonato en gotas para mantener el pH de 8.

En el momento en el que las células tomaron un color amarillento se les adicionó 2mg. de cloruro de magnesio, con el fin de inactivar a la tripsina. Posteriormente se sometió a una segunda centrifugación de 12,000 rpm. durante 30 minutos.

Se obtuvo el sobrenadante al cual se pasó a la membrana de diálisis y se dializó durante 24 horas en PBS (solución salina buffer). Se cosechó lo que quedó dentro de la membrana y se guardó a -80°C. hasta su titulación.

2.- Método de Precipitación con Polietilen Glycol:

En este método se obtuvo unicamente fluido por medio de una centrifugación de 2000 rpm. durante 15 minutos, y se desechó el pellet. El sobrenadante fué inactivado a 60°C. por 4 horas en baño maría. Terminado el tiempo se le adicionó el polietilen glycol 6000 al 50% y este se dejó en agitación a 4°C. por 90 minutos. Se dió una segunda centrifugación a 9000 rpm. durante 30 minutos, - se obtuvo el pellet y se puso en membrana de diálisis por 24 horas - con PBS. se cosechó y se guardó a -80°C. hasta su titulación.

3.- Método de precipitación con Sulfato de Amonio:

Ya teniendo el efecto citopático al 100% en las botellas Roux. Se cosechó llevandose a cabo tres ciclos de congelación y descongelación.

Todo el fluido se centrifugó a 3000 rpm. durante 30 minutos. El - sobrenadante se guardó a 4°C. y el pellet se sonificó 2 minutos 8° de intensidad. El cual se volvió a centrifugar a 5000 rpm. durante 20 minutos.

El sobrenadante se sumó al anterior y el pellet se desechó.

Al sobrenadante se le adicionó sulfato de amonio (42.5 x 100) y se dejó toda la noche en agitación a -4°C. Posteriormente se centrifugó a 9000 rpm. durante 30 minutos, el sobrenadante se desechó y el pellet se puso a dializar con PBS en la membrana de diálisis por 24 horas. Se sometió a una cuarta centrifugación de 9000 rpm. durante 30 minutos y el sobrenadante que ya es el antígeno se guardó a -80°C. hasta la siguiente prueba.

Evaluación de los Antígenos por medio de la Prueba de Inmunodifusión.

Para la realización de esta prueba se elaboró un medio compuesto -- por 0.69% de Agarosa y Tris Buffer al 0.05 Molar con un pH de 7.2 y a esto se le adicionó 0.025% de Azida de Sodio.

La mezcla fué envasada y esterilizada en autoclave manteniéndose 10 libras de presión durante 7 minutos y posteriormente conservandose a 4°C. hasta su uso.

Se utilizaron cuatro portaobjetos de cristal perfectamente limpios y secos, cada laminilla se cubrió con una capa de 4 ml. de gel. Una vez solidificado el medio, se procedió a realizar 7 perforaciones de 4 mm. y la distancia entre cada una de 2.5. mm. (fig. 1).

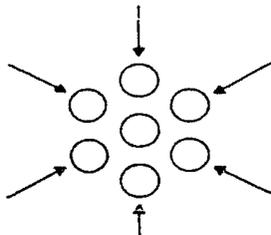


Fig. 1.- Disposición de las perforaciones en el gel solidificado.

La evaluación del antígeno de Aujeszky se realizó en dos fases:

A)- Detección del virus en los tres antígenos obtenidos.

Con una pipeta pasteur estéril se colocó en la fosa central el antisuero y el antígeno obtenido mediante el primer método, se puso en la perforación primera del lado derecho de la parte superior y en la cuarta perforación. (fig. 2).

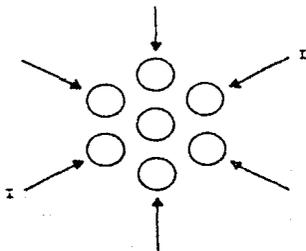


Figura 2

El antígeno obtenido mediante el segundo método se colocó en la segunda perforación y quinta. (fig. 3)

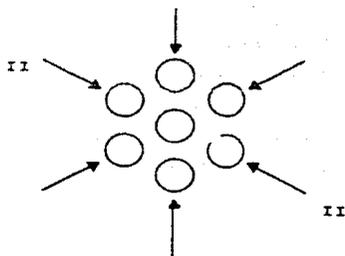


Figura 3

El antígeno obtenido mediante el tercer método se colocó en la tercera perforación y sexta. (fig. 4).

