

DESARROLLO Y EVALUACION DE UN DOT-ELISA COMO PRUEBA TAMIZ PARA EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY EN MEXICO ^a

Sandra Cuevas Romero^b
Mario Guzmán Hernández^b
Octavio de Paz Villafán^b
Germán R. Colmenares Viladomat^b
Elíseo Hernández-Baumgarten^b
Enrique Pérez González^c

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue establecer el inmunoensayo Dot-ELISA como una prueba tamiz de alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Aujeszky en granjas porcícolas. El antígeno producido tuvo un título de 10^7 DICT/ml y la dilución óptima de este antígeno fue determinada en 1:10. Cien muestras de suero fueron comparadas por las pruebas de seroneutralización (SN) y Dot-ELISA. De estos sueros, 74 se obtuvieron de cerdos experimentalmente infectados y 26 sueros de cerdos sin infección. Ocho sueros de cerdos experimentalmente infectados fueron negativos a la dilución 1:2 mientras que con la prueba Dot-ELISA solamente una muestra de suero fue negativa; esto dio una sensibilidad comparativa de 98.6% para la prueba de Dot-ELISA y 89.18% para SN. Los controles negativos que se incluyeron en estas pruebas dieron una especificidad de 92.3% debido a dos sueros que resultaron ligeramente positivos. La prueba de SN tuvo una especificidad de 100%. La prueba de concordancia medida por la prueba estadística de KAPPA entre Dot-ELISA y SN fue de 0.76 significando esto un alta concordancia entre las pruebas más allá del azar. El desarrollo de la prueba Dot-ELISA provee un método alternativo para la detección de anticuerpos contra la Enfermedad de Aujeszky.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad de Aujeszky, Pseudorrabia, Prueba Dot-ELISA, Diagnóstico.

Téc. Pecu. Méx. Vol. 35 No. 3 (1997).

Desde la presentación de la Enfermedad de Aujeszky (EA) en México hasta la fecha, el comportamiento epizootológico de ésta no se ha regido por un patrón establecido, extendiéndose en gran parte de la población porcina del país (1). La Enfermedad de Aujeszky, también llamada Pseudorrabia es producida por un herpes virus que se aisló por primera vez en 1932 (2). Se encuentra distribuida en casi todo el mundo, a principios de 1970 se convirtió en un serio problema para la porcicultura de México. Todos los animales domésticos económicamente importantes son susceptibles a la enfermedad. El cerdo es el hospedador natural y reservorio del virus; los signos clínicos en lechones se caracterizan por trastornos en el sistema

nervioso central, que ocasionan la muerte; en cerdas gestantes se producen fallas reproductivas, mientras que en cerdos de engorda se afecta generalmente el tracto respiratorio (2,3).

Durante 1992, se estableció un programa de control y erradicación para la EA, en el cual surge la elaboración de esquemas de muestreo de diferentes estados de la República, para obtener un reconocimiento de las zonas enzoóticas de la enfermedad y poder determinar las estrategias de control (1). Para éste efecto es necesario contar con métodos de diagnóstico específicos y sensibles. La prueba estándar empleada para el diagnóstico serológico es la de seroneutralización en cultivo de tejidos (SN), que está considerada como la mas específica, aunque también es la menos sensible, (4,5,6,7,8).

En los últimos años se han desarrollado diferentes pruebas serológicas (inmunodifusión, aglutinación con partículas

^a Recibido para su publicación el 25 de Octubre de 1996

^b Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias Km 15.5 Carretera México-Toluca, Paño Alto D. F.

^c Universidad Nacional de Costa Rica Escuela de Medicina Veterinaria, Heredia Costa Rica. Centro de Informática para la Producción Animal Sostenible

de látex, ELISA.) diseñadas con la idea de mejorar la prueba de SN, ya sea en su costo, tiempo, sensibilidad, predisposición a sufrir interferencias en cultivos celulares por toxicidad de ciertas muestras de suero. Actualmente la utilización de métodos inmunoenzimáticos favorece la mejor combinación de rapidez, sensibilidad y facilidad en el diagnóstico serológico (8,9,10).

