

Establecimiento y evaluación del sistema avidin-biotina sobre papel de nitrocelulosa, para el serodiagnóstico de cisticercosis porcina

Fidel Infante Martínez*
Oscar Reyna Monsiváis**
Herminio Farias Piñeiro***

Abstract

An immunodot test was implemented to detect pigs with antibodies against *Cysticercus cellulosae*. The antigen was prepared with *Cysticercus cellulosae* and diluted in tris buffer saline (TBS). Then it was spotted in volumes of 10 µl onto the nitrocellulose paper which then was blocked, fixed and incubated at room temperature. Pig's serum was diluted in TBS 7.5 pH containing gelatin and tween 20; then it was added followed by biotin-avidin peroxidase labeled antibody directed toward the pig's IgG. The addition of a substrate resulted in the formation of a purple color when the test was positive. The immunodot test showed a concordance of 95.4%, a sensitivity of 91.1% and a specificity of 96.9% when the results were compared with the results of the postmortem sanitary inspection. The immunodot test described in this report is simple, cheap and provides objective results for the serodiagnosis of porcine cysticercosis.

Key words: *CYSTICERCUS CELLULOSAE*, IMMUNODOT, BIOTIN-AVIDIN PEROXIDASE.

Resumen

Se instrumentó una prueba de inmunodot para detectar cerdos con anticuerpos contra *Cysticercus cellulosae*. El antígeno se preparó a partir de *Cysticercus cellulosae* diluido en una solución salina de tris (TBS). Se depositaron 10 µl del antígeno sobre papel de nitrocelulosa, el cual fue bloqueado e incubado a temperatura ambiente. El suero fue diluido en una solución de TBS con 7.5 pH, que contenía gelatina y tween 20 y se incubó, posteriormente se añadió un anticuerpo unido a avidina-biotina peroxidasa contra la IgG del cerdo. Al añadir el sustrato, la reacción positiva se manifestó de un color morado oscuro. Al comparar resultados con los obtenidos de la inspección sanitaria *post mortem*, la prueba de inmunodot obtuvo una concordancia de 95.4%, sensibilidad de 91.1% y especificidad de 96.9%. La prueba descrita es simple, barata y da resultados objetivos en el serodiagnóstico de la cisticercosis porcina.

Palabras clave: *CYSTICERCUS CELLULOSAE*, INMUNODOT, AVIDINA-BIOTINA PEROXIDASA.

Introducción

La cisticercosis porcina es una limitante en la producción de proteína de esta especie, ya que ocasiona grandes pérdidas económicas que no se han calculado en forma adecuada, además de que el cerdo juega un papel importante en el ciclo de vida de este parásito.^{1,2}

La cisticercosis porcina también representa un grave problema de salud pública en México, ya que es en los países en vías de desarrollo donde esta enfermedad adquiere

Recibido el 20 de agosto de 1996 y aceptado el 4 de febrero 1997.

* CENID Microbiología-CEPAL, Facultad de Agronomía y Ciencias, Universidad Autónoma de Tamaulipas-13, San Luis Potosí 426 Oriente, 87020, Cd. Victoria, Tamaulipas, México.

** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Km. 5 carretera Ciudad Victoria-Mante, Tamaulipas, México

*** Hospital General, Boulevard Fidel Velázquez 1845, Cd. Victoria, Tamaulipas, México.

mayor dimensión debido a que dicha zoonosis, producida por el *Cysticercus cellulosae*, puede incidir en la productividad y en la salud de personas económicamente activas cuando llega a afectar el sistema nervioso central.^{2,3,4,5,6}

Varias son las pruebas serológicas que han sido utilizadas para la detección de anticuerpos de origen humano contra el *Cysticercus cellulosae*, entre ellas: inmunoelectroforesis, fijación del complemento, prueba de aglutinación y la prueba de inmunoanálisis ELISA.^{5,7,8,9}

Hasta el momento, la prueba de inmunoanálisis ELISA es la que ha demostrado mejores resultados y ha sido utilizada y comparada en varios estudios en diferentes países.^{7,9,10,11} Sin embargo, se debe realizar un esfuerzo similar para detectar a cerdos con cisticercosis, que juegan un papel epidemiológico importante en esta enfermedad.

