

ELISA indirecto para el diagnóstico rápido de Influenza Equina

M.V.VILA ROZA¹, C.M.GALOSI^{1*}, G.A.OLIVA¹, M.G.ECHEVERRÍA¹, M.R.PECORARO¹, S. CORVA², M.E. ETCHEVERRIGARAY¹

¹Cátedra de Virología y ²Cátedra de Higiene, Epidemiología y Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, CC 296, 1900 La Plata, Argentina

* Correspondencia. FAX: 0221 425 3276. E-mail: cmgalosi@fcv.medvet.unlp.edu.ar

RESUMEN

Se desarrolló un ELISA indirecto para el diagnóstico de Influenza Equina y se estudió comparativamente con la inhibición de la hemoaglutinación. Se elaboró un antígeno a partir de líquido alantoideo infectado sobre el que se realizó una precipitación con polietilenglicol 6000. Los sueros fueron diluidos 1/20. Como segundo anticuerpo se utilizó una antigamaglobulina equina conjugada con peroxidasa. La reacción se reveló con azino-dietilbenzotiazol-sulfonato (ABTS). El punto de corte se estableció según el cociente (Cm) entre la diferencia de absorbancia de la muestra problema y la absorbancia promedio de la muestra control negativo, y la diferencia entre los promedios de las absorbancia de las muestras débil positivas y la absorbancia promedio de la muestra control negativo. Para el análisis de los resultados se utilizó el software S.A.S.® y se utilizó el estudio del chi cuadrado. La inhibición de la hemoaglutinación fue desarrollada de acuerdo al método convencional. De 391 sueros analizados, 75 y 301 resultaron negativos y positivos, respectivamente, por ambas técnicas y 15 negativos por inhibición de la hemoaglutinación fueron positivos por ELISA indirecto. La sensibilidad respecto de la inhibición de la hemoaglutinación fue del 100 % y la especificidad del 83,3 %. La técnica desarrollada constituye una herramienta útil para ser utilizada como prueba tamiz en el análisis de numerosas muestras para la determinación de anticuerpos contra Influenza equina.

Palabras claves: ELISA indirecto, Influenza Equina, diagnóstico virológico

SUMMARY

Indirect ELISA for rapid diagnosis of Equine Influenza. An indirect enzyme linked immunosorbent assay was developed. Infected and non infected allantoic fluids precipitated with polyethylenglycol 6000 were used as antigen and control antigen, respectively. Serum samples were diluted 1/20 and a commercial horse radish peroxidase-labelled rabbit anti-equine IgG was used as second antibody. The reaction was developed using azino-diethylbenzotiazol-sulfonate (ABTS). Cut-off was determined by ratio sample (Rs). The hemagglutination inhibition test was used as a reference test for the 391 samples analyzed. Of these, 301 sera were positive by hemagglutination inhibition test and indirect ELISA, 75 were negative by both techniques, and 15 were positive by indirect ELISA and negative by hemagglutination inhibition test. Using hemagglutination inhibition test as standard, the indirect ELISA showed a relative specificity and sensitivity of 83.3 and 100 %, respectively. This indirect ELISA is useful as screening test.

Key words: viral diagnosis, indirect ELISA, Equine Influenza

El virus de la Influenza Equina (IE) produce una enfermedad respiratoria epizootica en caballos de distribución mundial. De acuerdo a su

antígeno soluble interno pertenece al tipo A, y según su hemaglutinina se identifican dos subtipos: A/equi/1 y A/equi/2 cuyas cepas proto-

tipos son A/equi/1/Praga/56 y A/equi/2/Miami/63, respectivamente.

Este virus afecta a equinos de todas las edades; el período de incubación es breve, de 1 a 3 días, siendo la morbilidad alta (95-98%) y la mortalidad baja, excepto cuando se producen complicaciones bacterianas que llevan a la muerte por neumonía. Los signos clínicos más comunes son hipertermia, tos seca que desaparece en el término de 1-3 semanas y secreción nasal serosa y luego mucosa (11).

El primer brote en Argentina se produjo en 1976. La cepa actuante fue caracterizada como subtipo 1 (5). En 1985 en La Plata se realizó el primer aislamiento del subtipo 2 (13,14). Estudios serológicos demostraron que las cepas aisladas en 1976 y 1985 eran similares al prototipo A/equi/Praga/56 y A/equi/Fontainebleau/79, respectivamente. A pesar de que en Argentina las autoridades sanitarias han reglamentado el uso periódico de vacunas inactivadas, los brotes atribuidos a IE subtipo 2 se han incrementado, particularmente desde 1993 pudiendo considerarse como enzoótica tal como lo es para América del Norte, Europa y Escandinavia.

