

Las Pruebas ELISA-s para Detección de Antígenos y Anticuerpos en el Diagnóstico de Surra (Mal de Caderas) de

Monzón Carlos Manuel 1, Mancebo Orlando 2 y Ruso Ana María.2

Vet. Arg. ? Vol. XXVII ? Nº 271 ? Noviembre 2010.

Resumen.

Se realizó un estudio comparativo de dos pruebas ELISA-s ; una de ellas para detección de antígenos y otra para detección de anticuerpo ; ambas , con la finalidad del diagnóstico serológico del *Trypanosoma evansi*. Se emplearon los sueros de 156 equinos provenientes de 4 brotes de Mal de Caderas ocurrido en la Provincia de Formosa. Como controles negativos se emplearon 100 suero de equinos proveniente de una zona libre del parásito.

Del total de los equinos provenientes de los brotes de la enfermedad, se aislaron los flagelados en 86 de ellos, de los cuales 70 dieron positivo a la prueba para detección de antígenos y también para anticuerpos .Doce muestras 12 fueron positivas únicamente para anticuerpos, mientras que las cuatro restantes dieron negativo para ambos métodos. Esta última prueba a su vez indico un mayor número de positivos en los animales en los cuales no se lograron detectar los parásitos por los métodos convencionales. Ambas pruebas poseen ventajas y limitaciones y su empleo en forma aislada o combinada depende de los requerimientos en diferentes situaciones sean clínicas o epidemiológicas.

Summary.

Evaluation of the ELISA-s tests for detection of antigens and antibodies in Surra Diagnostic (Mal de Caderas disease)

A comparative study of two ELISA- tests was analyzed ; one for antigens detection and another for detection of antibodies; both, with the aim of the *Trypanosoma evansi* serological diagnosis. Sera samples of 156 horses from four outbreaks of Surra occurred in Formosa Province and 100 negative controls from a parasite free area were used.

70 horses of 86 in which the parasites were isolated, were positive both for antigens and antibodies;12 samples were positive only for antibodies while the remaining four samples were negative for both ELISA methods.

ELISA antibody test also had more sensibility than antigen test in horse in which parasite were not detected by parasitological conventional methods. Both ELISA test have

advantages and limitations and their employment in isolated or combined form depends on requirements in different situations both clinical or epidemiological.

1- *Facultad de Ciencias de la Salud ? Universidad Nacional de Formosa (UNaF) ? Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)* 2. *Facultad de Recursos Naturales ? UNa.F.*

Trabajo financiado con fondos de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica; de la Universidad Nacional de Formosa.(PICTO 21423) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

Introducción.

La Surra o Tripanosomosis Equina producida por el *Trypanosoma evansi* es conocida en Argentina como Mal de Caderas (Monzón C. M. y col .1995) Este protozooario hemoparásito se encuentra en las principales regiones calidas del mundo, afectando a una gran variedad de animales, en relación aparente a diversos genotipos (Luckins, A. G . 1988). En Argentina la zona enzoótica del Mal de Caderas se ubica en la región situada al norte del paralelo 30 S (Bakos, E. y col. 2004).La enfermedad se transmite de los animales enfermos a los animales sanos por medio de insectos hematófagos principalmente tabanideos; ataca esencialmente a equinos y esporádicamente a caninos, siendo la anemia el signo cardinal de la enfermedad ; presentándose habitualmente en forma de brotes por lo cual el número de animales enfermos en un rodeo o tropilla generalmente es elevado. En la últimos veinte años numerosos brotes detectados en el Norte de Argentina provocaron la muerte de muchos animales. (Monzón C. M y col 1995). La demostración de los parásitos como método irrefutable de diagnóstico no siempre es factible, de allí la necesidad de contar con métodos indirectos que coadyuven a individualizar el mayor numero de animales infectados.

El comercio o transito de los animales procedentes de países o zonas infectadas requiere generalmente certificación sobre el estado libre de anticuerpos de los animales, a los fines de evitar el traslado de la enfermedad desde zonas enzoóticas a zonas libres. Nuestro laboratorio a desarrollado y validado una prueba ELISA (Monzón, C. M. 2000) que se emplea para los fines antes mencionado y un test para detección de antígenos basado en el empleo de anticuerpos monoclonales (Monzón, C. M. 2006 a; b), sin embargo el estudio comparativo en paralelo que analice las ventajas y limitantes de ambas prueba aún no fue

realizado, lo que motivo el presente trabajo.

Materiales y Métodos.

Se emplearon 156 muestras de sangre recolectadas con y sin anticoagulantes de equinos provenientes de cuatro brotes de Mal de Caderas ocurridos en Formosa. De estos animales 86 resultaron positivo al diagnóstico parasitológico para *T.evansi* mediante la inoculación de sangre en ratones (Monzón C. M. y col 1990) y el método consistente en visualizar los parásitos en capilares de micro hematocrito (Woo and Roger1974).