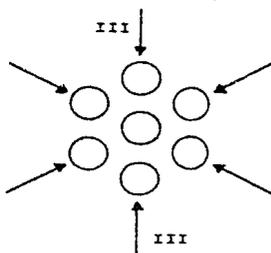


Figura 4

B.- Titulación de los Antígenos de Aujeszky

Con otra pipeta Pasteur estéril se colocó en la fosa central el antisuero y en las restantes el antígeno desde origen hasta la dilución 1:32 (fig.5)

Primera fosa origen

Segunda fosa 1:2

Tercera fosa 1:4

Cuarta fosa 1:8

Quinta fosa 1:16

Sexta fosa 1:32

La cantidad de antisuero y de antígeno por fosa aproximadamente fue de 0.02ml.

Las laminillas se incubaron en cámara húmeda a 25°C. durante 48 hrs. La lectura final de la prueba se llevó a cabo a las 48 horas empleando una fuente de luz.

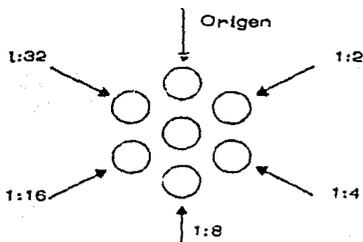


Figura 5

RESULTADOS

En la primera evaluación del antígeno, consistente en la detección del virus, se observó que los tres antígenos existen partículas virales. (fig. 6)

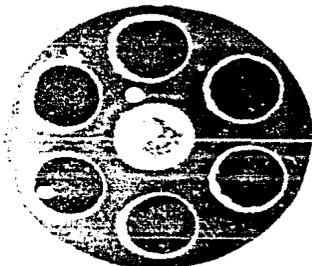


Figura 6

En el caso de los métodos de extracción enzimática y precipitación con polietilén glycol, se observaron líneas inespecíficas en la prueba de inmunodifusión, mientras que en el tercer método de precipitación con sulfato de amonio, presentó líneas de identidades específicas características de la prueba de inmunodifusión. (Fig. 7)

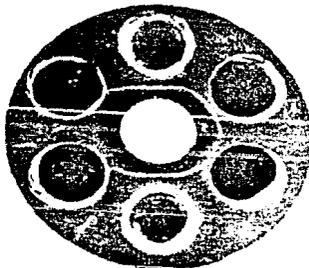


Figura 7

Debido a la impureza de los dos primeros antígenos, manifestada por una inespecificidad de líneas, que los hace inapropiados para un diagnóstico mediante la prueba de Inmunodifusión, no se procedió a su titulación.

El antígeno obtenido por el tercer método que presentó líneas de identidad específicas se sometió a una prueba extra para observar su especificidad. (fig.8)

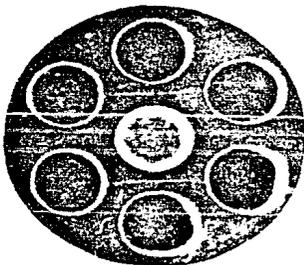


Figura 8

Posteriormente se realizó la titulación del mismo antígeno, teniendo como resultado que la efectividad del antígeno para diagnóstico mediante Inmunodifusión es hasta 1:32. (fig.9)

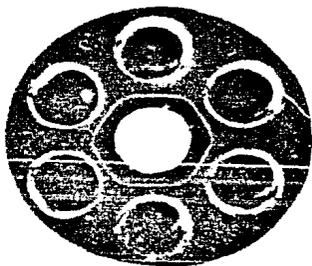


Figura 9

A efecto de corroborar la efectividad de este antígeno se procedió a valorar 200 muestras de suero de cerdos procedentes de Mérida, Tlaxcala, Querétaro, Edo. de México, Veracruz, Morelos, Michoacán y Guanajuato, dichos sueros fueron valorados mediante pruebas de seroneutralización e inmunodifusión.

