

LA PRUEBA DE ELISA EN EL DIAGNOSTICO DE LA ANAPLASMOSIS*

MIGUEL TELLO ROBLES

JESUS ANTONIO ALVAREZ MARTINEZ

JUAN ALBERTO RAMOS ARAGON

RAMON ABOYTES TORRES

GERMINAL JORGE CANTO ALARCON

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objeto de desarrollar la prueba de ELISA para *Anaplasma marginale* y a su vez compararla con la de Fijación de Complemento (FC). Se inocularon cuatro animales con 1×10 eritrocitos infectados con *A. marginale* por vía endovenosa y se observó que mediante FC se lograron detectar anticuerpos específicos a la semana de inoculación en comparación con las 3 semanas que se necesitaron con ELISA. Se obtuvieron 86 muestras de suero de animales que se encontraban en una zona endémica de anaplasmosis los cuales se ensayaron con ambas pruebas. Los resultados fueron: 55 (+) y 31 (-) en FC, se asumió para esta prueba de 100% de sensibilidad y especificidad; para la interpretación de ELISA se obtuvieron las medias de los valores de absorbancia de los controles positivos y negativos y se tomaron 2 desviacio-

nes standard a partir de ellas, de esta manera los resultados arrojaron 48(+) 37(-) y 1(\pm). La sensibilidad de ELISA en relación a FC fueron de 81.8% con 45(+), 27(-), 4 falsos positivos y 10 falsos negativos. En este estudio se pudo observar que la prueba de ELISA presentó algunas ventajas sobre la de FC; tales como, uso mínimo de reactivos, interpretación objetiva, no hay uso de barbituratos, se puede trabajar con sueros hemolizados, no hay fenómeno de prozona y que la prueba se basa en la afinidad antígeno-anticuerpo y no en la concentración de anticuerpos. Esta técnica se incorpora ya a las pruebas rutinarias de diagnóstico serológico.

INTRODUCCION

Para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina, se han desarrollado una serie de técnicas serodiagnósticas entre las que encontramos la Prueba de Aglutinación de Tarjeta (PATA) y la Prueba de Fijación de Complemento (F.C.), ambas empleadas en forma rutinaria. La prueba de F.C. posee una sensibilidad y especificidad superior al 90% pero requiere una comple-

Proyecto de Hemoprotozoarios-Centro de Investigaciones en Medicina Veterinaria, Sector Pecuario, INIFAP-SARH, Km. 15.5 Carr. México-Toluca, D. F., C.P. 05110.

* Parcialmente financiado por CONACyT Proyecto PCAFBNA-002073.

ja preparación, por su parte la PATA es una prueba rápida pero requiere de pruebas complementarias (Thoen, Hall y Blackburn, 1983; Hilderbrand, 1979; González y col., 1983).

La prueba de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), es una técnica desarrollada recientemente, muestra una gran confiabilidad para el diagnóstico de un sinnúmero de enfermedades infecciosas tanto de humanos como de animales, tiene como principales características una alta sensibilidad, ser sencilla de realizar y ser económica (Bullcock y Kennet, 1977; Hall, Thoen y Blackburn, 1983; Hilderbrand, 1979).

El objetivo del presente trabajo fue el de desarrollar la prueba de ELISA para la anaplasmosis bovina y compararla con la prueba de FC mediante el uso de sueros provenientes de una zona endémica de la enfermedad.

MATERIAL Y METODOS

Para la realización del presente estudio, el antígeno fue proporcionado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicios Nacionales Veterinarios; Ames, Iowa, y fue el mismo para ambas pruebas, como conjugado se utilizó anti IgG de bovino conjugada con peroxidasa de rábano picante (Cappel Lab. Cochranville, PA. E.U.A.) el sustrato empleado fue O-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. E.U.A.) y peróxido de hidrógeno al 30%.

Los sueros controles tanto positivos como negativos se obtuvieron del banco de sueros del Proyecto Hemoprotozoarios.