Como controles negativos se emplearon 100 sueros de equinos provenientes de la Pampa Húmeda, zona libre de *T.evansi* y que se recibieron en nuestro laboratorio para el diagnóstico serológico de Surra.

Prueba ELISA detección de anticuerpos: Se utilizó el inmunoensayo anteriormente descrito (Monzón, C.M.2000) cuyos resultados se expresan en porcentaje de positividad (PP) en relación a controles referenciados, tomado un umbral de diferenciación entre positivos y negativos de 50 PP; sensibilidad: 95.5 % para un intervalo de confianza (IC) entre 91.3 % 99.7 % y especificidad del 98% con IC entre el 95 % y el 100 %.

Prueba ELISA para detección de antígenos: Se utilizó una prueba inmuno-enzimática que emplea como detección primaria de los antígenos un anticuerpo monoclonal anti *T.evansi* desarrollado en nuestro laboratorio (Monzón, C. M.2006 a-b). Un PP de 15% marco una sensibilidad del 81% y especificidad del 98%.

La concordancia observada y el índice Kappa entre ambas pruebas, obtenido a partir de los resultados de los sueros de los equinos con diagnóstico confirmado por los métodos parasitológico fueron calculados según lo descrito por Tarabla (2000)

Resultados.

A fines prácticos los resultados se presentan en dos categorías, en relación al diagnóstico parasitológico.

1. Equinos provenientes de brotes de enfermedad.

Grupo I: Equinos con diagnóstico parasitológico positivo.

De los 86 sueros de esta categoría, 70 dieron positivo a la prueba para detección de antígenos los que su vez fueron en su totalidad positivo a la prueba para anticuerpos; otras 12 de 16 muestras fueron positivas únicamente para anticuerpos, mientras que las restantes cuatro muestras dieron negativo para ambos métodos. No se encontraron muestras positiva para antígeno y negativa para anticuerpos. (**Tabla I**). Se obtuvo una concordancia observada de 0.86 y un Kappa de 0.54. La detección de antígeno arrojó una sensibilidad del 81%, mientras que la prueba para anticuerpos lo fue en un 95 %.

Tabla I. Resultados de la Pruebas ELISA-s para Detección de Antígenos y Anticuerpos en Equinos con Diagnostico Parasitológico Positivo para <i>Trypanosoma evansi</i>		
	ELISA Anticuerpo	
ELISA Antígeno	Positivo	Negativo
Positivo (N=70)	70	0
Negativo (N=16)	12	4

Grupo II .Equinos con diagnostico parasitológico negativo.

Los resultados de las pruebas realizadas con los sueros de los 70 equinos que convivían estrechamente con el Grupo I se encuentran en la **Tabla II**. En 17 sueros se obtuvieron resultados positivos concordantes para ambas pruebas, otros 10 fueron positivos únicamente para anticuerpos; uno positivo solamente para antígeno y los 43 sueros restantes dieron negativo para ambas pruebas.**2. Equinos Controles Negativos.** No se encontraron sueros reactivos positivos a la prueba ELISA para anticuerpos, positivos para antígeno.

Tabla II. Resultados de la Pruebas ELISA-s para Detección de Antígenos y Anticuerpos en Equinos con Diagnostico Parasitológico Positivo para <i>Trypanosoma evansi</i>		
	ELISA Anticuerpo	
ELISA Antígeno	Positivo	Negativo
Positivo (N=18)	17	1
Negativo (N=52)	10	42
Totales (N= 70)	27	43

Discusión.

La demostración de los parásitos como método irrefutable de diagnostico en la Tripanosomosis Equina provocada por el *T.evansi* posee limitaciones. La parasitemia se presenta en forma ondulante lo que significa que los parásitos no siempre están en sangre o su cantidad es fluctuante y con frecuencia los flagelados se refugian en lugares de difícil acceso como el líquido cefalorraquídeo; la cantidad de parásitos decrece rápidamente una

vez extraída la muestra de sangre; la susceptibilidad de los animales de laboratorio depende de la virulencia de los tripanosomas cuando se intenta el aislamiento en estos animales y además los diferentes métodos de laboratorio que se emplean para el diagnóstico tienen variada sensibilidad (Monzón C. M y col 1990; 1995, 1996) .La detección de material genético por su elevado costo no tiene aún en nuestro medio aplicaciones prácticas pues con frecuencia se trata de analizar una gran cantidad de animales. La detección de antígenos circulantes constituye un claro indicador de la infección y se constituye en sinónimo de diagnóstico parasitológico al detectar elementos estructurales de los tripanosomas; resulta de gran utilidad especialmente cuando los parásitos no se están en circulación sanguínea por encontrarse la parasitemia en estado de eclipse por su carácter ondulante (Monzón C. M. 2006 a) o cuando la llegada de las muestras al laboratorio excede el tiempo de supervivencia de los hemoflagelados (Monzón y col 1995) . Tal situación correspondería a la detección positiva de 18 animales de Grupo II en los cuales no se logró detectar los parásitos por los métodos parasitológicos standards . Esta tesis se sustenta en el hecho de que estos animales convivan estrechamente con los animales enfermos en las tropillas de donde se aislaron los trypanosomas.