La prueba de Dot-ELISA (o Dot-Blot), fue descrita por Hawkes *et. al.* (7), y se basa en la propiedad de mantener total o parcialmente las propiedades antigénicas de proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa; actualmente ha sido muy utilizada para la detección de niveles bajos de proteína (9). Su fácil manejo, así como el alto grado de conservación de los reactivos, ha propiciado su aplicación para estudios antigénicos y de respuesta inmune (7).

En las granjas, el sangrado de los animales puede ser en algunos casos algo laborioso y complicado, por lo cual los estudios serológicos se limitan al muestreo de unos pocos animales, y es difícil realizar muestreos para conocer el estado sanitario de la granja con respecto a esta enfermedad; por ello, se han informado técnicas de colección de sueros por hemoadsorción en papel filtro, colectando la sangre mediante punción de la vena marginal de la oreja, (11, 12, 13).

El objetivo de éste trabajo fue desarrollar una prueba inmunoenzimática de Dot-ELISA, como prueba tamiz sencilla y económica, de alta especificidad y sensibilidad para el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Aujeszky en granjas porcícolas.

Para la elaboración de antígeno, la propagación del virus se realizó en un equipo Cell Factory marca "NUNC" (In Vitro S.A.), empleando la "cepa" de campo "Teoloyucan" del virus de la Enfermedad de Aujeszky (VEA), proliferada en línea celular PK-15 crecida con medio de cultivo Eagle (In Vitro S.A.), suplementado con el 10% de suero

fetal bovino (LITTON S.A.); cuando el monoestrato fue 100% confluyente (aproximadamente a las 72 horas de inoculación), se retiró el sobrenadante y las células se infectaron con VEA, se emplearon 50 ml de fluido por cada Cell Factory, los cuales se dejaron en incubación durante 2 horas a 37 C. Transcurrido el tiempo de infección, se retiró el fluido viral, se adicionó medio de cultivo fresco, y se incubó a 37 C. El cultivo infectado se observó diariamente, cuando se presentó efecto citopático en el 90 % del monoestrato celular, se terminó con el proceso de incubación congelando rápidamente a -20 C. Las partículas virales se cosecharon rompiendo las células mediante un proceso rápido de tres ciclos de congelación-descongelación, una parte de éste fluido se utilizó para las pruebas de seroneutralización. Posteriormente, se ultracentrifugó a 100 000 g en una centrífuga Beckman L2 65B, con rotor SW27 para eliminar los restos celulares. El fluido viral se colocó en botellas y se almacenó a -70 C; éste fue utilizado como antígeno en la prueba de Dot-ELISA, se tomaron muestras alícuotas para determinar el título viral mediante el método de Reed and Muench (14).

Para la obtención de tiras reactivas Dot-ELISA, denominadas Dot-Auj, se fijó el antígeno a las membranas de nitrocelulosa con un equipo de microfiltración Bio-Dot marca BIO-RAD, la membrana se hidrató durante 5 minutos con solución salina de fosfatos (PBS) 0.1 M pH 7.2, adicionado con 0.05% de Tween 20 (solución de lavado, SL), y se secó aplicando vacío. Para obtener la dilución óptima de trabajo, se sensibilizó la membrana con 100 µl de diluciones dobles del antígeno (diluido en amortiguador de carbonato/bicarbonato 0.5 M pH 9.6) se incubó durante 20 minutos y se secó aplicando vacío. La nitrocelulosa se bloqueó con solución de caseína al 1% diluida en solución de PBS agitando durante 60 min a temperatura ambiente. Inmediatamente se

lavó la nitrocelulosa con SL tres veces durante 3 min, y dos veces con PBS; se dejó secar a temperatura ambiente y se cortaron tiras de 0.5 cm x 1.2 cm, las cuales se adhieren a un soporte plástico (similar a las de medir pH), las tiras Dot-Auj se identificaron y se almacenaron en refrigeración hasta su utilización.