El diagnóstico de infección por IE se realiza por aislamiento e identificación del agente viral (1,16). Para detectar anticuerpos (Ac) producto de una infección natural o para medir la eficacia de una vacuna, comúnmente se realiza la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA) (2), aunque la hemólisis radial simple es una alternativa confiable por su simplicidad y rapidez (15, 17). El ensayo inmunoenzimático (ELISA) se utiliza corrientemente para detectar antígenos específicos en secreciones nasales (3, 12) pero no existen muchas evidencias de su uso para la detección de Ac en suero.

En este trabajo se describe el desarrollo de un ELISA indirecto (ELISA I) para ser utilizado como prueba tamiz en la detección de Ac contra IE y su estudio comparativo con la IHA.

Para el desarrollo de la técnica de IHA se utilizó la técnica en microplacas estandarizada por Hierholzer y col (8) empleando 8 unidades hemoaglutinantes. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. El título de IHA fue expresado como la recíproca de la dilución más alta de suero que produjo completa inhibición.

Se utilizó la cepa argentina A/equi 2/LaPlata / 93 aislada en la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata y desarrollada en cavidad alantoidea de huevos embrionados de 11 días de edad. Los huevos infectados fueron incubados 72 h a 35°C y luego el líquido alantoideo (LA) fue extraído, clarificado por centrifugación a 500 g durante 15 min, fraccionado y conservado a -70°C hasta su utilización.

Para la elaboración del antígeno (Ag) para ELISA, las proteínas del LA fueron precipitadas por la adición de polietilenglicol 6000 (PEG 6000) a una concentración final del 8% P/V, en agitación a 4°C durante 90 min y luego centrifugado a 13000 g por 20 min. El precipitado fue resuspendido 1/100 de su volumen original, en solución tamponada de fosfatos (PBS) pH 7,4 y conservado a -70°C. Con la misma metodología se preparó Ag control con LA sin infectar. Para su titulación, el Ag fue diluido en buffer carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, colocándose 100 ml por pocillo en placas de 96 cavidades (Nunc Maxisorb) y realizando diluciones en base dos desde la columna 1 hasta la 12 a partir de la dilución 1/25. Luego de 18 h de adsorción a 4°C, las placas se vaciaron y se bloquearon a 37°C durante 60 min con una solución compuesta por PBS, 0,05% de Tween 20 y 1% de seroalbúmina bovina (PBS-T-S) (9). Luego de 5 lavados con PBS se agregaron los sueros utilizados como controles: a) suero negativo y positivo de referencia a IE (Japan Racing Association, Tochigi Branch, Japan); b) tres sueros positivos y tres negativos a IE por IHA. Éstos fueron diluidos en PBS-T, desde 1/10, en base dos, desde la fila A hasta la H y se incubaron a 37°C durante 1 h. Se lavó nuevamente 5 veces con PBS y se incorporó a toda la placa 100 µl por pocillo de antigamaglobulina equina conjugada con peroxidasa (Lab. Zymed, USA) en la dilución 1/1000. Luego de 1 h de incubación a 37°C y posteriores lavados con PBS, se colocó en cada pocillo 100 µl de solución de sustrato específico: ácido cítrico 0,1M; fosfato disódico 0,2M; peróxido de hidrógeno al 0,01% y 0,3 mg/ml de azinodietilbenzotiazol-sulfonato (ABTS, Sigma Lab., USA). Los valores de absorbancia (A) fueron leídos con filtro de 405 nm usando un lector de microplacas Titertex Multiskan (Flow Laboratory,

Denmark). El mismo procedimiento se realizó con el Ag control negativo. La dilución óptima de Ag a utilizar fue la indicada por la anteúltima dilución que determinó la mayor meseta en la curva de titulación (9).

Los sueros controles fueron enfrentados luego a la dilución óptima de Ag positivo y al Ag control negativo, diluidos desde 1/10 en base dos. De esta manera se estableció el límite superior de negatividad y la dilución de uso de los sueros según los parámetros fijados por la IAEA Publication Joint FAO/IAEA Division (Viena, 1989) y se determinó la dilución 1/20 para los sueros y el valor de 2 medias (2x) de la A de las muestras negativas por IHA como primer punto de corte ($2x = 550$) (6, 9).

Posteriormente se analizaron 391 sueros obtenidos al azar de animales provenientes de distintos establecimientos de la Pcia. de Bs.As., diluidos 1/20. Se consideraron negativos a todos los sueros cuya A fue ≤ 550 , francos positivos a los sueros cuya A fue ≥ 600 y positivos débiles a aquellos cuya A fue entre 551 y 599 y que coincidieron con título $\frac{1}{4}$ en IHA. Estos valores resultaron de la diferencia entre los valores de A reales obtenidos con el Ag positivo y los valores de A reales obtenidos con el Ag control negativo.