Observamos que a las 48 horas después de colocar el antígeno y sueros en las fosas correspondientes, se formaron líneas de precipitación bastante claras, lo que permitió realizar la lectura final de la inmunodifusión en este tiempo.

De los 200 sueros trabajados en la prueba de seroneutralización, 101 sueros resultaron positivos con un título mayor de 1:4 (Cuadro 1).

Al trabajar los 200 sueros en la prueba de inmunodifusión se observó que 88 de los 101 positivos en seroneutralización presentaron línea de precipitación clara (Cuadro 2).

De los 40 sueros obtenidos en forma poco aséptica, 20 resultaron contaminados y 10 tóxicos, lo que provocó que no se emitiera resultado de los mismos en la prueba de seroneutralización (Cuadro 1).

De los 30 sueros que quedaron sin resultado en la prueba de seroneutralización, 11 mostraron líneas de precipitación, por lo que se consideraron positivos a inmunodifusión (Cuadro 3).

De los 69 sueros considerados negativos en la prueba de seroneutralización, 17 tuvieron un título de 1:4 de estos 2 resultaron positivos a inmunodifusión; 16 sueros tuvieron un título de 1:2 en seroneutralización y de estos 1 resultó positivo a inmunodifusión.

(Cuadro 2)

Ninguno de los 34 sueros negativos en la prueba de seroneutralización fue positivo en inmunodifusión mostrando ambas pruebas una correlación de especificidad del 100% en estos casos (Cuadro 2).

De acuerdo al patrón establecido (Cuadro 4), la prueba de seroneutralización mostró una sensibilidad de 97.1% y una especificidad de 83.5% (Cuadro 5).

La prueba de inmunodifusión mostró una sensibilidad de 87.1% y una especificidad de 97.1% (Cuadro 6).

Los 67 sueros con título igual o mayor a 1:16 en la prueba de seroneutralización resultaron todos positivos en la prueba de inmunodifusión, mostrando ambas pruebas una correlación del 100% en estos casos (Cuadro 7).

De los 34 sueros con título de 1:8 en la prueba de seroneutralización, 21 mostraron positivos en la prueba de inmunodifusión, mostrando una correlación del 61.7% (Cuadro 7).

CUADRO 1

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE SN.

Número de Sueros	Título
6	128
12	64
15	32
34	16
34	8
-----(+)	
17	4
18	2
34	0
30	Sin resultado
	(++)

Total 200

- (+) Los sueros que aparecen abajo de la línea punteada se consideraron negativos en la prueba.
- (++) Sueros que mostraron toxicidad o contaminación en la prueba.

CUADRO 2

CUADRO COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN AMBAS PRUEBAS

Título en SN	No. DE SUEROS POSITIVOS EN LA PRUEBA DE SN	No. DE SUEROS POSITIVOS EN LA PRUEBA DE ID.
128	6	6
64	12	12
32	15	15
16	34	34
8	34	21
----- (+)		
4	17	2
2	18	1
----- (++)		
0	34	34

(+) Los sueros que aparecen abajo de la línea punteada se consideran negativos en ambas pruebas.

(++) Abajo de la línea continua aparecen los 34 sueros que resultaron negativos en la prueba de SN, mismos que fueron negativos también a ID, por lo que la correlación de especificidad es de 100% en estos casos.

CUADRO 2

CUADRO COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN AMBAS PRUEBAS

Título en SN	No. DE SUEROS POSITIVOS EN LA PRUEBA DE SN	No. DE SUEROS POSITIVOS EN LA PRUEBA DE ID.
128	6	6
64	12	12
32	15	15
16	34	34
8	34	21
----- (+)		
4	17	2
2	18	1
----- (++)		
0	34	34

(+) Los sueros que aparecen abajo de la línea punteada se consideran negativos en ambas pruebas.

(++) Abajo de la línea continua aparecen los 34 sueros que resultaron negativos en la prueba de SN, mismos que fueron negativos también a ID, por lo que la correlación de especificidad es de 100% en estos casos.

