

62
2e



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA Chlamydia psittaci EN OVINOS DEL CENTRO OVINO DEL PROGRAMA DE EXTENSION AGROPECUARIA (COPEA), MEDIANTE UNA PRUEBA INDIRECTA DE ELISA.

T E S I S

Que para obtener el Título de MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

presenta

CRISTINA ESCALANTE OCHOA



Asesores:
M.V.Z. Ph.D. Jorge A. Pérez Martínez
M.V.Z. Jesús Romero Martínez

MEXICO, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
MATERIAL Y METODOS.....	10
RESULTADOS.....	17
DISCUSION.....	20
LITERATURA CITADA.....	24
CUADROS.....	29
FIGURAS.....	35

C U A D R O S Y F I G U R A S .

	<u>Página</u>
Cuadro No. 1. Composición de la solución buffer de bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.6 - (Coating buffer).....	29
Cuadro No. 2. Composición de la solución buffer de ELISA.....	30
Cuadro No. 3. Composición de la solución de lavado (PBS-Tween 20).....	31
Cuadro No. 4. Composición de la solución del subtrato en buffer de ácido cítrico fosfatado.....	32
Cuadro No. 5. Valores obtenidos en la repetición - de la prueba de ELISA, utilizando el antígeno particulado (cepa B577 de - <u>C. psittaci</u>).....	33
Cuadro No. 6. Tabla de contingencia 2 X 2 a partir de la cual se obtuvo el valor de - "fi" (ϕ).	34
Fig. 1. Diagrama de placa para estandarizar la dilución óptima del conjugado (titulación)...	35
Fig. 2. Diagrama de placa para estandarizar dilución óptima del antígeno soluble (titulación).....	36
Fig. 3. Esquema de la preparación de las placas - previo a la aplicación de las muestras....	37

Fig. 4. Titulación de conjugado de peroxidasa anti IgG (H + L) de ovino, utilizando OPD como sustrato..... 38

Fig. 5a. Titulación de Ag. soluble de C. psittaci, utilizando sueros de referencia positivo y negativo (ovino), un conjugado de peroxidasa anti IgG de ovino, y OPD como sustrato..... 39

Fig. 5b. Titulación de Ag. soluble de C. psittaci, utilizando sueros de referencia positivo y negativo (ovino), un conjugado de peroxidasa anti IgG de ovino, y OPD como sustrato..... 40

Fig. 6. Sueros de ovinos sin antecedente de aborto probados con Ag. particulado de C. psittaci en ELISA..... 41

Fig. 7. Sueros de ovinos sin antecedente de aborto probados con Ag. soluble de C. psittaci en ELISA..... 42

R E S U M E N

ESCALANTE OCHOA CRISTINA. Determinación de anticuerpos contra Chlamydia psittaci en ovinos del Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria (COPEA), mediante una prueba indirecta de ELISA (bajo la dirección de: Jorge A. Pérez Martínez y Jesús Romero Martínez).

En México no existen reportes acerca del Aborto Enzótico Ovíno (AEO), enfermedad distribuida ampliamente dentro de la ovicultura, por lo que fue establecida una prueba de diagnóstico indirecto para la identificación de reactores seropositivos. Fueron analizados 529 sueros de ovinos, procedentes de COPEA-FMVZ-UNAM, para detectar la presencia de anticuerpos contra Chlamydia psittaci, usando una prueba inmunoenzimática (ELISA). El 100% de las muestras se examinó utilizando un antígeno particulado (cepa B577 de C. psittaci), mientras que también se analizó un 46.31% (245 sueros) elegido al azar con un antígeno soluble (cepa 1074 de C. psittaci). Se estandarizaron las diluciones óptimas de trabajo del antígeno soluble (positivo y negativo), del conjugado, de los sueros testigo (positivo y negativo) a utilizar, así como de los sueros a examinar, encontrándose éstas en 1/50 para el antígeno, 1/3500 para el conjugado y 1/200 para los sueros testigo y los sueros problema. De los sueros probados con el antígeno particulado, 215 muestras (40.46%) fueron encontradas seropositivas; mientras que en aquellas analizadas con el antígeno soluble se encontraron 121 reactores seropositivos (49.38%). Sin embargo, la curva de distribución de frecuencias de los

valores seronegativos obtenidos al utilizar el antígeno particulado, sugiere la posibilidad de que el alto porcentaje de reactores seropositivos se deba a infecciones intestinales subclínicas persistentes, y no necesariamente a la presencia del AEO. Se obtuvo una reproducibilidad para la prueba de por lo menos el 75%. La prueba de ELISA es un método sensible y rápido que puede ser de gran valor epidemiológico y diagnóstico para detectar la exposición de los ovinos a Chlamydia psittaci.

I N T R O D U C C I O N

El aborto enzootico ovino (AEO) es una de las principales causas de aborto en ovinos y caprinos en diversos países. El agente etiológico de esta enfermedad, Chlamydia psittaci, fue identificado por primera vez por Stamp et al. en Escocia en 1950 (23, 28, 31).

El tipo de aborto ovino del que Stamp et al. aislaron por vez primera a las clamidias ha sido reconocido en Alemania Democrática y en Alemania Federal; en Francia; en Gran Bretaña, donde constituye la fetopatía ovina diagnosticada con mayor frecuencia (20% del total de abortos); en los países balcánicos de Europa Oriental (en Grecia fue identificado a partir de 1986); en Nor Africa; en Sudáfrica (reconocido hasta 1972 durante un brote epizootico de abortos), y en E.U.A., reconocido por Young et al. en 1958 (4, 10, 23, 31). En Italia existe una alta incidencia de animales seropositivos en diversas partes del país (1). En México no existen reportes al respecto.

Probablemente esta enfermedad se presenta en todos los países en los que se ha desarrollado la industria ovina. Las áreas endémicas conocidas incluyen: Argelia, Túnez, Nigeria, Sudáfrica, algunos países de Sudamérica, Inglaterra, Islandia, Noruega, Pakistán, India, Nueva Zelanda y E.U.A. (5, 15).

El género Chlamydia sólo comprende a dos especies de bacterias de vida intracelular obligada: C. trachomatis y C. psittaci. Clamidirosis es el término genérico para denomi-

nar un número de enfermedades causadas por C. psittaci (2, - 13, 19, 22, 23).

C. psittaci presenta un gran número de cepas, así como un amplio rango de huéspedes potenciales. Spears y Storz determinaron 8 biotipos; posteriormente fueron identificados 9 serovares (19, 29).

Gracias a diversas investigaciones sobre este microorganismo, actualmente se conocen las especies animales susceptibles, mismas que son: aves psitacinas, palomas, patos, pavos, ovinos, caprinos, bovinos, equinos, felinos, algunos roedores, tejones, koalas, focas y ranas (2, 5, 8, 11, 18, 20).

Las cepas de clamidias aisladas de procesos abortivos en bovinos, ovinos y caprinos, pertenecen al serovar 1. Este serovar también se ha asociado a la presentación de neumonías en corderos, infecciones genitales, e infecciones intestinales subclínicas persistentes en las especies mencionadas (5, 18, 20, 23).