Por ello, el propósito de este estudio fue el de establecer y evaluar una prueba, usando el sistema avidina-biotina sobre papel de nitrocelulosa (inmunodot), para el serodiagnóstico de la cisticercosis porcina.

Material y métodos

Se obtuvieron 131 sueros de cerdos sacrificados en los rastros municipal y en el de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, en Ciudad Victoria, Tamaulipas, México. Los cerdos fueron inspeccionados inmediatamente después del sacrificio, para detectar la presencia o ausencia de *Cysticercus cellulosae*.

Los sueros fueron obtenidos de la sangre de los cerdos sacrificados, centrifugada a 3333 x durante 10 minutos y posteriormente fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

Los sueros testigo positivos utilizados no fueron incluidos en el total de sueros utilizados en este estudio.

Para instrumentar la prueba de ligadura inmunoenzimática se adaptó la técnica descrita previamente¹² siguiendo el procedimiento que a continuación se señala:

El antígeno utilizado fue de cisticerco completo, el cual se diluyó en una solución salina de tris (TBS) con pH de 7.5 y "sonicado" por 20 minutos, posteriormente fue dializado por 12 horas en TBS; después se realizaron diferentes diluciones para encontrar la sensibilidad inmunológica y la mejor dilución, la cual se utilizaría durante la prueba de inmunodot; también se midió la concentración de proteína por ml siguiendo el método de Bradford.¹³

Con el fin de obtener la especificidad inmunológica, se prepararon de manera análoga los siguientes antígenos: *Taenia solium*, cisticerco de *Echinococcus granulosus* y *Toxoplasma gondii*.

Se tomaron 10 ml de la dilución obtenida del antígeno en el paso 1, los cuales fueron concentrados en papel nitrocelulosa (PNC)* cortado en tiras de 1 x 2 cm, estas

tiras fueron tratadas con una solución bloqueadora, cuyo objetivo era mantener al antígeno viable a la temperatura ambiente por largos periodos; por lo que se prepararon tiras y se almacenaron por más de un año, para ser utilizadas después. Otras tiras se prepararon de la misma forma y fueron usadas inmediatamente.

Las tiras de PNC que se usaron inmediatamente fueron bloqueadas una segunda vez por 5 minutos con la solución bloqueadora que contenía: TBS, con pH 7.5, 0.05% de tween 20** y 1% de gelatina. La solución bloqueadora también se utilizó para prevenir reacciones inespecíficas y como diluyente de los sueros y conjugados usados en este estudio.

Se preparó una solución con TBS y 0.05% tween 20, para lavar los anticuerpos y conjugados que no se unieron durante los pasos previos, y se usó después de cada periodo de incubación de los sueros y conjugados.

Los sueros y conjugados se incubaron a temperatura ambiente bajo el siguiente orden:

a) Los sueros problema se diluyeron 1:1000 y se incubaron por 1 hora.

b) Después de enjuagar con la solución lavadora se añadió un conjugado biotinilado hecho en cabra contra la IgG de cerdo,*** a una dilución de 1:1000, y se incubó por 30 minutos.

c) Posteriormente se añadió estreptoavidin-peroxidasa*** a una dilución de 1:500, la cual fue incubada por 30 minutos.

El sustrato usado fue de 4-cloro-naftol** más metanol y peróxido de hidrógeno al 30% en TBS.

El sustrato se dejó incubar 3 minutos y el resultado fue considerado positivo cuando apareció una coloración azul oscuro, y negativo cuando el PNC permaneció blanco.

La prueba se realizó 3 veces en cada uno de los sueros para observar su reproducibilidad.

Los resultados de la inspección sanitaria *post mortem* se utilizaron para constatar los obtenidos por la prueba de inmunodot; ambos fueron comparados estadísticamente con la prueba de Ji-cuadrada¹⁴ al 0.05 nivel de significancia, para probar la hipótesis de no diferencia entre los métodos de diagnóstico de cerdos con presencia o ausencia de cisticercosis.