La metodología que se utilizó para la toma de muestras de sangre, fue la descrita por Eliot y Toma (11) y Gay y Hamdy (12), que consiste en la punción de la vena marginal de la oreja del cerdo, para realizar la hemoadsorción en un papel filtro; pero, para éste trabajo se hizo la modificación de tomar la muestra directamente con las tiras Dot-Auj. La punción se realizó con agujas estériles, calibre No. 20 ó 22, se sujetó la tira Dot-Auj por el extremo donde se encuentra la identificación y el extremo opuesto donde se encuentra la membrana de nitrocelulosa se colocó sobre la gota de sangre, moviendo el papel hasta quedar bien impregnado, inmediatamente se colocó en un tubo de ensayo conteniendo amortiguador de Tris- EDTA pH 7.0, durante 30 min a temperatura ambiente. Las tiras se lavaron tres veces con solución de lavado y dos con PBS, se adicionó inmunoglobulina G de conejo anti-IgG de cerdo, conjugada con Peroxidasa, diluida 1:400 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se lavó con solución de lavado dos veces y dos con PBS, el revelado de las tiras se realizó con 2 ml de 4-N-Cloronaftol (11 mg en 10 ml de metanol), diluido en amortiguador tris pH 7.6, adicionado con 5 µl de H₂O₂ concentrado (30%). La reacción positiva se manifestó por la aparición de un color violeta en la zona de reacción durante los primeros 15 minutos de reacción.

Se trabajaron con 12 cerdos SPF, del bioterio del CENID-Microbiología del INIFAP, se formaron dos grupos iguales, uno inmunizados experimentalmente con el VEA, y otro testigo sin infectar. Se colectaron un total de 100 muestras de ambos grupos en

diferentes tiempos, 74 muestras correspondieron a animales infectados con el VEA y 26 muestras del grupo de animales sanos; también se colectó suero para realizar la confrontación con la prueba de seroneutralización en cultivo de tejidos (10). El análisis estadístico se realizó mediante el programa Episclope, comparando los resultados de la prueba de Dot-ELISA, con los de la prueba de seroneutralización, que fue considerada como prueba de referencia ("Estándar de oro"). Con éste programa se determinó la sensibilidad y especificidad de ambas pruebas, así como la probabilidad de obtener verdaderos positivos o negativos para cada prueba empleada. También se obtuvo el efecto de la prevalencia sobre la probabilidad que tienen ambas pruebas para detectar animales positivos o negativos y la concordancia que existe entre ambas pruebas mediante el valor de KAPPA. Este último muestra la máxima proporción observada de concordancia más allá del azar; un valor de KAPPA de 0, indica que no existe concordancia entre las pruebas evaluadas; un valor de 1.0, indica una perfecta concordancia (15, 16).