Las alteraciones reproductivas en el ovino debidas a la infección por Chlamydia son: mortinatos, corderos débiles al nacimiento y abortos. La incidencia de los abortos puede ascender a un 33% en rebaños de primosexposición (1, 18, 34). Cuando la enfermedad es enzootica en el rebaño, el rango de presentación de abortos puede ser del 1% al 5% en años sucesivos a la primosexposición. La expulsión del feto puede ocurrir en borregos de cualquier edad, pero cabe mencionar que se observa con mayor frecuencia en animales jóvenes (menores de 2 años de edad). Generalmente no se presentan cam -

bios específicos en el feto abortado (17, 18).

La forma de transmisión de C. psittaci no se ha confirmado en infecciones naturales. Probablemente la vía de entrada sea a través de la ingestión o inhalación de partículas infecciosas localizadas en las heces, orina, o descargas oculares de animales infectados. La transmisión venérea ha sido postulada, pero en este caso conduce a la infertilidad y no al aborto, quizá debido a que la multiplicación del agente en las células endometriales altera el medio ambiente del embrión ocasionando su muerte temprana (reabsorción) (1, 2, 18, 21).

En los rumiantes, el intestino parece ser un hábitat natural para algunas cepas, desarrollándose así infecciones subclínicas persistentes, comunes en bovinos, ovinos y caprinos. Estos animales portadores representan un modo importante de transmisión y perpetuación de las clamidias. Sin embargo, no se sabe si esto sucede con todas las cepas de C. psittaci en el ganado. C. psittaci puede sobrevivir en las heces por meses, dado que es resistente a la desecación y a la acción de enzimas proteolíticas (18, 20, 23, 26).

Las aves no parecen representar un importante papel en la transmisión a los rumiantes, debido a que las cepas que afectan a las primeras son antigénicamente diferentes a aquellas que afectan a los últimos. Por otra parte, C. psittaci tiene relativamente poca especificidad de huésped en los mamíferos, y la transmisión entre especies no relacionadas puede ocurrir.

Se ha considerado la existencia de vectores (garrapatas, insectos y arácnidos asociados a la ganadería y a la avicultura) (1, 2, 18, 20, 23).

La habilidad de establecer infecciones uterinas, en placenta y feto, es una propiedad de varias cepas clamidiales - en diversas especies animales, independientemente del tipo de placentación. Se requiere de una clamidemia secundaria, - posterior a una multiplicación bacteriana en órganos somáticos, durante la cual el microorganismo alcanza la unión placentaria. Existe predilección por el epitelio coriónico de la región hiliar de los placentomas. La infección de los órganos fetales se da por una invasión clamidial en la circulación fetal.

En el ganado ovino se presenta fiebre uno o dos días posteriores a la exposición inicial, pero no existen otros signos de infección hasta que ocurre el aborto. De igual forma, en el ganado bovino no se ha observado signo alguno que preceda al aborto cuando la infección ha sido en forma natural; sin embargo, cuando ha sido inoculado experimentalmente, llega observarse fiebre y leucopenia de 3 a 5 días posteriores a la inoculación, y en algunos animales también se presenta anorexia, diarrea intermitente y descargas vulvares mucosas (20).

Los diferentes factores por los que se da el aborto no están bien entendidos; sin embargo, se postula que el desarrollo de placentitis e infección generalizada del feto pudieran desencadenar el proceso de expulsión fetal (18, 20,-

27, 31, 32).

Las infecciones en el periodo perinatal se manifiestan en la siguiente gestación de algunas borregas. Esto indica que las ovejas pueden estar infectadas antes del empadre, probablemente desde su propio periodo perinatal (12, 34).

Así pues, los signos clínicos de las enfermedades causadas por C. psittaci no son suficientes para determinar un diagnóstico. La observación directa del agente en tejidos infectados representa un método diagnóstico relativamente rápido; sin embargo, su utilidad se restringe a preparaciones de citología exfoliativa a partir de tejido placentario, que no siempre está disponible. Se han desarrollado métodos de cultivo celular para el aislamiento de la bacteria a partir de muestras clínicas, pero relativamente pocos laboratorios los realizan (17). Así mismo, se conoce que estos agentes patógenos fastidiosos causantes de infecciones placentarias y fetales, son difíciles de aislar en el momento del aborto o en animales recién nacidos, debido a que son rápidamente inactivados durante los procesos intrauterinos que conducen al aborto y mueren antes de la expulsión de la placenta y el feto (30, 31).

Por las razones anteriormente descritas, el diagnóstico de infecciones por C. psittaci en bovinos, ovinos y caprinos, se basa fundamentalmente en procedimientos serológicos, como son la prueba de fijación de complemento (FC) y técnicas inmunoenzimáticas (ELISA). La FC convencional es un procedimiento útil para el diagnóstico de enfermedades clamidiales-

con una fase sistémica de infección, pero no pueden detectarse todos los isotipos de inmunoglobulinas (Ig). Así entonces, esta prueba probablemente no detecte infecciones clamidiales localizadas en membranas mucosas, debido a que éstas provocan una baja respuesta humoral.

La aplicación de otros métodos modernos, como son la inmunofluorescencia, la técnica inmunoenzimática (ELISA) o el radioinmunoensayo, han tenido un significativo avance en el diagnóstico de infecciones clamidiales en el humano, las aves, los animales de laboratorio, así como recientemente en bovinos, ovinos y caprinos (16, 17, 21, 33).

La prueba de ELISA presenta una mayor sensibilidad que la prueba de FC, y permite eliminar las interpretaciones subjetivas inherentes a los procedimientos de inmunofluorescencia al proporcionar valores espectrofotométricos objetivos (17, 18, 20).

La relativa simplicidad de la prueba de ELISA y el hecho de que puedan ser analizados varios sueros simultáneamente, aunado a lo anteriormente escrito, colocan dicha prueba como el método de diagnóstico a elegir en estudios epidemiológicos del AEO.

Hipótesis.

Debido a la amplia distribución geográfica de C. psittaci, a la diversidad de especies susceptibles y al hecho de que en COPEA, como en todo el país, se han introducido animales procedentes del extranjero, se espera encontrar un alto-

nivel de reactores seropositivos, mediante la aplicación de una prueba indirecta de ELISA.

Objetivos.

1. Montar prueba indirecta de ELISA.
 - Establecer dilución de trabajo de:
 - a) Antígeno positivo.
 - b) Antígeno negativo.
 - c) Suero positivo testigo.
 - d) Suero negativo testigo.
 - e) Sueros problema.
2. Probar 500 sueros provenientes de animales de COPEA con la prueba de ELISA, utilizando un antígeno particulado (cepa B577).
3. Probar un número significativo (200-250) de los mismos sueros con un antígeno soluble (cepa 1074).
4. Evaluar comparativamente la eficacia de uno y otro antígeno en cuanto a su capacidad para detectar animales seroreactores positivos.
5. Determinar la prevalencia de animales con niveles significativos de anticuerpos específicos contra C. psittaci.
6. Con base en los resultados obtenidos, tratar de elaborar conclusiones en cuanto a la posibilidad de que exista el aborto enzootico ovino en COPEA-FMVZ-UNAM.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Sueros a analizar.

