

2003 A-2008A

398393013

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE INMUNODETECCIÓN ESPECÍFICA (ELISA
INDIRECTA) DE ANTICUERPOS CONTRA *Gallibacterium anatis* EN SUEROS DE
AVES *Gallus gallus*

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

GRISSEL ALEJANDRA LUNA GALAZ

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE INMUNODETECCIÓN ESPECÍFICA
(ELISA INDIRECTA) DE ANTICUERPOS CONTRA *Gallibacterium anatis* EN
SUEROS DE AVES *Gallus gallus***

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

GRISEL ALEJANDRA LUNA GALAZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA DEL ROCÍO LEÓN KEMPIS

ASESORES DE TESIS

DRA. GALINA PETROVNA ZAITSEVA

M.C. FRANCISCO ROBLES GONZÁLEZ



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
COMITÉ DE TITULACIÓN



COORD. BIOL. 018/2012

C. GRISEL ALEJANDRA LUNA GALAZ
P R E S E N T E

Manifiesto a usted, que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de Tesis e Informes opción Tesis, con el título "DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE INMUNODETECCIÓN ESPECÍFICA (ELISA INDIRECTA) DE ANTICUERPOS CONTRA *Gallibacterium anatis* EN SUEROS DE AVES *Gallus gallus*", para obtener la Licenciatura en Biología.

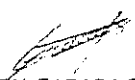
Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a la Dra. Maria del Rocio León Kempis y como asesores a la Dra. Galina Petrovna Zaitseva y al M.C. Francisco Robles González.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, 24 de enero de 2012.


DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



M. C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
Presidente del Comité de Titulación.
Licenciatura en Biología.
CUCBA.
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad de TESIS E INFORMES, opción Tesis con el título: "DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE INMUNODETECCIÓN ESPECÍFICA (ELISA INDIRECTA) DE ANTICUERPOS CONTRA *Gallibacterium anatis* EN SUEROS DE AVES *Gallus gallus*" que realizó el/la pasante **Grisel Alejandra Luna Galaz** con número de código **398393013** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

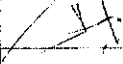
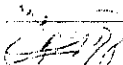
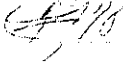
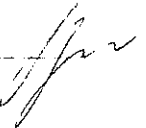
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
Lugar y fecha.


Las agujas, Zapopan, Jal., Enero 19 de 2012
Dr. María del Rocio León Kempis
Directora/a del trabajo


Dra. Galina Petrovna Zaitseva
Asesor


M.C. MVZ. Francisco Robles González
Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez		23/01/2012
Dr. Arturo Orozco Barocio		23/01/2012
Dr. Reynoso Orozco Ramón		23/01/2012
Supl. Dra. Galina Petrovna Zaitseva		23/01/2012

DEDICATORIA

A Dios, por darme la dicha de estar viva y la fortaleza para cumplir mis metas.

A mi hija Nahel, por ser el motor que impulsa mi vida y mis ganas de superarme, por sus horas de juego robadas y darme su comprensión llenando de amor y alegría mi día a día.

A mi madre Maria de los Angeles, por ser mi guerrera y guía, por mostrarme el sendero y darme la confianza de saber que puedo llegar hasta donde mis ojos puedan imaginar.

A mi abuela Naty y a mi hermana Hazel, por su amor y apoyo incondicional.

A Vladimir Morales por ser una inspiración para concluir este trabajo, motivarme con sus deseos de verme crecer, por su apoyo y sobre todo, por creer en mí.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. María del Rocío León Kempis y a mis asesores Dra. Galina Petrovna Zaitseva y al M.C. Francisco Robles González por compartir conmigo sus conocimientos y darme su apoyo con cariño.

A mis sinodales el Dr. Ramón Reynoso, Dr. Arturo Orozco y Dr. Alfonso Islas, por sus sugerencias para mejorar este trabajo.

Al Dr. Carlos González, por darme la oportunidad de ser parte de su gran equipo de trabajo en el área de Investigación y Desarrollo de Boehringer Ingelheim Vetmedica S.A. de C.V.

A mi amigo Julio Franco, por su paciencia y tiempo, pero sobre todo por su ánimo.