Procedimiento de la prueba de ELISA. La prueba de ELISA se realizó con la modificación del procedimiento descrito por Saunders (1977): En pruebas preliminares se ejecutó la prueba de ELISA se emplearon dos

tipos de placas de polivinil, Falcon (Benton, Dickinson, Oxnard, Ca., U. S.A.) y Nunc (Intermed, Denmark), estas últimas se seleccionaron de acuerdo a su capacidad para la fijación del antígeno. De estos estudios se obtuvieron las diluciones óptimas para efectuar la prueba y fueron las siguientes, para el antígeno 1:400, para el suero 1:80 y el conjugado 1:1500.

1° Antígeno. Dilución del antígeno 1:400 en solución de carbonatos pH 9.6. Adsorción del antígeno en placas de polivinil Nunc; esto se realiza indistintamente al mantener la placa con el antígeno (100 ul. en cada pozo), a 4°C durante la noche o bien incubado a 37°C durante 3 horas.

2° Lavado. Se realizan 3 lavados con PBS al que se le agregan .5 ml de tween 20 por litro de solución (PBST), pH 7.4 para eliminar el antígeno excedente.

3° Albúmina bovina. (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.). A cada pozo se agregan 100 ul. de albúmina al 25%, diluida en PBST y se incuba a 37°C, 15 min. Repetir el 2° paso para eliminar albúmina excedente.

4° Suero. Cada suero en estudio incluso los controles, se diluye 1:80 con PBST y se colocan 100 ul. en su pozo correspondiente. Se incuba a 37°C por 15 minutos. Se repite el 2° paso para eliminar el excedente.

5° Conjugado. Se diluye 1:1500 con PBST se incuba a 37°C durante 15 minutos. Se realizan 5 lavados.

6° Sustrato. Se agregan 100 ul. del sustrato de cada pozo y se incuba durante 10 minutos a 37°C.

7° Paro de reacción. Se efectúa al agregar 100 ul. a cada pozo de ácido fluorhídrico al .1 m (Merck, Darmstadt).

8° Lectura. Se emplea un lector para placas de 96 pozos a una

densidad óptica de 405 nm (Fisher ELISA Reader).

9° Se clasifican en positivos y negativos de acuerdo a las lecturas obtenidas en absorbancia y se les delimita a partir de dos desviaciones standard de las medias de los controles, tanto positivos como negativos (Cantó y col., 1983).

Fijación de Complemento. La técnica de Fijación de Complemento se realizó según la descrita por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica.

Para detectar la presencia temprana de anticuerpos específicos en las

pruebas de FC y de ELISA, se obtuvieron ocho animales procedentes de una zona libre de anaplasmosis a los que se les realizó la prueba de FC para corroborar su negatividad en contra de **A. marginale**. Cuatro de ellos permanecieron como controles negativos y el resto se les inoculó una dosis de 1×10^9 eritrocitos infectados con **A. marginale** por animal. Una vez por semana y durante 5 semanas se obtuvieron muestras de suero de los animales, las cuales fueron congeladas a -20°C hasta el momento de su uso, asimismo se realizaron frotis sanguíneos donde se

CUADRO 1. COMPARACION DE LAS LECTURAS DE F.C. Y E.L.I.S.A. SEMANAS.

ANIMAL	1a.	2a.	3a.	4a.	5a.
	FC* ELISA**	F.C.ELISA	F.C.ELISA	F.C.ELISA	F.C.ELISA
60	1:640	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280
	.174 A	.176 A	.314 B	.372 B	.323 B
61	1:40	1:160	1:1280	1:1280	1:1280
	.169 A	.176 A	.368 B	.475 B	.452 B
65	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280
	.244 A	.259 A	.475 B	.375 B	.334 B
67	1:640	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280
	.203 A	.232 A	.305 B	.367 B	.367 B

* POSITIVO A PARTIR DE 1:40

** LECTURAS EN ABSORBANCIA A DENSIDAD OPTICA DE 405 nm.

A = (-) : B = (+).

CUADRO 2. RESULTADOS DE 86 SUEROS MEDIANTE F.C. Y ELISA
 PARA EL DIAGNOSTICO DE ANAPLASMOSIS F.C.
 F.C.