Resultados

Para determinar la sensibilidad inmunológica y la concentración adecuada de antígeno que se usó en este estudio, primero se especificó, mediante el método de Bradford, la concentración total de proteína del antígeno que fue de 8 mg/ml. De este antígeno en TBS se realizaron las siguientes diluciones: antígeno sin diluir, 1:5, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000.

La reacción fue positiva en todas, excepto en la dilución 1:10000; la reacción en las diluciones 1:1000 y en 1:100 fue débil, pero la dilución 1:10 fue la que ofreció mejores resultados, de tal manera que se escogió para este estudio, ya que la dilución 1:5 y la del antígeno sin diluir dieron muchas reacciones falsas positivas. La sensi-

* Applied Scientific Co., San Francisco, CA. USA.

** Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. USA.

*** Zymed Chemical Co., St. Louis, MO. USA.

bilidad inmunológica fue excelente, ya que el antígeno se detectó a nivel de microgramos al observarse reacción positiva a la dilución 1:1000 (Cuadro 1).

Cuadro 1
DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD INMUNOLOGICA EN UNA TIRA DE PAPEL DE NITROCELULOSA

Dilución del antígeno	Reacción
Sin diluir 8 mg/ml	Positiva
1:5	Positiva
1:10*	Positiva
1:100	Débil positiva
1:1000	Débil positiva
1:10000	Negativa

*Esta fue la dilución que se usó durante la prueba de avidina-biotina.

La especificidad inmunológica se determinó observando la reacción de los 131 sueros usados en este estudio con cada uno de los siguientes antígenos: *C. cellulosae*, *T. solium*, *C.E. granulosus*, *Toxoplasma gondii* y *E. histolytica*. Los resultados fueron: *C. cellulosae*, 94 negativos, 31 positivos (3 falsos negativos y 3 falsos positivos); *T. solium*, 131 negativos y 0 positivos; *C. E. granulosus*, 20 positivos y 111 negativos; *T. gondii*, 0 positivos y 131 negativos; *E. histolytica*, 0 positivos y 131 negativos (Cuadro 2).

Cuadro 2
DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD INMUNOLOGICA DE LA PRUEBA DE INMUNODOT, USANDO TIRAS DE PAPEL DE NITROCELULOSA PREPARADAS CON DIFERENTES ANTIGENOS

Antígeno	Reacción		Total
	Positiva	Negativa	
<i>C. cellulosae</i>	34*	97*	131
<i>T. solium</i>	0	131	131
<i>Toxoplasma gondii</i>	0	131	131
<i>E. histolytica</i>	0	131	131
<i>E. granulosus</i>	20	111	131

* Tres muestras fueron falsos negativos y tres falsos positivos.

Los resultados de la inspección sanitaria *post mortem* en 131 cerdos sacrificados fueron: 34 cerdos positivos a cisticercosis y 97 negativos.

Los sueros de estos cerdos sacrificados fueron utilizados en la prueba de inmunodot, y los resultados fueron clasificados como sigue: 31 fueron positivos y 94 negativos, se encontraron 3 sueros falsos negativos y 3 falsos positivos (Cuadro 3).

La sensibilidad y la especificidad epidemiológica determinados fueron: 91.17 % y 96.9 %, respectivamente. La concordancia entre la inspección sanitaria *post mortem* y la prueba de inmunodot fue de 95.4 %. La reproducibilidad de la prueba se obtuvo realizándola 3 veces en los 131 sueros; es decir, se efectuaron 393 pruebas, con los mismos resultados.

Las tiras de PNC preparadas 12 meses antes dieron reacciones similares a las preparadas el mismo día, usando los mismos sueros.

Discusión

La sensibilidad inmunológica obtenida aquí fue similar a la descrita por otros autores en pruebas de ligadura inmunoenzimática,^{8,12,15} la especificidad inmunológica fue un poco diferente a la descrita por Lozoya, quien obtuvo reacciones cruzadas con el antígeno de *T. solium* usando sueros de origen humano; sin embargo, en este estudio no hubo reacciones cruzadas de los sueros porcinos con el antígeno de *Taenia solium*, pero 20 sueros porcinos que reaccionaron en forma positiva al antígeno de *C. cellulosae*, reaccionaron con el antígeno de *C. E. granulosus*, lo que indica que los antígenos tienen epitopos similares, o simplemente son reacciones falsas positivas; sin embargo, en el estudio realizado por Lozoya¹⁵ sólo dos sueros reaccionaron en forma positiva a *C. E. granulosus*, usando sueros provenientes de pacientes humanos.