CUADRO 3

RESULTADO DE AMBAS PRUEBAS AL TRABAJAR LOS SUEROS OBTENIDOS EN FORMA POCO ASEPTICA

Número de Sueros sin Diagnóstico en la prueba de SN	Número de Sueros Positivos en la prueba de ID	% de Sensibilidad Favorable a ID en estos casos.
---	---	--

30

11

36.6

CUADRO 4

PATRON PARA CALCULAR LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE AMBAS P.UEBAS

	<u>D i a g n ó s t i c o</u>		TOTAL
	Enfermos	No Enfermos	
Positivos	a	b	a + b
Negativos	c	d	c + d
TOTAL	a + c	b + d	a + b + c + d

Nota: a = animales enfermos detectados en la prueba
 b = falsos positivos en la prueba
 c = falsos negativos en la prueba
 d = animales no enfermos detectados en la prueba

Fórmula: Sensibilidad = $\frac{a}{a + c} \times 100$

Especificidad = $\frac{d}{b + c} \times 100$

CUADRO 5

DATOS PARA CALCULAR LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD EN LA SN

	D i a g n ó s t i c o		TOTAL
	Enfermos	No Enfermos	
Positivos	101	13	114
Negativos	3	66	69
TOTAL	104	79	183

$$\text{Sensibilidad} = \frac{101}{101 + 3} \times 100 = 97.1\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{66}{13 + 66} \times 100 = 83.5\%$$

CUADRO 6

DATOS PARA CALCULAR LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA ID.

	D i a g n ó s t i c o		TOTAL
	Enfermos	No Enfermos	
Positivos	88	3	91
Negativos	13	66	79
TOTAL	101	69	170

$$\text{Sensibilidad} = \frac{88}{88 + 13} \times 100 = 87.1\%$$

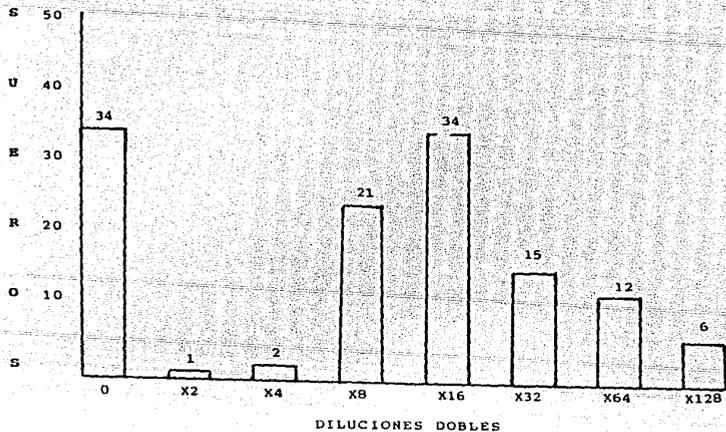
$$\text{Especificidad} = \frac{66}{66 + 3} \times 100 = 97.1\%$$

CUADRO 7

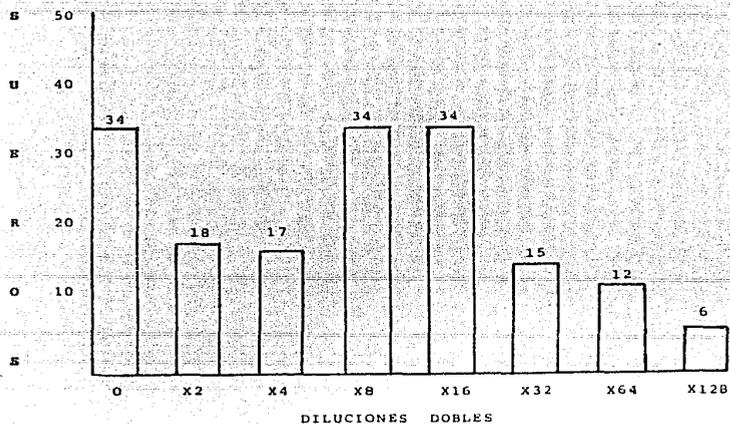
PORCENTAJES DE CORRELACION ENTRE AMBAS PRUEBAS, BASADOS EN LOS
RESULTADOS OBTENIDOS

Títulos en SN	Relación entre Sueros Po- sitivos Detectados en Am- bas pruebas SN / ID	% de Correlación
128	6/6	100
64	12/12	100
32	15/15	100
16	34/34	100
8	34/21	61.7