		+	-	TOT.
E L I S A	+	45*	4	49
	-	10	27**	37
	TOT.	55	31	86

* Sensibilidad = 81.8 %

** Especificidad = 87.7 %

observó **A. marginale** a partir del día 21 post-inoculación.

Sueros Problema.

Con objeto de determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA tomando la FC como prueba patrón (100% de sensibilidad y 100% de especificidad), se obtuvieron 86 muestras de suero de bovinos localizados en una zona endémica de anaplasmosis, los que fueron congelados a -20°C hasta el momento de su uso.

RESULTADOS Y DISCUSION

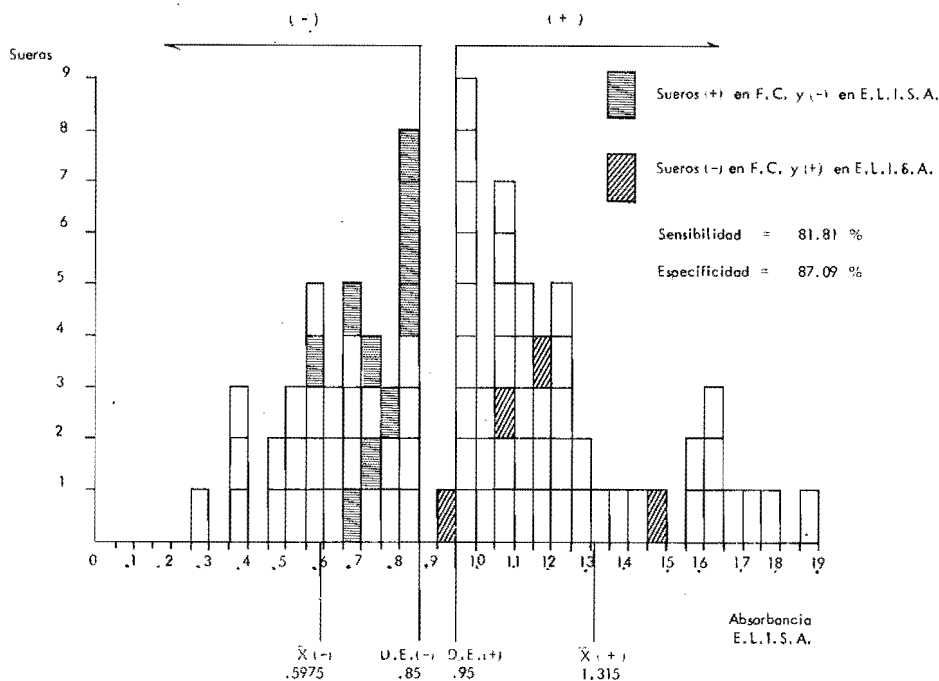
Se logró establecer la prueba de ELISA para la detección de anticuer-

pos en contra de **A. marginale**. En los animales inoculados se logró detectar anticuerpos a partir de la 3a. semana post-inoculación mediante la técnica de ELISA y a partir de la primera semana post-inoculación por medio de la prueba de FC (Cuadro 1). La detección temprana de anticuerpos por la prueba de FC se atribuye a que se detectaron IgM e IgG mientras que en la prueba de ELISA y debido al conjugado utilizado sólo se detectó IgG (Hobbs, 1985).

Al realizar el estudio de los 86 sueros problema mediante la prueba de ELISA (Gráfica 1) se observó que estos presentaron una distribución normal, por lo que se determinaron

Gráfica N. 1 -

Resultados de la prueba de E.L.I.S.A. de 86 sueros sospechosos a Anaplasma marginale



dos desviaciones standard a partir de las medias de los controles positivos y negativos se observó 48+ 37- y 1±. Al determinar la sensibilidad de ELISA de los sueros problema tomando a FC como prueba patrón, se observó que 55 resultaron positivos en FC contra 55 en ELISA, 31 negativos en FC y 27 en ELISA, lo que nos arrojó 10 sueros falsos positivos y 4 falsos negativos en la prueba de ELISA (Cuadro 2). Estos resultados pueden deberse a que algunos de los animales hubiesen recientemente contraído la infección; o bien, a que la prueba de FC haya sido sobreestimada en cuanto a su sensibilidad y especificidad.