Se analizaron 529 sueros provenientes del hato ovino del Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria (COPEA-FMVZ-UNAM), mismos que fueron mantenidos a -20°C en viales independientes e identificados hasta el momento de su utilización, y aún después de la misma.

Técnica de ELISA.

Sueros Testigo.

Se utilizaron sueros de referencia positivos y negativos a la presencia de anticuerpos específicos contra Chlamydia psittaci: un coctel de sueros obtenidos de varias borregas que presentaron aborto enzótico y 5 sueros individuales de borregas de hatos libres de la infección, respectivamente, donados por el Dr. M. Dawson del Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario, Weybridge, Inglaterra. La dilución óptima de trabajo se determinó durante la estandarización de la prueba.

Antígeno Particulado.

Como antígeno positivo se empleó una suspensión de cuerpos elementales de la cepa B577 de C. psittaci, obtenida mediante cultivo de células "L" persistentemente infectadas, tratadas con un proceso de centrifugación diferencial y solución amortiguadora de fosfatos (16, 21). Como antígeno negati

vo se emplearon monoestratos de células "L" no infectadas, -
tratadas de la misma forma. Ambos antígenos fueron donados -
por el Dr. Jorge A. Pérez Martínez del Laboratorio de Bacte-
riología y Micología, FMVZ-UNAM, México. Dichos antígenos -
fueron utilizados en una dilución 1/200, dilución óptima de
trabajo establecida en estudios previamente realizados¹.

Antígeno Soluble.

Fueron utilizados un antígeno positivo y un antígeno ne-
gativo, donados por el Dr. M. Dawson del Laboratorio Central
de Diagnóstico Veterinario, Weybridge, Inglaterra. El antige-
no positivo consistió en un extracto obtenido con deoxicolato
de sodio a partir de una suspensión de cuerpos elementa -
les de la cepa de referencia 1074 propagada en células "L" e
inactivada a 56°C durante 1 hora. El antígeno negativo con -
sistió en un extracto similar obtenido de cultivos celulares
no infectados². La dilución óptima de ambos antígenos fue de
terminada durante la estandarización de la prueba.

Conjugado.

Se utilizó un conjugado antiinmunoglobulina G (cadenas -
pesadas y ligeras) de ovino, marcado con peroxidasa (Lab. -
Dakko). El conjugado fue diluido 1:2 en glicerol y conserva-
do a -20°C durante todo el tiempo que duró el estudio. Su di-
lución óptima de trabajo se estableció durante la estandari-
zación de la prueba.

^{1, 2} Pérez Martínez, J.A. Comunicación personal 1988.

Estandarización de la prueba.

Conjugado.

El conjugado fue titulado mediante un esquema de ajedrez en una prueba directa utilizando como antígeno un suero de bovino rico en IgG. Se realizaron diluciones dobles del antígeno desde 1/100 hasta 1/102,400 en una solución amortiguadora de bicarbonato de sodio 0.1 M pH 9.6 (Coating buffer) (Cuadro No. 1), con la que se sensibilizó una placa para prueba de ELISA (Immulon I, fondo plano, Dynatech). Las diluciones fueron aplicadas a los pozos de la placa (100 µl/pozo) en orden de mayor a menor concentración de izquierda a derecha (dirección 1 → 12, Fig. 1), seguido de una incubación durante 2 horas a 37°C.

Se realizaron diluciones dobles del conjugado desde 1/400 hasta 1/51,200 en una solución amortiguadora de ELISA (sol. buffer de ELISA) (Cuadro No. 2) pH 7.4 adicionada con 0.1% de Tween 20. Dichas diluciones fueron aplicadas a la placa (100 µl/pozo), previamente lavada 3 veces con una solución fosfatada adicionada con 0.05% de Tween 20 (PBS-Tween 20) (Cuadro No. 3), en orden de mayor a menor concentración de arriba hacia abajo (dirección A → H, Fig. 1). La placa fue incubada durante 1 hora a 37°C, tras lo cual fue nuevamente lavada 3 veces con la solución PBS-Tween 20 (5 minutos por lavado). Posteriormente se le agregaron 100 µl/pozo de la solución del sustrato (ortofenilendiamina, OPD) en una solución amortiguadora de ácido cítrico de pH 4.25 (buffer de ácido cítrico) (Cuadro No. 4) conteniendo 40 µl de peróxido

do de hidrógeno (H_2O_2) al 30% por cada 100 ml de solución, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos protegida de la luz. La reacción enzimática fue detenida añadiendo 100 μ l/pozo de una solución al 8.4% (v/v) de ácido clorhídrico.

La absorbancia (densidad óptica) fue medida en un lector Dyantech modelo minireader II, utilizando un filtro de 490 nm.

Antígeno Soluble.

Para la titulación del antígeno se utilizó un esquema de tablero de ajedrez en una prueba indirecta con el fin de estandarizar al mismo tiempo la dilución óptima de trabajo de los sueros a utilizar.

Se realizaron diluciones dobles del antígeno soluble de 1/20 hasta 1/640 en una solución amortiguadora de bicarbonato de sodio 0.1 M pH 9.6 (Coating buffer), con las que fue sensibilizada una placa para prueba de ELISA. Las diluciones fueron aplicadas a los pozos de la placa (100 μ l/pozo) en orden de mayor a menor concentración de izquierda a derecha (dirección 1 \rightarrow 12, Fig. 2), seguido de una incubación durante 2 horas a 37°C.

De los sueros testigo de referencia positivo (coctel "RVC") y negativo (suero 384), se realizaron diluciones dobles desde 1/50 hasta 1/400, en una solución buffer de ELISA pH 7.4 adicionado con 0.1% de Tween 20. Estas diluciones fueron agregadas a la placa, previamente lavada 3 veces con la

solución PBS-Tween 20 (5 minutos/lavado), en orden de mayor a menor concentración de arriba hacia abajo (dirección A→H, Fig. 2). Se aplicaron 100 µl/pozo. En primer término se agregó el suero positivo (A-D), y en segundo término el suero negativo (E-H). La placa fue incubada durante una hora a 37°C.

Después de 3 lavados con la solución PBS-Tween 20, se les agregó a cada uno de los pozos de la placa 100 µl del conjugado (dilución 1/3,500) diluido en buffer de ELISA con 0.1% de Tween 20, y se incubó nuevamente durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se lavó la placa 3 veces con la solución PBS-Tween 20 (5 minutos/lavado), se le agregaron 100 µl por pozo de la solución del sustrato OPD en buffer de ácido cítrico de pH 4.5 conteniendo 40 µl de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% por cada 100 ml de buffer, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos protegida de la luz. La reacción enzimática fue detenida añadiendo 100 µl/pozo de la solución al 8.4% de ácido clorhídrico.

La absorbancia fue medida en el lector Dynatech, utilizando un filtro de 490 nm.

Procedimiento de la prueba de ELISA.