A Nadia Romero, Ingrid Borja, Priscila Galaviz, Mauricio Realpe, Alberto Uribe y a todas aquellas personas que en algún momento con su cariño y experiencia contribuyeron a esto.

A todo el equipo de Investigación y Desarrollo que han sido parte de mi crecimiento profesional.

**El presente trabajo de investigación fue realizado en el Departamento de
Investigación y Desarrollo**

Laboratorios ANCHOR S.A. de C.V.

Boehringer Ingelheim Vetmedica

Calle 30 No. 2614 ZI CP 44940 Guadalajara, Jalisco México.

**Debido a la confidencialidad de la empresa BIV en esta tesis los nombres de
las tres cepas de *Gallibacterium anatis* (*G. anatis*) que se utilizaron fueron
sustituidos con la siguiente identificación (cepas A, B y C).**

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ABREVIATURAS.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE CUADROS.....	5
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	6
RESUMEN.....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	9
II. ANTECEDENTES.....	15
Morfología.....	16
Detección e identificación.....	16
Hospederos.....	17
Enfermedad y signos causados por <i>G. anatis</i>	19
Diagnóstico de la enfermedad.....	19
ENSAYO INMUNOLÓGICO LIGADO A ENZIMAS (ELISA).....	20
Componentes de un ELISA: Fase sólida.....	21
Antígeno.....	22
Anticuerpos.....	23
Conjugados.....	23
Sustratos cromógenos.....	24
TIPOS DE ELISA.....	25
ELISA directa.....	25
ELISA indirecta.....	25
ELISA sándwich.....	25
ELISA sándwich directa.....	25
ELISA sándwich indirecta.....	26
OPTIMIZACIÓN DE REACTIVOS.....	26
Titulación de reactivos.....	26

	Lectores de ELISA	27
	Ventajas de la técnica de ELISA	27
	Determinación de la sensibilidad y especificidad de un ensayo	28
	Análisis mediante Curvas ROC.....	29
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
IV.	OBJETIVOS	33
	Objetivo General	34
	Objetivos Específicos.....	34
V.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
	Metodología general.....	36
	Producción de sueros pre e hiperinmunes para ser utilizados como controles (positivo-negativo).....	36
	Preparación de soluciones, amortiguadores y reactivos.....	37
	Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	37
	Obtención de antígeno.....	38
	Producción de sueros pre e hiper inmunes como controles positivo y negativo.....	42
	Optimización de la Metodología.....	44
	Técnica Inmuno enzimática (ELISA Indirecta)	48
	Ensayo de reactividad cruzada con otros agentes	50
	Sensibilidad	51
	Cálculos mediante curvas ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>)	51
VI.	RESULTADOS	52
I.	DISCUSIÓN	74
II.	CONCLUSIONES	78
III.	BIBLIOGRAFIA.....	81
I.	ANEXOS	86
	ANEXO 1: Reactivos, prearación de soluciones, amortiguadores	86
	ANEXO 2: Pruebas bioquímicas para la detección de <i>G. anatis</i>	87
	ANEXO 3: Pruebas estadísticas utilizadas y resultados de Curvas ROC	88

ABREVIATURAS

<i>G. anatis</i>	<i>Gallibacterium anatis</i>
<i>ELISA</i>	Por sus siglas en inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.
Ag	Antígeno
Ac	Anticuerpo
<i>Cut-off</i>	Punto de corte
TMB	<i>Tetramethylbenzidine liquid substrate system for ELISA</i> .
AUC	Por sus siglas en inglés Area Under Curve, área bajo la curva.
TCA	Trichloroacetic acid
<i>SPF</i>	Por sus siglas en inglés " <i>Specific Pathogen Free</i> ", libres de patógenos específicos.
<i>ROCcurve</i>	Por sus siglas en inglés Receiver Operating Characteristic Curve, Características operativas del receptor.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Prevalencia mundial de *Gallibacterium anatis* ("Workshop de *Gallibacterium*" realizado por BIV).
- Figura 2.** Estudio inicial de prevalencia a nivel nacional realizado por BIV 1999-2002 ("Workshop de *Gallibacterium*" realizado por BIV).
- Figura 3.** Prevalencia de *G.anatis* en aves de postura comercial, pollo de engorda y reproductoras pesadas; de acuerdo a un estudio realizado por BIV del año 97 – 2003 ("Worshop de *Gallibacterium*" realizado por BIV).
- Figura 4.** A) Apariencia de colonias y actividad hemolítica en placa de agar sangre, B) crecimiento de células en caldo triptosa vistas al microscopio con objetivo de inmersión (100 X).
- Figura 5.** Tipos de curvas ROC.
- Figura 6.** Pruebas de identificación bioquímica para identificar *G. anatis* (catalasa, oxidasa e indol).
- Figura 7.** Ejemplo de curva estándar con BSA por el método de Markwell, para determinar concentración de proteínas de una solución desconocida.
- Figura 8.** Titulación de tablero de ajedrez o diluciones en serie de dos dimensiones de antígeno contra anticuerpo primario para ELISA indirecta.
- Figura 9.** Determinación de anticuerpos séricos por el método de ELISA Indirecta.
- Figura 10.** Ensayo de reactividad cruzada contra agentes causantes de enfermedades avícolas.