Con estos resultados la prueba de ELISA nos proporciona un 81.8% de sensibilidad y un 87.7% de especificidad, lo que es aceptable para pruebas de escrutinio, esto aunado a ventajas tales como optimización de reactivos, ser de fácil realización, el que no se emplean barbituratos, a una interpretación objetiva, a que la hemólisis no afecta los sueros y a que el fenómeno de prozona no se presenta lo que evidencia que la prueba no se apoya en concentración de anticuerpos, sino en la afinidad de la reacción Ag-Ac. (Hilderbrand, 1979) hacen que esta prueba tenga enormes ventajas sobre la mayoría de las pruebas de escrutinio.

SUMMARY

This work was aimed at developing an ELISA procedure and compare it with the Complement Fixation (CF) test, for the serological diagnosis of anaplasmosis in cattle. Positive (+) control sera for both test were obtained as follows: Four animals were inoculated with 1×10^9 **Anaplasma** infected erythrocytes and individual serum samples collected at difference intervals after infection. Serum samples from four animals from a anaplasmosis free area tested to be free **Anaplasma** antibodies by CF, were selected, and used as negative (-) dilutions were different (1:40 CF; 1:400 ELISA). Eighty-six bovine serum samples collected in an anaplasmosis endemic area were run in both tests.

Results obtained were: 55(+) and 31(-) in CF assuming 100% sensivity (SEN); ELISA interpretation was defined as activity within ranges, by obtaining the values of the mean and two standard deviations for the (+) and (-) control sera, so results were 48(+), 37(-) and 1(\pm). In ELISA with 81.8% SEN 45(+), 27(-), 4 false (+) and 10 false (-) were observed.

With this study some advantage of ELISA were observed; minimal reagent requeriments, objetive interpretation, barbiturates absence no effect by hemolized samples, no prozone phenomenon and specially the test is based on antibody-antigen affinity, no antibody concentration. The ELISA test has been incorporated to the serological diagnosis of Anaplasmosis.

LITERATURA CITADA

BULLOCK, S.L. and KENNETH, W.W. 1977. Evaluation of some of the Parameters of the Enzyme-Linked Immunospecific assay. **J. of Infect. Dis.** 136:279.

CANTO, J., BIBERSTEIN, E.L., SCHULTE, T.A. and BEHYMER, D. 1983. Cross-reactivity of **Haemophilus somnus** Antibody in Agglutination and Complement Fixation Test and in the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **J. Clin. Microb.** 17 (3):500.

GONZALEZ, A.J., VEGA y M.C., RODRIGUEZ, C.D., JUAREZ, F.J., FERNANDEZ, R.M. y LOPEZ, A.F. 1983. Experiencias con la prueba de aglutinación en tarjeta para el diagnóstico serológico de anaplasmosis (PATA). **Téc. Pec. Méx.** 44:35.

HALL, M.R., THOEN, CH. O. and BLACKBURN, B. 1983. The effect of immunoabsorption on enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test reactions in sera of cattle exposed to **Anaplasma marginale**. **World association of Veterinary Diagnosticians Proceedings of the Third International Symposium.** 2:673.

HILDERBRAND, R.L. 1979. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), Rapid Diagnosis in Infections Diseases. **CRC Press Inc.**, Florida, U.S.A. p. 71.

HOBBS, L.F. 1985. Comparison of the indirect enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA) with the complement fixation test (CFT) for serodiagnosis of bovine brucellosis. **N. Z. Vet. J.** 33:112.

SAUNDERS, G.C. 1977. Development and evaluation of an enzyme-labeled antibody test for the detection of hog cholera antibodies. **Am. J. Vet. Res.** 38:21.

U.S.D.A. s/a. A microtiter technique for the complement test for Anaplasmosis. **U.S. Department of Agriculture**, Betsville, Maryland.