Se sensibilizaron las placas a utilizarse, tanto para el antígeno particulado como para el antígeno soluble, con las diluciones óptimas, previamente estandarizadas (1/200 y 1/50 respectivamente). Las diluciones se realizaron en buffer de bicarbonato de sodio 0.1 M pH 9.6 (Coating buffer). Se incubaron durante 2 horas a 37°C. En cada placa se fijó el anti-

geno positivo (hileras A-B y E-F) y el antígeno negativo (hileras C-D y G-H); en la columna No. 1 se dispusieron los testigos de la prueba, tal como se muestra en la Fig. 3, con el fin de monitorear la fidelidad de la prueba, así como de deteccionar posibles reacciones inespecíficas o contaminantes que pudieran alterar los resultados de la misma. Las placas fueron lavadas 3 veces con la solución PBS-Tween 20 (5 minutos por lavado) y mantenidas a -20°C hasta el momento de su utilización.

Todos los sueros fueron diluidos 1/200 (óptima dilución-estandarizada) en un buffer de ELISA de pH 7.4 con 0.1% de Tween 20. Se agregaron 100 μl /pozo, y se incubaron las pla-cas durante 1 hora a 37°C . Cada suero se probó por duplicado (Fig. 3).

Se incluyeron sueros testigo de referencia dentro de cada prueba; un suero positivo (coctel "RVC") en cada placa - (columna 2, A-D) y un suero negativo (suero 384) en la placa No. 1 de cada día en que se corrió la prueba (columna 2, E-H) (Fig. 3). Ambos sueros en una dilución 1/200 en buffer de ELISA con 0.1% de Tween 20.

Posterior a la incubación, las placas se lavaron 3 veces con la solución PBS-Tween 20. Se les agregaron 100 μl del -conjugado a cada pozo y se incubaron nuevamente durante 1 hora a 37°C . Tras efectuar 3 lavados con la solución PBS-Tween 20 se aplicó la solución del sustrato a las placas (100 μl -por pozo), se incubaron a temperatura ambiente durante 5 mi-nutos para las placas con antígeno particulado y durante 10-

minutos para las placas del antígeno soluble, protegidas de la luz. Se detuvo la reacción enzimática mediante la adición de la solución de ácido clorhídrico (100 µl/pozo).

La absorbancia fue medida en el lector Dynatech, mediante un filtro de 490 nm. Durante la lectura cada placa fue "blanqueada" individualmente con los pozos A-D de la columna No. 1, utilizando el lector mencionado.

El valor neto de cada suero fue obtenido restando la absorbancia promedio (n=2) obtenida con el antígeno negativo, de la absorbancia promedio (n=2) obtenida con el antígeno positivo, y los resultados fueron expresados como porcentaje del valor obtenido con el suero positivo de referencia.

El punto de corte entre los valores positivos y negativos se determinó calculando el promedio de los valores (en porcentaje) del suero negativo de referencia (n=12) más 2 desviaciones estándar. Con esto obtenemos el máximo punto (valor) de negatividad y el mínimo punto (valor) de positividad (3, 10, 25).

Para determinar el rango de variabilidad "inter-prueba" de la prueba de ELISA, se analizaron en 2 ocasiones las mismas diluciones de 20 sueros elegidos al azar con un intervalo de tiempo de 24 horas.

Del total de sueros muestreados, el 100% (529) se analizó utilizando el antígeno particulado, y el 46.31% (245) se analizó utilizando el antígeno soluble, con el fin de evaluar el segundo en relación al primero. Los sueros muestreados con el antígeno soluble fueron escogidos al azar.

R E S U L T A D O S

La dilución óptima del conjugado se determinó comparando los valores de absorbancia de las diferentes diluciones del antígeno utilizado (suero bovino rico en IgG) en relación a las diferentes diluciones del conjugado, localizándose en el punto donde el valor de densidad óptica fuese lo suficientemente elevado para obtener una adecuada reacción en la prueba, sin que se tuviesen problemas de saturación de la placa por exceso de conjugado que provocase valores de absorbancia demasiado altos y no medibles por el lector, ni tampoco valores muy bajos debidos a una insuficiente cantidad de conjugado en la reacción (Fig. 4).

De acuerdo a lo anterior, al efectuar la titulación del conjugado, se observó que los mejores valores se encontraban entre las diluciones 1/1,600 y 1/3,200, por lo que se decidió utilizar una dilución promedio siendo ésta de 1/2,400. Sin embargo, al dar comienzo al análisis de los sueros problema, este valor se ajustó a una dilución 1/3,500 con la que se obtuvo una mejor respuesta en la prueba serológica.

La dilución óptima del antígeno soluble se determinó comparando los valores de absorbancia de las diferentes diluciones de los sueros de referencia en relación a las diferentes diluciones del antígeno positivo, localizándose en el punto donde el valor de densidad óptica tuviese un valor elevado para el suero positivo de referencia y un valor bajo para el suero negativo de referencia (ambos a una misma dilu -

ción) (Figs. 5a y 5b).

Así pues, tras efectuar la titulación del antígeno soluble, se observó que los mejores valores, tanto para el suero positivo como para el suero negativo de referencia, se encontraban entre las diluciones 1/40 y 1/80 del antígeno cuando se utilizaban los sueros en diluciones 1/200, y aproximadamente en una dilución 1/100 del antígeno cuando se utilizaba una dilución 1/100 de los sueros. Debido a que no se observó una diferencia significativa de los valores obtenidos entre ambos juegos de diluciones, así como al hecho de que ya se tenía estandarizada la dilución de los sueros (1/200) para el antígeno particulado, se estableció la dilución óptima de trabajo del antígeno soluble en 1/50, utilizando los sueros en una dilución 1/200 (tanto para los de referencia como para los sueros "problema").

El punto de corte, a partir del cual fue considerada positiva una muestra de suero, se estableció en el caso del antígeno particulado cuando el valor de absorbancia de dicho suero correspondía al 25.49% del valor obtenido con el suero positivo de referencia (desviación estándar del suero negativo de referencia: 8.52%). En el caso del antígeno soluble, este parámetro se determinó en 0.00%, en virtud de que los sueros negativos de referencia nunca dieron un valor medible.

De las muestras analizadas con el antígeno particulado, se encontró un 40.64% (215 sueros) de reactores seropositivos, y un 59.35% (314 sueros) de reactores seronegativos (Fig. 6).

Se obtuvo una mayor sensibilidad de la prueba con el an-tígeno soluble, detectándose 49.38% (121 sueros) de reactores seropositivos y 50.61% (124 sueros) de reactores seronegativos (Fig. 7).

Los valores obtenidos de la repetición efectuada para determinar la variabilidad "inter-prueba" se muestran en el cuadro No. 5.

De acuerdo al valor de corte establecido mediante el suero negativo de referencia electo al azar que se utilizó en la realización de la prueba (suero 384), el resto de los sueros negativos de referencia (sueros 383, 385, 386 y 387) proporcionaron valores negativos.

Al analizar los valores obtenidos en las pruebas con el antígeno particulado y con el antígeno soluble (reactores seropositivos y seronegativos) mediante una prueba no paramétrica, coeficiente "fi" (ϕ) (7), no se encontró una correlación significativa entre ambos antígenos ($\phi = 0.35$) (Cuadro No. 6).