El punto de corte final se estableció con la dilución de uso de los sueros según: el cociente (C_m) entre la diferencia de la A de la muestra problema (A_m) y la A promedio de las muestras control negativo (A_{xc}) y la diferencia entre los promedios de las A de las muestras positivas débiles (A_{xdp}) determinadas con el primer punto de corte y la A promedio de las muestras control negativo (A_{xc}) (7).

$$C_m = \frac{A_m - (A_{xc})}{(A_{xdp}) - (A_{xc})}$$

Para el análisis de los resultados se utilizó el software S.A.S.® (Statistical Analysis System), aplicando el procedimiento del chi cuadrado. La reproducibilidad de los resultados obtenidos fue determinada en diez repeticiones con los sueros controles por duplicado, mediante el análisis de varianza.

El Ag elaborado para este ELISA-I reaccionó específicamente con los sueros controles positivos en una dilución óptima de uso de 1/800 la cual no fue modificada al ser conservado a -70°C . La reproducibilidad de la técnica fue de $F = 2,15$ para los sueros controles positivos y negativos analizados por duplicado en las diez repeticiones no hallándose interacciones entre el resultado del suero y su duplicado ($F = 1,01$).

Los animales vacunados contra IE producen Ac anti LA como consecuencia de las proteínas contaminantes del huevo (4), sin embargo en esta técnica de ELISA-I, el uso de PBS-T-S como solución de bloqueo, de PBS-T como diluyente de los sueros y con la dilución 1/20 de los mismos realizada directamente sobre la placa se disminuyó la inespecificidad. Al ser enfrentados al Ag control negativo se mantuvo un color de fondo inespecífico constante de $A = 190$ para la dilución de uso. Cuando los sueros se enfrentaron al Ag control negativo no se obtuvieron falsos positivos. El tiempo de lectura final de la reacción se estandarizó en 15 min (9).

Teniendo en cuenta el C_m la interpretación de los resultados fue muy homogénea y se consideraron como negativos a aquellos sueros con $C_m \leq 1$ y positivos a aquellos con $C_m \geq 1,1$. No se obtuvieron valores intermedios ni aún en los sueros débiles positivos para el primer punto de corte (7).

En general, la prueba de IHA es la de elección para determinar Ac contra el virus de la IE (2, 8) pero se deben considerar las limitaciones de esta técnica ya que en los sueros equinos pueden encontrarse proteínas que actúan como aglutinantes inespecíficos lo que hace que dichos sueros deban recibir un tratamiento especial. Por otro lado, diferentes componentes de los Ac (mucoproteínas) pueden también inhibir la reacción dando falsos negativos. Por último se debe tener en cuenta que la sensibilidad de la prueba depende de que el suero posea suficiente título de Ac para bloquear como mínimo 4×10^6 partículas virales. A pesar de ello es una prueba de fácil realización que produce resultados dentro de las 24 h.

Comparando la IHA con el ELISA-I, el análisis estadístico resultó significativo para chi cua-

Cuadro 1. Resultados obtenidos sobre 391 sueros obtenidos al azar, frente al virus de Influenza equina, analizados por ELISA-I e IHA.

	IHA +	IHA -	Total
ELISA +	301 ^(a)	15 ^(b)	316
ELISA -	0 ^(c)	75 ^(d)	75
TOTAL	301	90	391

Técnica de ELISA: Sensibilidad= $a \times 100 / a + c = 100\%$. Especificidad= $d \times 100 / b + d = 83\%$. Técnica de IHA: Sensibilidad= $a \times 100 / a + b = 95\%$. Especificidad= $d \times 100 / c + d = 100\%$

drado ($p < 0,001$). La sensibilidad del ELISA-I fue de 100 % y la especificidad de 83 %, la sensibilidad de la IHA del 95 % y 100 % su especificidad (Cuadro 1) (10). Los resultados demuestran, por lo tanto, que esta técnica es específica y muy sensible como se hizo evidente al aplicarla a un mayor número de muestras. Los resultados se obtienen también en 24 h pero se destaca su ventaja debido a que no es necesario realizar tratamiento previo de los sueros para eliminar inhibidores inespecíficos como sucede habitualmente con la IHA.

Con esta técnica de ELISA-I no es posible diferenciar si los Ac son vacunales o corresponden a una infección natural. Es por eso que se considera que sería de utilidad contar en un futuro con una prueba que permita realizar esta diferenciación. Sin embargo la técnica desarrollada permite ser empleada como prueba tamiz en el análisis rápido de numerosas muestras.