RESULTADOS FINALES OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION



RESULTADOS FINALES OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE SERONEUTRALIZACION



DISCUSION

En la realización de la prueba de los sueros por inmunodifusión pudimos observar que a las 48 horas se formaron líneas de precipitación fácilmente observables, por lo que consideramos que este tiempo es el adecuado para la lectura en la prueba. (7,24)

Los sueros con títulos iguales o inferiores a 1:4 pueden provenir de animales vacunados o bien de animales que padecieron la enfermedad de Aujeszky mucho tiempo atrás y que no quedaron como portadoras, por lo que el título de anticuerpos neutralizantes es bajo.

De los sueros que fueron considerados negativos en la prueba de seroneutralización (título 1:4 o inferior), 3 resultaron positivos en la prueba de inmunodifusión, con lo cual suponemos que pudiera tratarse de animales que sufrieron la enfermedad hace tiempo y se recuperaron sin quedar como portadores, ya que su nivel de anticuerpos neutralizantes decayó, pero conservaron una baja tasa de anticuerpos precipitantes.

Los sueros tóxicos o contaminados que no fué posible analizar en la prueba de seroneutralización arrojaron datos que consideramos válidos en cuanto a que la de inmunodifusión no requiere de células para proporcionar un diagnóstico.

La prueba de seroneutralización mostró una sensibilidad del 97.1% y una especificidad de 83.5%, lo que hace de esta técnica una de las pruebas más sensibles en la realización de campañas serológicas, sin embargo, presenta algunos inconvenientes como el requerir de laboratorios con instalaciones y equipo adecuado para producción de cultivos celulares, así como de técnicos especializados; además tiene una alta susceptibilidad a la contaminación y un elevado costo.

La prueba de inmunodifusión presentó una sensibilidad de 87.1%

y una especificidad de 97.1%, factores adecuados para colocar a esta técnica dentro de las idóneas para realizar el diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky, presentando además otras ventajas como son su sencillez, economía, seguridad y rapidez.

En aquellos sueros cuyos títulos son iguales o mayores a 1:6 se observa una correlación del 100% entre las pruebas de seroneutralización e inmunodifusión, y en sueros que tuvieron título de 1:8 la correlación fue de 61.7%, resultados que permiten asegurar que la inmunodifusión es una prueba apta para ser estandarizada a nivel de laboratorios regionales y permitir un diagnóstico rápido y seguro de la enfermedad de Aujeszky.

Se pudo comprobar que el antígeno que se elaboró por el tercer método es de buena calidad y de bajo costo por los trabajos realizados anteriormente.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Androes.K., Effect of Experimental Infection with Pseudorabies (Aujeszky Disease) Virus on Igs with maternal Immunity from Vaccinated Sows, American Journal of Veterinary Research, Vol. 39 No. 9, p.p. 1292-1295.
- 2.- Armbrecht, P.J., Pseudorabies in Cattle, Veterinary Medicine/Small Animal Clinician, Agri-Practice, 1977 (October), - p.p. 1619- 1621.
- 3.- Bazilev, P.M. Diagnostic de la Maladie d'Aujeszky par la - reaction de precipitation et de diffusion en gelose. Veterinariva, Moscou 1965.
- 4.- Blood, D.C. and Henderson, J.A.: Veterinary Medicine. Third edition. 1976.
- 5.- Bruners, G.: Enfermedades Infecciosas de los Animales Domesticos. 3a'ed' Editorial Prensa Médica Mexicana 1972.
- 6.- Coggins, L., Norcross, N.L.: Immunodiffusion Reaction in - Equine Infectious Anemia. Amer. Assn. Vet.Lab.Diag, p.p. -- 449-462 1979.
- 7.- Conferencia sobre detección de pseudorabia. 1976. Universidad de Ames, Iowa, U.S.A.
- 8.- Crowle, A.J.: Immunodiffusion. Second Edition. Editorial - Academic Press. New York., p.p. 361-364 1973.
- 9.- Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas. 11a.ed. Editorial Salvat. 1977