En el presente trabajo la detección antigénica dio una sensibilidad del 81 % al indicar como positivo 70 de los 86 animales con parasitemia comprobada; en coincidencia con anteriores resultados (Monzón, C. M. 2006 a-b) Las 16 muestras que dieron falso negativo a esta prueba provendrían de animales con parasitema en eclipse o muy probablemente los niveles de antígenos circulante se encontrarían por debajo del nivel de detección de la prueba. En un equino infectado en forma experimental por vía subcutánea con aproximadamente 50 tripanosomas la detección de antígenos circulantes comenzó a ponerse en evidencia hacia el día 16 post-infección (PI) para ser muy evidente posterior al día 26 PI (Monzón C. M. 2004).

La detección de anticuerpos en la Surra es empleada en diferentes situaciones clínicas o epidemiológicas; cobra especial relevancia en la certificación del estado libre de anticuerpos contra esta enfermedad que se requiere a fines del tránsito o el comercio internacional de equinos. Por si sola, no siempre indica infección activa al permanecer las inmunoglobulinas, en algunos animales, un tiempo prolongado aún después de un tratamiento específico exitoso (Monzón C. M .2003).

En el presente trabajo se demostró que la detección de anticuerpos tuvo mayor sensibilidad que la detección de antígenos tanto en los equinos en los que se demostraron los parásitos como en aquellos en los que no fue posible su detección. Con excepción de una sola muestra, los sueros que dieron positivo para antígenos también fueron positivos a la detección de anticuerpos. En forma adicional un total de doce muestras provenientes de equinos con parásitos en sangre dieron positivo para anticuerpos y negativo para antígenos. Ambas pruebas poseen ventajas y limitaciones y su empleo en forma

combinada depende de las diferentes situaciones clínicas o epidemiológicas, recomendándose el uso de ambas pruebas en paralelo con alguno de los métodos de diagnóstico parasitológico sensible cuando es necesario determinar si la infección está activa, requisito fundamental cuando se requiere administrar tratamiento farmacológico específicos.

Bibliografía.

- Bakos E.; C. M. Monzón; A. M. Russo y R. Gonzales. (2004): Anticuerpos Anti *Trypanosoma evansi* en Equinos de la Republica Argentina. XV. Actas de la Reunión de la Asociación Argentina de Laboratorios de Diagnóstico. pp 108. Luckins, A.G. (1988). *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitology Today* 4(5):137-142.
- Monzón C.M.; Mancebo O.A. and Roux J.P. (1990): Comparison between six parasitological methods for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in the subtropical area of Argentina. *Vet. Parasitol.*, 36:141-146.
- Monzón, C. M.; Jara, G. A. Y Hoyos, C. B.. (1995). "Determinación De La Supervivencia De *Trypanosoma Evansi* En Sangre De Equinos Empleando El Método Del Microhematocrito". *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 14 (3): 753-759.
- Monzon, C. M.; Russo, A.M.. (1996). "Epidemiological Review Of Equine Trypanosomiasis In Argentina". *Proceeding Of The First Internet Conference On Salivarian Trypanosomes*. Fao. Animal Production And Health Paper 136, Pp.2-4.
- Monzón, C. M. (2000). "Validación De Una Prueba Inmunoenzimática Indirecta Para La Detección De Anticuerpos Anti-*Trypanosoma Evansi* En Equinos De Argentina". *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 19 (3): 810-818.
- Monzón C.M.; Mancebo O.A.; Russo A.M. (2003) :Antibody levels by indirect ELISA test in *Trypanosoma evansi* infected horses following treatment with quinapyramine sulphate. *Vet. Par.* 111:59-63.
- Monzón C. M. . 2004. Evaluation of an Antigen-Detection Enzyme Immunoassays Test with Monoclonal Antibody for Diagnosis of *Trypanosoma Evansi* in Horses in Argentina,. Annual meeting of the OIE ad hoc group on Non Tsetse Transmitted Animal Trypanosomes Paris, France ,23 May 2004).
- Monzón, C. M. (2006) a. Detección Antigénica de *Trypanosoma evansi* en Suero de Equinos Mediante un Test ELISA con Anticuerpo Monoclonal. *Vet. Arg.* XXIII (223): 178-189.
- Monzón, C. M. (2006) b. Caracterización de un Anticuerpo Monoclonal Dirigido Contra *Trypanosoma evansi* y su Aplicación en la Detección de Antígenos Circulante. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 25 (3):1067-1074.
- Tarabla Héctor. (2000) *Epidemiología Diagnóstica*. Edit. Universidad Nacional del Litoral Centro de Publicaciones Secretaria de Extensión.
- Woo P.T.K and Rogers D.J.(1974).: A statistical study of the sensitivity of the haematocrit centrifuge technique in the detection of trypanosomes in blood. *Trans of the Royal. Soc. of Trop. Med. and Hyg.*: 68:319-326.