AGRADECIMIENTOS

M.V.V.R. es becario y C.M.G. es miembro de la Carrera de Investigador de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Pcia. de Bs. As. M.G.E. y M.R.P. son miembros de la Carrera de Investigador del CONICET.

BIBLIOGRAFIA

1. Anestad G, Maagaard O (1990) Rapid diagnosis of equine influenza. *Vet. Rec.* 126: 550-551.
2. Burki F (1978) Serum antibody titers and nasal

immunity following repeated parenteral Influenza vaccinations in horses. En: Bryans JT, Gerber H (Ed), *Equine Infectious Disease IV*. Veterinary Publications, Inc. Princeton, New Jersey, USA, p. 293-299.

3. Chomel JJ, Thouvenot D, Onno M, Kaiser JM, Gourreau JM, Aymard M (1989) Rapid diagnosis of influenza infection of NP antigen using an immunocapture ELISA test. *J. Virol. Meth.* 25: 81-92.
4. Denyer MS, Crowther JR, Wardley RC, Burrows R (1984) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of specific antibodies against an H7N7 and H3N8 equine influenza virus. *J. Hyg. Camb.* 93: 609-620.
5. Fain Binda J, Martín J (1977) Aislamiento del agente etiológico de la epizootia de influenza equina en Rosario (Argentina) 1976: Myxovirus Influenza A/Equi 1/Rosario 76. *Rev. Med. Vet.* 58:261-268.
6. Galosi CM, Oliva GA, Nosetto EO, Tohya Y, Etcheverrigaray ME (1993) Desarrollo de un ensayo inmunológico indirecto para el diagnóstico del Virus herpes Equino tipo 1. *Rev. Med. Vet.* 74: 275-278.
7. Herdchek™ (1986) Manual anti PRV ELISA. Agritech Systems Inc. Portland, Maine, EE.UU.
8. Hierholzer J, Suggs M, Hall E (1969) Standardized viral hemagglutination and hemagglutination-inhibition test. II. Description and statistical evaluation. *Appl. Microbiol.* 18: 824-833.
9. International Atomic Energy Agency (IAEA) Publication. (1989) Joint FAO/IAEA Division, Viena.
10. Martín S, Meek AH, Willeberg P (1997) Medida de la frecuencia de la enfermedad y de la producción. En: *Epidemiología Veterinaria. Principios y Métodos*. Iowa State University Press, Ames, Iowa-EE.UU. Trad: Ed. Acribia. Zaragoza (España), p. 55-86
11. Mohanty SB, Dutta SK (1983) Virus de equinos. En: *Virología Veterinaria*. Universidad de Maryland, College Park, Maryland, EE.UU. Trad: Nueva Editorial Interamericana (Ed), México, p.167-200
12. Morley PS, Bogdan JR, Townsend HG, Haines DM (1995) Evaluation of Directi-gen Flu A assay for detection of influenza antigen in nasal secretions of horses. *Eq. Vet. J.* 27: 131-134.
13. Nosetto EO, Pecoraro MRI, Galosi CM, Masone R, Cid de la Paz V, Ando R, Ando Y, Etcheverrigaray ME (1989) Isolation of an equine Influenza virus strain and epizootiological study in the 1985-1986 outbreak in Argentine. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizz.* 8: 123-128.
14. Nosetto EO, Damiani A, Pecoraro MR, Massone R, Tohya Y, Galosi CM, Etcheverría MG, Norimine J, Oliva GA, Etcheverrigaray ME, Takahashi E (1994) Epidemiology of equine Influenza in Argentina. En: Nakajima H, Plowright W (Ed), *Equine Infectious Disease VII*. R & W Publications Ltd, Newmarket, Suffolk, UK, p. 346
15. Organización Mundial de la Salud (1981) Técnicas rápidas de laboratorio para diagnóstico de infección

- nes víricas. Serie de Informes Técnicos N° 661 .Ginebra, Suiza.
16. Reina J, Fernandez-Baca V, Blanco I, Munar M (1997) Comparison of Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) with a green monkey continuous cell line (Vero) and human lung embryonated cells (MRC-5) in the isolation of Influenza A virus from nasopharyngeal aspirates by shell vial culture. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1900-1901.
 17. Rossi SD, Rosales MA, Pecoraro MR, Etcheverrigaray ME (1994) Desarrollo y modificación de la técnica de hemólisis radial simple para la valoración de anticuerpos vacunales contra el virus de la influenza equina. *Med. Vet. (España)* 11 : 114-120.

Recibido: 7/9799. Revisado: 7/12/99