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1.** Identificación de Biogrupos de acuerdo a Jaworski ("*Workshop de Gallibacterium*" realizado por BIV).
- Cuadro 2.** Identificación de Biovares de acuerdo a Christensen ("*Workshop de Gallibacterium*" realizado por BIV).
- Cuadro 3.** Tipos de enzimas, sustratos, cromógenos y condiciones de paro comúnmente utilizados en el ELISA (Crowther, 2001).
- Cuadro 4.** Reactivos que necesitan ser optimizados en los sistemas básicos de ELISA.
- Cuadro 5.** Preparación de la curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) con una concentración de 0 - 200 µg/ml.
- Cuadro 6.** Condiciones de detección de antígeno y anticuerpo primario óptimas, en donde NO se observe reactividad cruzada.
- Cuadro 7.** Experimento para comprobar la especificidad de la unión de antígeno y anticuerpo y descartar contaminación de la solución cromógena.
- Cuadro 8.** Resultados de la prueba de Tukey de la comparación de las cepas A, B y C de *G. anatis* contra las 10 diferentes agentes de enfermedades avícolas.
- Cuadro 9.** Puntos de corte que ofrecieron los mejores pares de sensibilidad y especificidad de cada semana post vacunación 1 y 2.

ÍNDICE DE GRÁFICAS

- Gráfica 1.** Curva estándar con BSA por el método de Markwell, para determinar concentración de proteínas de una solución desconocida.
- Gráfica 2.** Curva de saturación del antígeno cepa A con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa A (homóloga).
- Gráfica 3.** Curva de saturación del antígeno cepa A con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa B (heterólogo).
- Gráfica 4.** Curva de saturación del antígeno cepa A con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa C (heterólogo).
- Gráfica 5.** Curva de saturación a una concentración de 100 µg de antígeno de la cepa A de *G. anatis* a diferentes diluciones del anticuerpo primario cepa A (homóloga), cepa B y cepa C (heterólogas).
- Gráfica 6.** Curva de saturación del antígeno cepa B con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa B (homólogo).
- Gráfica 7.** Curva de saturación de antígeno cepa B con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa A (heterólogo).
- Gráfica 10.** Curva de saturación de antígeno cepa C con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa C (homólogo).
- Gráfica 11.** Curva de saturación de antígeno cepa C con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa A (heterólogo).
- Gráfica 12.** Curva de saturación de antígeno cepa C con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa B (heterólogo).
- Gráfica 13.** Curva de saturación de la fase sólida con 100 µg de antígeno cepa C de *G. anatis* a diferentes diluciones del anticuerpo primario cepa C (homóloga), cepa A y cepa B (heterólogas).
- Gráfica 14.** Especificidad de la cepa A probada con sueros hiperinmunes contra agentes de enfermedades avícolas.

Gráfica 15. Especificidad de la cepa B probada con sueros hiperinmunes contra agentes de enfermedades avícolas.

Gráfica 16. Especificidad de la cepa C probada con sueros hiperinmunes contra agentes de enfermedades avícolas.