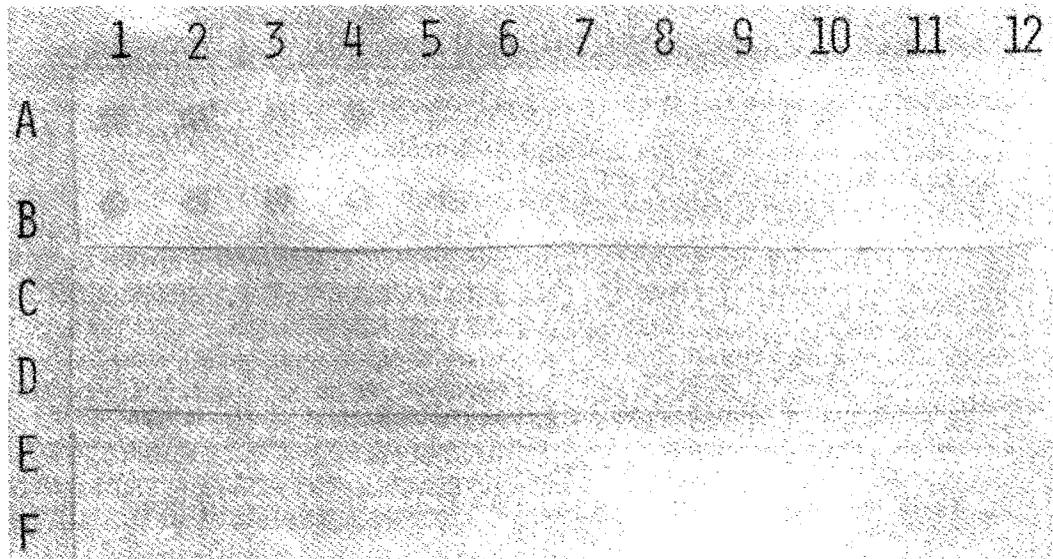
En las condiciones de este experimento, la dilución óptima para la utilización del antígeno de VEA en la prueba de Dot-ELISA fue de 1:32 (Figura 1) con un título viral de 10⁷(TICD)/ml. Se observó que el empleo de amortiguador de Tris con EDTA, permitió realizar una eficiente limpieza de las tiras Dot-Auj, evitando así la adhesión de proteínas inespecíficas contenidas en la sangre y evitando interferencias en el revelado de la prueba, la máxima coloración en el revelado de la prueba se obtuvo a 15 minutos de iniciada la reacción (datos no mostrados). El análisis de los resultados obtenidos mediante la prueba de seroneutralización, mostró una sensibilidad comparada de 89.18% y especificidad comparada de 100% (Cuadro 1), y mediante Dot-ELISA fueron: una sensibilidad comparada de 98.6% y especificidad comparada de 92.3% (Cuadro

2) La prueba de seroneutralización tuvo un valor predictivo para detectar animales positivos del 100% y para detectar animales negativos del 76.4%. En la prueba de Dot-ELISA se obtuvo un valor predictivo para detectar animales positivos de 97.3% y para animales negativos 96%. Con éstos datos se elaboró un cuadro comparativo entre ambas pruebas evaluadas; con respecto a la probabilidad que tienen para detectar animales positivos o negativos (Cuadro 4). De las 74 muestras de sueros positivos, se observó que 8 muestras fueron detectadas negativas por SN (tasa de 8/74), a diferencia de la prueba de Dot-ELISA que solamente detectó una (tasa de 1/74), lo que sugiere que SN ocasiona mayor número de falsos

negativos. La concordancia de la prueba Dot-ELISA en relación a SN (estándar de oro); expresada mediante el valor de KAPPA fue de 0.76 a un nivel de confianza de 95%, indica una adecuada proporción de que ambas pruebas coincidan más allá del azar, sin determinar, cual método es el mejor, ni cual da mejores resultados en términos de números correctos de animales sanos o enfermos (Cuadro 3).

Con los resultados obtenidos se concluye que, la prueba de Dot-Auj, representa una alternativa en el diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky y se propone como prueba tamiz por su fácil aplicación en grandes poblaciones de cerdos, para estudios epizootiológicos.

FIGURA 1. RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA DOT-ELISA, PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY*.



Lineas A y B suero control positivo

Lineas C y D suero control negativo

Lineas E y F control de conjugado para cada dilución

*Columnas 1 a 12: El antígeno se fijó a la membrana de nitrocelulosa en diluciones desde 1:2 hasta 1:409; los sueros control positivo y negativo se añadieron por líneas en dilución 1:2

CUADRO 1: SENSIBILIDAD^a Y ESPECIFICIDAD^b DE LA PRUEBA DE SERONEUTRALIZACION PARA LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY CON SUEROS DE CERDOS SPF INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE.