Es indudable que la inspección sanitaria *post mortem* es la mejor forma de diagnosticar cerdos cisticercosos; sin embargo, esta parasitosis sólo puede ser detectada al momento del sacrificio (demasiado tarde para establecer medidas preventivas o tratamiento).

En contraste, la prueba de inmunodot utilizada en este estudio demostró poseer buenas características inmunológicas y epidemiológicas, y su concordancia con la inspección sanitaria *post mortem* en la detección de cerdos con cisticercosis fue de 95.4 %; además puede ser preparada en laboratorios del país con poca infraestructura, como los que hay en la provincia, y utilizada en animales vivos para detección y control oportuno.

Cuadro 3
COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE LA INSPECCION SANITARIA (IS) Y LA PRUEBA DE INMUNODOT (IMD) EN 131 SUEROS DE CERDOS SACRIFICADOS, UTILIZANDO COMO ANTIGENO *C. cellulosae* SOBRE TIRAS DE PAPEL DE NITROCELULOSA, EN LA DETECCION DE CERDOS CON PRESENCIA O AUSENCIA DE CISTICERCOSIS

Prueba Método	Reacción				Total
	Positivo	Falso positivo	Negativo	Falso negativo	
IS	34	0	97	0	131
IMD	31	3	94	3	131

Agradecimientos

Se agradece al doctor Carlos Larralde, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, la donación de los sueros testigo positivos utilizados en este estudio.

Referencias

1. Acevedo HA. Economic impact of porcine cysticercosis. In: Flisser A, Kaethe W, Lacleste JP, Larralde C, editors. Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. New York: Academic Press, 1982:63-67.
2. Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. 3a ed. México (DF): Limusa, 1984.
3. Flisser A. Cysticercosis a major threat to human health and livestock production. Rep F Tec 1985;39:61-65.
4. Flisser A, Plancarte A, Espinoza E. The immunostatus of patients with cysticercosis. Afr J Clin Immunol 1982; 3:183-187.
5. Kagan IG, Norman E. Serodiagnosis of parasitic disease. In: Lennete EH, Hauseler WJ, editors. Manual of clinical microbiology. Washington (DC): Am Soc Microbiol 1980:724-750.
6. Lombardo L, Vasconcelos D. Tratamiento de la cisticercosis del sistema nervioso. Rev Med IMSS 1983;21:138-139.
7. Arambulo P, Walls K, Bullock S. Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). Acta Trop 1978;35:63-67.
8. Woodhouse E. Seroepidemiology of human cysticercosis in Mexico. In: Flisser A, Kaethe W, Lacleste JP, Larralde C, editors. Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. New York: Academic Press, 1982:11-23.
9. Espinoza B, Flisser A, Plancarte A. Immunodiagnosis of human cysticercosis; ELISA and immunoelectrophoresis. In: Flisser A, Lacleste JP, Larralde C, editors. Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. New York: Academic Press, 1982:163-170.
10. Plancarte A, Espinoza B, Flisser A. Immunodiagnosis of human cysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. Child's Nerv Syst 1987;30:203-208.
11. Ruiz EJ. Detección de anticuerpos contra *Cysticercus cellulosae* mediante la utilización del ensayo inmunoenzimático (ELISA) en sueros de la población humana de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAT (tesis de licenciatura). Ciudad Victoria (Tamaulipas) México: Univ Aut Tamaulipas, 1988.
12. Lozoya ChFJ. Desarrollo de una prueba de inmunodot para el serodiagnóstico de la cisticercosis humana (tesis de licenciatura). Ciudad Victoria (Tamaulipas) México: Univ Aut Tamaulipas, 1990.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. J Biochem 1976;72:143-151.
14. Remington RD, Schork MA. Statistics with applications to the biological and health sciences. 5th ed. Englewood, New Jersey: Prentice-Hall, 1970.
15. Infante MF, Jasper DE. Development of immunobinding test for *Mycoplasma bovis* in milk. Can J Vet Res 1990;54:251-255.