RESUMEN

Gallibacterium anatis es una bacteria que afecta aves provocando principalmente caídas en la producción de huevo o un considerable retraso para alcanzar el pico de postura, reducción en la ganancia de peso y un incremento en la mortalidad. El impacto negativo de esta bacteria sobre las aves es muy severo y por ende, las pérdidas económicas son considerables. En el presente estudio se desarrolló una metodología para detectar anticuerpos específicos contra *G. anatis* en sueros de aves *Gallus gallus*, utilizando la técnica de ELISA indirecta y empleando como antígeno proteínas totales de tres cepas de *G. anatis* (A, B, y C). La cantidad y concentración exacta del antígeno y anticuerpo primario se determinaron por ensayos de titulación. La sensibilidad, especificidad y puntos de corte de la prueba se obtuvieron con la herramienta de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*), mediante el análisis de sueros de aves vacunadas dos veces con un producto comercial y muestreadas semanalmente. Placas sensibilizadas con antígenos de *G. anatis* fueron probadas con sueros hiperinmunes de agentes causantes de enfermedades de importancia avícola, para determinar cuán específica es esta técnica. Los resultados mostraron que el ensayo de ELISA desarrollado tiene un comportamiento distinto entre cada cepa y entre cada semana de muestreo de suero. Los distintos puntos de corte establecidos por las curvas ROC dan un comportamiento aceptable (arriba del 80 % tanto en sensibilidad y especificidad) en el ELISA de la cepa A, a partir de la 4^o semana post- vacunación 1, hasta la 2^o semana post- vacunación 2; en la cepa B se presenta un comportamiento similar en la 2^o y 3^o semana post- vacunación 1 y para la cepa C, la 3^o semana post- vacunación 2 arroja porcentajes de sensibilidad y especificidad arriba del 80 %. La técnica desarrollada detecta seroconversión y ofrece altos niveles de sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos contra las 3 cepas *G. anatis*, sin embargo no en todos los sangrados se obtuvieron buenos porcentajes de estos dos parámetros con el punto de corte elegido, por lo que, la metodología desarrollada aún no puede ser empleada como herramienta serológica única para detectar *G. anatis*. Mientras tanto, debe ser empleada como prueba de soporte a los datos que involucran observaciones clínicas para poder dar un diagnóstico de exposición natural al agente patógeno de *G. anatis*, analizando sueros exclusivamente en las semanas que se obtuvo buena sensibilidad y especificidad.

I. INTRODUCCIÓN

La avicultura, que se refiere a la cría de pollos, pavos, patos, gansos y algunas otras aves domésticas, es una actividad de importancia económica considerable que se practica en todo el mundo. En muchos países se ha especializado cada vez más y forma parte de una industria dinámica de gran relevancia nacional e internacional siendo la principal industria transformadora de proteína vegetal en proteína animal (Jordán *et al.*, 1998).

Durante los últimos años en México la producción de carne de pollo ha aumentado en comparación con los otros cárnicos, así como la producción de huevo. Tan solo en el 2010 fueron producidos 2, 822,413 millones de toneladas de carne de pollo y 2, 475,436 millones de toneladas de huevo, dando lugar a un aumento considerable del 4.6 % a un ritmo de crecimiento anual. La producción pecuaria del sector avícola mexicano aporta el 63 %, del cual el 33.7 % es por la producción de pollo, un 29.1 % es aportado por la producción de huevo y el resto por la producción de pavo (URL1). Sin embargo, el potencial aumento de la producción se ve afectado por el impacto provocado por diferentes enfermedades de las aves, las cuales tienen como consecuencia pérdidas económicas que sufren los productores en el sector avícola.

Las enfermedades avícolas tienen distinto origen biológico, éstas pueden ser virales, como la enfermedad de *Newcastle*; fúngicas, como *Aspergilosis*; protozoarias, como *Coccidiosis*; parasitarias, como *Ascariasis*; y por último, las enfermedades bacterianas que forman parte de un segmento importante dentro de las causales de mermas productivas en las parvadas comerciales como postura comercial, pollo de engorda y reproductoras pesadas.

Un problema recurrente en gallinas de postura comercial son las enfermedades que causan inflamación en los órganos reproductivos y peritoneo, conocidas como salpingitis y peritonitis respectivamente, provocando una reducción en el rendimiento de la producción de huevo, incrementando la mortalidad y un impacto directo sobre el desempeño de la parvada y como consecuencia de esto, pérdidas en la producción económica (Bisgaard, 1981).