Resultado de la prueba SN para VEA	Animales Enfermos	Animales Sanos	Totales
Positivo	A = 66	B = 0	66
Negativo	C = 8	D = 26	34
Totales	74	26	100

^aSensibilidad (A/A+C)= 89.18%

^bEspecificidad (D/B+D)= 100%

Valores predictivos: de detectar animales positivos (A/A+B)=100%;

de detectar animales negativos (D/C+D)=76.4%

Esta tabla de contingencia fué analizada con el programa EPISCOPE.

CUADRO 2: SENSIBILIDAD^a Y ESPECIFICIDAD^b DE LA PRUEBA DOT-ELISA PARA LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY CON SUEROS DE CERDOS SPF INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE.

Resultado de la prueba Dot-AUJ	Animales Enfermos	Animales Sanos	Totales
Positivo	A = 73	B = 2	75
Negativo	C = 1	D = 24	25
Totales	74	26	100

^aSensibilidad (A/A+C)= 98.6%

^bEspecificidad (D/B+D)= 92.3%

Valores predictivos: de detectar animales positivos (A/A+B)=97.3%

de detectar animales negativos (D/C+D)=96%

Esta tabla de contingencia fué analizada con el programa EPISCOPE.

CUADRO 3: DETERMINACION DE CONCORDANCIA POR CALCULO DE KAPPA ENTRE DOT-AUJ Y SERONEUTRALIZACION EN CULTIVO CELULAR PARA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY.

	Positivos por Seroneutralización	Negativos por Seroneutralización	Totales
DOT-AUJ Positivos	A = 66	B = 2	A+B=68
DOT-AUJ Negativos	C = 8	D= 24	C+D=32
Totales	74	26	100

Proporción observada de concordancia = 0.90

Proporción esperada de concordancia = 0.59

Proporción observada menos el azar = 0.31

Concordancia máxima posible más allá del azar = 0.41

Valor de KAPPA = 0.76

Esta tabla de contingencia fué analizada con el programa EPISCOPE.

CUADRO 4. COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS ENTRE LA PRUEBA DE DOT-ELISA Y SERONEUTRALIZACION EN CULTIVO CELULAR PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY*

Prueba	Dot-ELISA			Seroneutralización			
	Parámetros %	Valor medio	Lim. Inf.	Lim. Sup.	Valor Medio	Lim. Inf.	Lim. Sup.
Sensibilidad	98.65	96.02	101.28	89.19	82.11	96.26	
Especificidad	92.31	82.06	102.55	100	100	100	
Valores predictivos ^a :							
de hallar positivo	97.33	93.69	100.98	100	100	100	
de hallar negativo	96.0	88.32	103.68	76.47	62.21	90.73	
Probabilidad de resultado:							
falso positivo	2.67			0.0			
falso negativo	4.0			23.53			
Duración en horas	3			48-72			

* Se emplearon 100 sueros de cerdos SPF; 74 animales fueron infectados experimentalmente con virus de la Enfermedad de Aujeszky y 26 cerdos sin infectar.

^a El valor predictivo se define como la probabilidad de detectar un cerdo positivo o negativo, cuando el animal es positivo a negativo respectivamente.

AGRADECIMIENTOS: Los autores agradecen la colaboración en el desarrollo del trabajo a las Técnicas Lucina Sánchez Gallegos, Martha Ruíz Mendoza, Guadalupe López Peñaloza y Miguel Tapia León y a la M.V.Z. Laura Zapata por su apoyo en el análisis estadístico de los datos.

DEVELOPMENT OF A DOT-ELISA AS SCREENING TEST FOR THE DIAGNOSTIC OF AUJESZKY'S DISEASE IN MEXICO.