D I S C U S I O N

Se ha demostrado que usualmente pueden encontrarse reacciones falsas positivas en un rango del 1% al 2% en este tipo de prueba serológica. Esto puede deberse a contaminación del suero con bacterias u hongos, a factores de la dieta o a problemas por calentamiento del suero (3). Esto indica que probablemente un máximo de 4.3 sueros de los reactores seropositivos encontrados pudieran ser en realidad seronegativos.

Es claro, sin embargo, que un significativo número de animales (40.64%) ha estado en contacto con el microorganismo causante del AEO, Chlamydia psittaci. Si se considera que la cepa B577 utilizada para la elaboración del antígeno particulado está clasificada dentro del serovar 1 de C. psittaci, es posible que la presencia de anticuerpos en los animales se deba a la presencia de infecciones intestinales subclínicas persistentes, tal y como ha sido reportado en estudios previos (4, 5, 18, 20, 22, 23, 25), y no necesariamente a problemas de aborto enzótico ovino.

Los antígenos clamidiales se han agrupado de acuerdo a su especificidad por género, especie y serovar. El antígeno de grupo del género Chlamydia es el más conocido, siendo la substancia inmunodominante un lipopolisacárido ácido con residuos de KDO (cetodeoxioctarato o ácido deoxi-D-manosilósónico), que también se encuentra presente en algunas bacterias Gram negativas tales como Salmonella del quemotipo

rugoso Re y algunos serovares de Acinetobacter calcoaceticus variedad anitratus.

Por otro lado, los antígenos que confieren especificidad de especie y de serovar están representados principalmente por epítopes de una proteína principal de la membrana externa (porina) que en el caso de C. psittaci posee un peso molecular de aproximadamente 40.5 kilodaltones, y posiblemente por otros antígenos proteicos de superficie (5, 17, 22, 25).

El antígeno particulado utilizado en este estudio consistió en una suspensión de cuerpos elementales infectantes que conservaron íntegramente sus propiedades antigénicas naturales. Por el contrario, el antígeno soluble contenía básicamente al lipopolisacárido termoestable específico de género.

El incremento en la sensibilidad de la prueba al utilizar un antígeno soluble coincide con los resultados obtenidos por otros investigadores (24, 28). Lo anterior responde al hecho de que los anticuerpos se fijan con mayor facilidad al antígeno soluble (purificado del LPS de la pared de los CE) que a la Chlamydia viva (antígeno particulado) (28).

Sin embargo, es necesario expresar que al aumentar la sensibilidad de una prueba serológica disminuye su especificidad. Por lo tanto, acorde a las necesidades actuales en nuestro país para los estudios diagnósticos y epidemiológicos del AEO, resulta más conveniente obtener un mayor grado de especificidad en la prueba inmunoenzimática (ELISA) a pesar de que el grado de sensibilidad disminuya en la misma.

Los valores reales de sensibilidad y especificada co -

respondientes a la prueba de ELISA con uno y otro antígeno sólo pueden determinarse desmostrando el estado de infección o no infección en los animales estudiados. Esta es una tarea difícil de realizar dadas las dificultades inherentes al cultivo in vitro de C. psittaci. En un estudio previo, la prueba de ELISA con antígeno particulado mostró la capacidad de detectar una respuesta humoral en el 100% de un grupo de vacas gestantes que abortaron tras la inoculación experimental de C. psittaci a diferentes intervalos de gestación (17).

La reproducibilidad obtenida para esta prueba serológica fue del 75% (variabilidad inter-prueba igual al 25%). Se sabe que existen diversos factores que pueden influir en el desarrollo de la técnica, llegando a ocasionar variaciones en los resultados. Entre estos factores se encuentran: forma de conservación y tiempo de mantenimiento de los reactivos y/o sueros, diferencias de temperatura entre la placa y su contenido y el medio ambiente de incubación, fluctuaciones de temperatura ambiental, fluctuaciones de pH, labilidad de los reactivos, posibles errores en la medición de pesos y volúmenes, e incluso la formación de meniscos en los pozos de las placas que modifican los valores de densidad óptica (reducen el espacio por donde ha de pasar el haz de luz del lector) - (14, 35).

Así pues, tomando en cuenta los factores mencionados, es muy probable que la reproducibilidad de la prueba de ELISA - realizada, pueda mejorarse todavía más hasta lograr una reproducibilidad ideal del 90%.

Como un estudio complementario a la presente encuesta serológica se tiene contemplado intentar el aislamiento de C. psittaci a partir de heces fecales de animales con valores elevados en la prueba de ELISA, a fin de demostrar sin lugar a dudas la presencia del agente etiológico en la población animal estudiada.

El porcentaje de abortos que se reporta en el COPEA es muy bajo, de aproximadamente el 1% o incluso menos³. Con los resultados obtenidos mediante la presente encuesta serológica no es posible determinar si algunos de los abortos observados regularmente corresponden a problemas de AEO. Sin embargo, contamos ahora con una prueba serológica práctica y lo suficientemente confiable como para intentar establecer un diagnóstico serológico de casos de aborto midiendo la reacción de muestras pares obtenidas de un mismo animal al momento del aborto y en la fase convalescente (2 ó 3 semanas después).

³Ortiz Hernández, A. Comunicación personal, 1988.

L I T E R A T U R A C I T A D A

1. Andreani, E., Poli, A., Tolari, D., Cerr, R., Farina, R. and Bandecchi, P.: Experimental infection of sheep with Chlamydia psittaci. Br. Vet. J., 143: 221 (1987).
2. Bell, C.W. and Schroeder, B.A.: Isolation and identification of Chlamydia psittaci in New Zeland. N. Z. Vet. J., 34: 15-16 (1986).
3. Crowther, J.: ELISA manual. Edited by: The International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria (in press).
4. Dawson, M., Zoghoulou, A. and Willsmore, A.J.: Ovine enzootic abortion; Experimental studies of immune responses. Res. Vet. Sci., 40: 59-64 (1986).
5. Delgado, F.J.: Manual de enfermedades bacterianas de los ovinos. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., - 1987.
6. DeLong, W.J. and Magee, W.E.: Distinguishing between ovine abortion and ovine arthritis Chlamydia psittaci isolates with specific monoclonal antibodies. Am. J. Vet. Res. 47: 1520-1523 (1986).
7. Fleiss, J.L.: Statistical methods for rates and proportions, Wiley-Interscience publication, U.S.A., 1973.
8. Howerth, E.W.: Pathology of naturally occurring chlamydiasis on african clawed frogs (Xenopus laevis). Vet. Pathol., 21: 28-32 (1984).