- 10.- Gutekunst, D.W., Development and Evaluation of a Microinmunodiffusion Test for Detection of Antibodies to Scudorabies Virus in Swine Serum. American Journal of Veterinary Research, 1978 (february), vol. 39 No. 2 p.p. 207-220.
- 11.- Jubb,K.V. and Kennedy, P.C.: Patología de los Animales Domésticos. 2a' ed' I,II. Editorial UPONE 1980.
- 12.- Kekking, C.L. Indirect Solid Phase Microradioimmunoassay for Detection of Pseudorabies Virus Antibody in Swine Sera. American Journal of Veterinary Research, 1978(December), - vol. 39 No. 12 p.p. 1955-1957.
- 13.- Kirkbride, C.A., Infectious Agents Associated With Fetal and Early Neonatal Ceath and Abortion In Swine Journal - of the American Veterinary Medical Association, 1978 (february), vol. 172 No. 4 p.p. 480-483.
- 14.- Manuel Merck de Veterinaria. 2a. ed. Editorial Merck and Co., Inc. 1973.
- 15.- Mare, J., Pseudorabies (Aujeszky's Disease) in Swins. Veterinary Medicine/Small Animal Clinician, Agric-Practice, 1977 (may), p.p. 915-918.
- 16.- Martell, D.M. Aislamiento y caracterización del virus de - la enfermedad de Aujeszky o Pseudorabia en México,Técnica Pecuaria en México, 1971 (Julio), p.p; 27-31.
- 17.- Medina y Correa, Presencia de anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky en sueros de cerdos de diferentes procedencias. Técnica Pecuaria en México,1977 Vol.32 p.p.93-96.

- 18.- Medoanu, T., Etude sur la Precipitation en Meliu Geliffie du Virus d'Aujeszky. Revue D'Immunologie, tome 33, 1969, - No. 6 p.p. 323-334.
- 19.- Moutou, F., Application of an Enzyme Linked Immunosorbent assay for diagnosis of Aujeszky's Disease in Swines. Veterinary Record. 1978. Vol. 102, p.p. 264.
- 20.- Pette, J., Procèdes Modernes de Diagnostic de la Maladie de Aujeszky Bull. Off, Int, Epiz., 1965,63 (H-12), 1835-1851.
- 21.- Pirtle, E.C.. Virus Inoculation and Immune Responses in Suscceptible Swine Wxposed with Pseudorabies Virus (Shope-Strain) American Journal Veterinary Research, 1978 (august) vol. 38 No. 8 p.p. 1367-1368.
- 22.- Roszkowsky, J., Use of Immunoenzyme Technique for Detection of Aujeszky's Disease Virus in Cell Culture Veterinary Record' Vol. 102, 1978 p.p. 462-463.
- 23.- Rowson, K.E., Ree, T'A. and Mahy, J.S. Dictionary of Virology. Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh Boston Melbourne (1980).
- 24.- Shope, R'E' Pseudorabies, in Diseases of Swine, 1964, -- chauter 14, second edition, edited by howard W. Dunne, the Iowa State University press, Ames, Iowa, USA. p.p.273-283.
- 25.- Sashib, M. Sukanta, K.D. Veterinary Virology. Lea y Febiger Philadelphia 1980.
- 26.- Smith, J. Patología Veterinaria, 2a.ed. Editorial Hispanoamericana, México, 1962.

- 27.- Thorner, MR., Principles and Procedures in the Evaluation of Screening for Disease. Public Health Service Publication, 1961 Public Health Monograph No. 57 USA.
- 28.- Tizard, I.R. *Inmunologia Veterinaria*. 2a. Ed. Editorial Interamericana. 1979
- 29.- Wohlgermuth, ' X., Pseudorabies Virus Associated Eith abortion in Swin Journal of the American Veterinary Medical -- Association, 1978 (february), Vol. 172 No. 4 p.p. 478-479.
- 30.- La Enfermedad de Aujeszky. Rev.SCI.TECH. off INT. EPIZ., p.p. 995-1009 1986.
- 31.- Pseudorabies Chapter 16 Pseudorabias, Section 3 Viral Diseases 1986.
- 32.- Evaluation of Pseudorabies Viral Antigens in the Agar Gel Immunodiffusion Test. Am J Vet Rs. Vol. 40. No. 4, April, 1979.