SUMMARY

The purpose of this work was to establish the Dot-ELISA as a highly sensitive and specific screening test for the serologic diagnostic of Aujeszky's disease in farm pigs. The antigen produced had a titre of 10⁷ TCID₅₀/ml and the optimal dilution of this antigen was determined to be 1:10. One hundred serum samples were compared by seroneutralization (SN) test and Dot-ELISA, of these sera 74 were obtained from experimentally

infected and 26 from uninfected pigs. By eight SN, sera of the experimentally infected pigs were negative at a dilution of 1:2 while on the Dot-ELISA test only one serum sample was negative, thus showing a comparative 98.6% sensitivity for the Dot-ELISA and 89.18% for the SN test. There was a 92.3% specificity for the Dot-ELISA as two of the negative controls showed slightly positive readings, while the SN test showed a 100% specificity. The test agreement measured with KAPPA statistic test between Dot-ELISA and SN was 0.76, meaning a high agreement between assays beyond chance. The development of Dot-ELISA test provides an alternative method for the detection of Aujeszky's Disease antibodies in farm pigs.

KEY WORDS: Aujeszky's Disease, Pseudorabies, Diagnostic, Dot-Blot, Dot-ELISA.

REFERENCIAS

- 1 SARH. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. DGSA. En: Programa de Control y Erradicación del Colera Porcino y la Enfermedad de Aujeszky. 1992.
- 2 Martell D M, Alcocer B R, Cerón M F, Lozano S J L, Del-Valle P P, Auró A A. Aislamiento y caracterización del virus de la enfermedad de Aujeszky o pseudorrabia en México. *Téc. Pecu. Méx.* 1971; 18 (2): 27.

3. Mercado S S, Solorzano R F, Avila R G. Avances en el estudio epidemiológico de la enfermedad de Aujeszky en México. *Avances en Enfermedades del cerdo*. 1a Ed. México: 1985:271.
4. Avrameas S, Guilbert B. Dosage enzymo-immunologique de protéines à l'aide d'immunoabsorbants et d'antigènes marqués aux enzymes. *C. R. Acad. Sci. Paris* 1971;273: 2705.
5. Van Weemen B K, Schuurs A H W M. Immunoassay using antigens-enzyme conjugates. *FEBS Lett.* 1971; 15: 232.
6. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.* 1971;8: 871.
7. Hawkes R, Niday E, Gordon J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem.* 1982;119:142.
8. Osorio A F. Planes de investigación que prestan apoyo a la campaña de erradicación de la enfermedad de Aujeszky en los Estados Unidos. En: *Memorias. Symposium sobre Enfermedades del Cerdo*. Editores: Antonio Morilla y Jorge López, 1993:18.
9. Gershoni J M, Palade G E. Protein blotting: principles and applications *Anal. Biochem.* 1983;131 (1):15.
10. Dinter Zvonimir. En *Diagnostic Virology* J. Moreno-López. Ed. by Swedish University of Agricultural Sciences, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden and Swedish International Developing Authority. 1989. 30.
11. Eliot M, Toma B. Use of blood dried filter papers applied to the screening of pseudorabies virus infected herds. XXIII World Veterinary Congress, Montreal, 1987. 292.
12. Gay G M, Hamdy M F. Prueba de inhibición de la hemaglutinación en microtécnica con muestras de sangre obtenidas con papel filtro para el diagnóstico de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). *Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria en México* 1989. 89.
13. Rodríguez-Villela M, Lara-Sagahon V, Camacho M J, Aguilar S A, Ciprián C A (1988). Detection chez la truie d'anticorps dirigés contre le parvovirus porcin par inhibition de l'hémagglutination à partir de sang adsorbé sur papier buvard. *Ann Med Vet.* 132. 687.
14. Lorenz R J, Bogel K. Method of Reed and Muench. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. 3rd ed. Series 23. Edited by: Kaplan, M.M., Koprowsky, H., 93-103. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1973.
15. Thorner R M, Romoin Q R. Principles and Procedures in the Evaluation of Screening for Disease. *Public Health Monograph*. 67, 1981. U.S.A.
16. Frankena K, Goelema J O. Programa EPISCOPE. Agricultural University, Dep. of Animal Husbandry, P.O.Box 338, 6700Ah Wageningen, The Netherlands. 1991.