9. Lemma, F., Everaere, S., Rougeot, C., Fuentes, V., Ezon, E., Dray, F. and Bussard, A.: ELISA for detection of human antibodies to Chlamydiae. J. Immun. M., 9: 153-156 - (1986).
10. Mastroyanni, M.: Enzootic abortion of sheep and goats - in Greece. In: Chlamydial diseases of ruminants. Edited by: Aitlre, I.D. and Mangana, O. Vet. Inst. Infect. Parasit. Dis. Min. Agric. Athens, Greece. Commission of the European Communities: 17-28 (1986).
11. McColl, K.A., Martin, R.W., Gleeson, L.J., Hadasyde, K. A. and Lee, A.K.: Chlamydia infection and infertility - in the female koala (Phascolarctos cinereus). Vet. Rec., 115: 655 (1984).
12. McEwen, A.D., Littlejohn, A. and Foggie, A.: Enzootic - abortion in ewes: Some aspects of infection and resis - tance. Vet. Rec., 63: 489-493 (1951).
13. McGuire-Rodgers, S.J. and Stair, E.L.: An outbreak of - ovine abortion in Oklahoma associated with the isolation of Chlamydia. Amer. Assn. Veterinary Laboratory Diagnos - ticians. 27th. Annual Proceedings, 169-170 (1984).
14. Moorhouse, P.D. and Hugh-Jones, M.E.: Serum banks. Vet. Bull., 51: 277-290 (1981).
15. Okoh, A.E.J.: Enzootic abortion of ewes in Nigeria: An - investigation into the naturally occurring disease in a research animal facility. Revue d'Elevage et de Medici - ne Veterinaire des Pays Tropicaux, 39: 181-184 (1986).

16. Pepin, M., Bailly, L., Souriau, A. and Rodolakis, A.: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of chlamydial antibodies in caprine sera. Ann. Rech. Vet., 16: 393-398 (1985).
17. Pérez-Martínez, J.A., Schmeer, J. and Storz, J.: Bovine-chlamydial abortion: Serodiagnosis by modified complement fixation and indirect inclusion fluorescence tests and enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res., 47: 1501-1506 (1986).
18. Pérez-Martínez, J.A. y N. Schmeer: Enfermedades causadas por clamidias. En: Enfermedades de los bovinos. Editado por: Medina Cruz, M. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM. México (en prensa).
19. Pérez-Martínez, J.A. and Storz, J.: Antigenic diversity of Chlamydia psittaci of mammalian origin determined by microimmunofluorescence. Infect. Immun., 50: 905-910 (1985).
20. Pérez-Martínez, J.A. and Storz, J.: Chlamydial infections in cattle. Part 1. Mod. Vet. Pract., 60: 517-522 (1985).
21. Pérez-Martínez, J.A. and Storz, J.: Chlamydial infections in cattle Part 2. Mod. Vet. Pract., 60: 603-608 (1985).
22. Pérez-Martínez, J.A. and Storz, J.: Persistent infection of L cells with an ovine abortion strain of Chlamydia psittaci. Infect. Immun., 50: 453-458 (1985).
23. Pienaar, J.G. and Schutte, A.P.: The occurrence and pathology of chlamydiosis in domestic and laboratory animals: A review. Onderstepoort J. Vet. Res., 42: 77-90 (1975).

24. Ruppanner, R., Behymer, D.E., DeLong, W.J., Frarti, C.E. and Schulz, T.: Enzyme immunoassay of Chlamydia in birds. Avian diseases, **28**: 608-615 (1984).
25. Schmeer, N., Pérez-Martínez, J.A., Schnorr, K. and Storz, J.: Dominance of Chlamydia psittaci-specific IgG₂ isotypes in naturally and experimentally infected cattle. Vet. Immunol. and Immunopathol., **15**: 311-422 (1987).
26. Seaman, J.T.: Chlamydia isolated from abortion in sheep. Austr. Vet. J., **62**: 12 (1985).
27. Shewen, P.E.: Chlamydial infection in animals: A review. Can. Vet. J., **21**: 2-11 (1980).
28. Souriau, A. and Rodolakis, A.: Rapid detection of Chlamydia psittaci in vaginal swabs of aborted ewes and goats by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Vet. Microb., **11**: 251-259 (1986).
29. Spears, P. and Storz, J.: Biotyping of Chlamydia psittaci based on inclusion morphology and response to diethylaminoethyl-dextran and cycloheximide. Infect. Immun., **24**: 224-232 (1979).
30. Storz, J., Call, J. and Miner, M.L.: Epizootic bovine abortion in the intermountain region. Some recent clinical, epidemiologic, and pathologic findings. Cornell Vet., **57**: 21-37 (1967).
31. Storz, J. and Krauss, H.: Chlamydia. In: Handbook of bacterial infections in animals. Edited by: Blovel, H. and Schliesser,., 447-531, Fisher Verlag Jena. East Germany, 1985.

32. Storz, J. and Spears, P.: Chlamydiales: Properties, cycle of development and effect on eukaryotic host cells. Current topics in Microb. and Immun., 76: 168-172 (1986).
33. Vittoz, J. et Edlinger, E.: Controle par test immuno-enzymatique de l'effet d'un vaccin antichlamydien chez les ovins. Acad. Vet. de France, 59: 99-103 (1986).
34. Willsmore, A.J., Parsons, V. and Dawson, M.: Experiments to demonstrate routes of transmission of ovine enzootic abortion. Br. Vet. J., 140: 380 (1984).
35. Wright, P.: Enzyme immunoassay: Observations on aspects of quality control. Memories of the First International Veterinary Immunology Symposium. Guelph, 1986 (In press).

CUADRO No. 1. Composición de la solución buffer de bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.6 - (Coating buffer).

Componente	Cantidad en la solución
Na_2CO_3	1.59 g
NaHCO_3	2.93 g
Thiomersal	0.2 g
Agua destilada	1 lt

CUADRO No. 2. Composición de la solución buffer de ELISA.

Solución A		Solución B	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
NaCl	8 g	NaCl	8 g
KCl	0.2 g	KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	358 g	KH ₂ PO ₄	1.302 g
Agua destilada	1 lt.	Agua dest.	1 lt.

* Agregar solución B a solución A hasta alcanzar un pH de 7.4.

CUADRO No. 3. Composición de la solución de lavado
(PBS-Tween 20).

Componente	Cantidad en la solución
NaCl	8.5 g
Na ₂ HPO ₄	1.1 g
NaH ₂ PO ₄	0.32 g
Agua destilada	1 lt
Tween 20	0.05%

CUADRO No. 4. Composición de la solución del sustrato en buffer de ácido cítrico fosfatado.

Componente	Cantidad en la solución
Acido cítrico	5.11 g
Na ₂ HPO ₄	9.15 g
Ortonitro-fenilendiamina (OPD)	0.4 g

CUADRO No. 5. Valores obtenidos en la repetición de la prueba de ELISA, utilizando el antígeno particulado (cepa B577 de C. psittaci)

No. Suero	Primera prueba		Segunda prueba	
	D.O.*	%	D.O.	%
1	0.72	68.57	0.82	74.54
2	0.51	48.57	0.46	41.81
3	0.17	16.19	0.19	17.27
4	0.27	25.71	0.15	13.63
5	0.12	11.42	0.14	12.72
6	0.18	17.14	0.26	23.63
7	0.01	00.95	0.15	13.63
8	0.61	58.09	0.37	33.63
9	0.38	36.19	0.45	40.90
10	0.13	12.38	0.14	12.72
11	0.53	50.47	0.23	20.90
12	0.09	8.57	0.07	6.36
13	0.08	7.61	0.14	12.72
14	0.05	4.76	0.21	19.09
15	0.42	40.0	0.28	25.45
16	0.24	22.85	0.22	20.0
17	0.35	33.33	0.21	19.09
18	0.56	53.33	0.51	46.36
19	0.43	40.95	0.75	68.18
20	0.00	0.0	0.86	78.18

* Densidad Óptica.

CUADRO No. 6. Tabla de contingencia 2 X 2 a partir de la cual se obtuvo el valor de "fi" (ϕ).

Antígeno Particulado	Antígeno Soluble		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	65	23	88
Negativo	57	95	152
Total	122	118	240

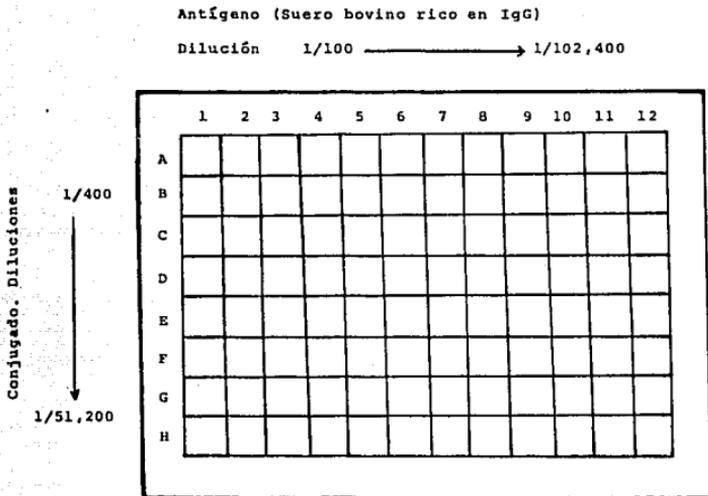
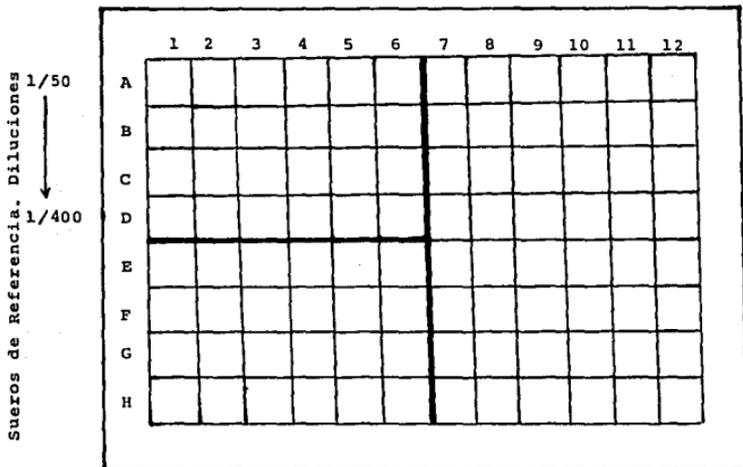


FIG. 1. Diagrama de placa para estandarizar la dilución óptima del conjugado (titulación).

Antígeno positivo.

Dilución 1/20 → 1/640



Suero positivo de referencia: Hileras A-D
Suero negativo de referencia: Hileras E-H

FIG. 2. Diagrama de placa para estandarizar dilución óptima del antígeno soluble (titulación).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													(1)
B													(2)
C													(3)
D													(4)
E													
F													
G													
H													

↑ ↑
Testigos.

- A1,B1: Ag. positivo + conjugado + substrato.
- C1,D1: Ag. negativo + conjugado + substrato.
- E1,F1: Suero rico en IgG + conjugado + substrato.
- G1 : Suero agamaglobulinémico + conjugado + substrato.
- H1 : Sólo conjugado + substrato.
- A1,B2: Ag. positivo + suero rico en IgG + conjugado + substrato.
- C2,D2: Ag. negativo + suero rico en IgG + conjugado + substrato.
- E2,F2: Ag. positivo + suero agamaglobulinémico + conjugado + substrato.
- G2,H2: Ag. negativo + suero agamaglobulinémico + conjugado + substrato.

Antígeno positivo: (1) y (3)
Antígeno negativo: (2) y (4)

FIG. 3. Esquema de la preparación de las placas previo a la aplicación de las muestras.

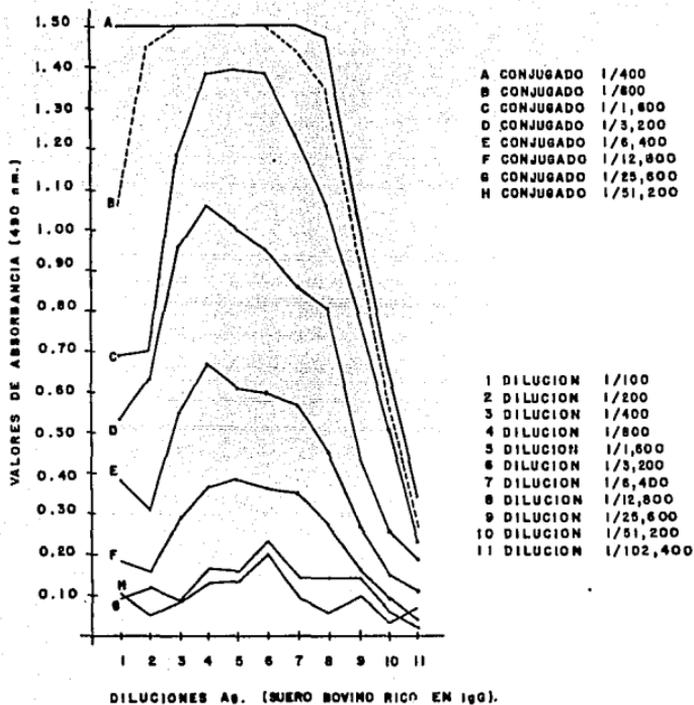


FIG. 4. TITULACION DE CONJUGADO DE PEROXIDASA ANTI 19S (H+L) DE OVINO, UTILIZANDO OPD COMO SUBSTRATO.

39 ESTA TESTS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

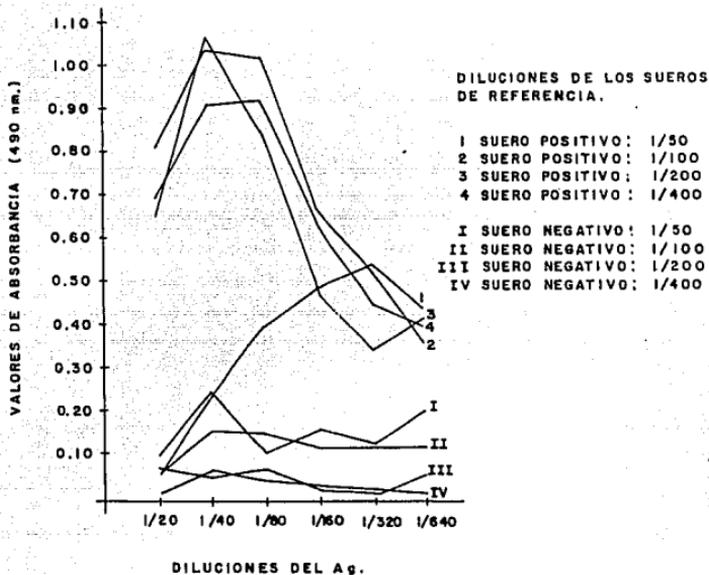


FIG. 5a. TITULACION DE Ag. SOLUBLE DE *G. PRITTAZI*, UTILIZANDO SUEROS DE REFERENCIA POSITIVO Y NEGATIVO (OVINO), UN CONJUGADO DE PEROXIDASA ANTI IgG DE OVINO, Y OPD COMO SUBSTRATO.

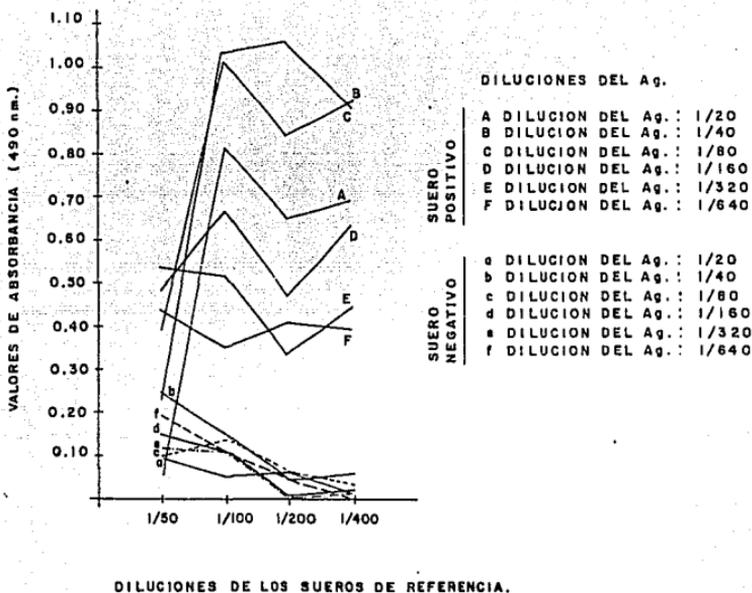


FIG. 5b. TITULACION DE Ag. SOLUBLE DE *C. PSITTACI*, UTILIZANDO SUEROS DE REFERENCIA POSITIVO Y NEGATIVO (OVINO), UN CONJUGADO DE PEROXIDASA ANTI IgG DE OVINO, Y OPD COMO SUBSTRATO.

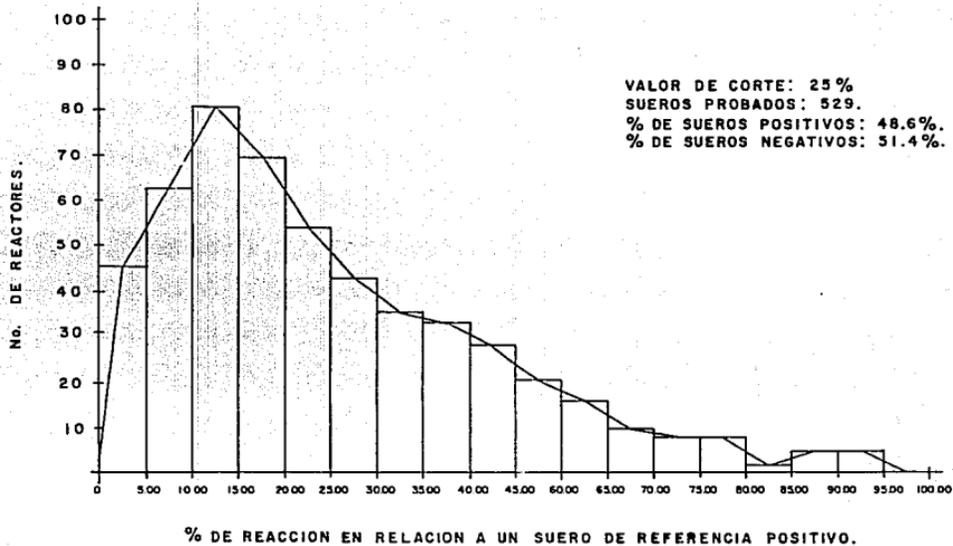


FIG. 6. SUROS DE OVINOS SIN ANTECEDENTE DE ABORTO PROBADOS CON A_g PARTICULADO DE C. PSITTACI EN ELISA.

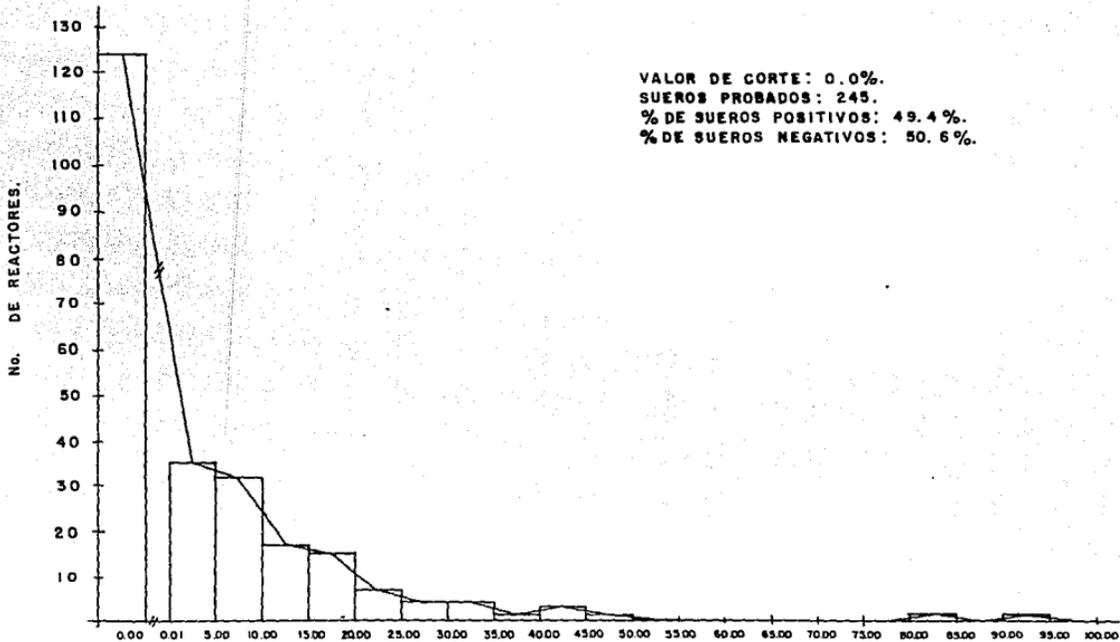


FIG. 7. SUEROS DE OVINOS SIN ANTECEDENTE DE ABORTO PROBADOS CON Ag. SOLUBLE DE C. PSITTACI EN ELISA.