Algunas investigaciones han demostrado que una variedad de patógenos podrían causar salpingitis y peritonitis (Kristensen, 2009), uno de estos patógenos es *Gallibacterium anatis*, una bacteria recientemente descrita como un nuevo microorganismo de la familia *Pasteurellaceae* (Christensen y Bisgaard, 2008) antes identificada como *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus salpingitidis* o *Pasteurella anatis* (Christensen *et al.*, 2003). En la actualidad este microorganismo es motivo de estudio de varios investigadores, debido a que cada vez es más común encontrar problemas en parvadas causadas por esta bacteria, afectando principalmente órganos internos del aparato reproductor. Existen numerosas referencias que reportan a microorganismos de la familia *Pasteurellaceae* como causa de disminución de la producción en parvadas comerciales a nivel mundial en países como: Estados Unidos de América, Dinamarca, Nigeria, Filipinas, Jordania, Noruega, Japón, China, Suiza, Taiwán, Siria, Inglaterra, Alemania, República Checa, Israel y México (Kristensen, 2010).

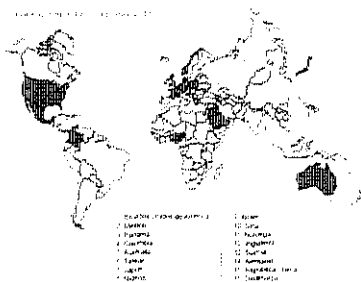


Figura 1. Prevalencia mundial de *Gallibacterium anatis* ("Workshop de *Gallibacterium*" realizado por BIV)

Boehringer Ingelheim Vetmedica S. A. de C. V. (BIV) es una empresa farmacéutica ubicada dentro de las primeras seis compañías en el mercado mexicano de salud animal en la que se realizan actividades de investigación, desarrollo, producción y comercialización de productos innovadores para las distintas especies animales y tiene más de catorce años investigando acerca del papel de este microorganismo en las parvadas comerciales.

BIV realizó un estudio con el cual se ha logrado conocer la prevalencia de *G. anatis* en México, con la participación de avicultores y clínicos de campo se recopiló información acerca de parvadas de postura que van de los años de 1999 – 2002.

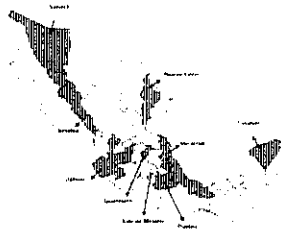


Figura 2. Estudio inicial de prevalencia a nivel nacional realizado por BIV 1999-2002 (*"Workshop de Gallibacterium"* realizado por BIV).

Además ha investigado la prevalencia en las parvadas afectadas como son: postura comercial con un 85 %, un 11% en pollo de engorda y un 4% en reproductoras pesadas, de acuerdo a un estudio realizado por BIV del año 97 – 2003.

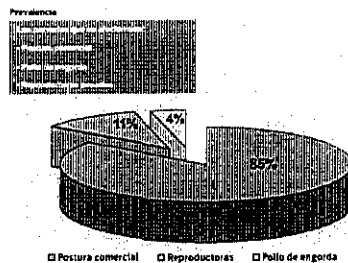


Figura 3. Prevalencia de *G. anatis* en aves de postura comercial, pollo de engorda y reproductoras pesadas; de acuerdo a un estudio realizado por BIV del año 97 – 2003 (*"Workshop de Gallibacterium"* realizado por BIV).

El impacto negativo de esta bacteria sobre las aves es muy severo y por ende, las pérdidas económicas son considerables debido a que afecta básicamente tres parámetros productivos importantes, originando una caída en la

producción de huevo, una reducción de la ganancia de peso y un incremento en la mortalidad. Es importante recalcar que no son los únicos aspectos afectados, pero sí tal vez los más significativos.

Durante las últimas tres décadas la industria avícola ha experimentado cambios en la prevención y control de las enfermedades que han favorecido el crecimiento de la misma (Bermudez, 2008). Por lo tanto, el reconocimiento, tratamiento o prevención para ayudar en el control de enfermedades de la industria avícola son de importancia crucial y son objeto de investigación.

G. anatis es del interés de los clínicos de campo encargados de la producción en la avicultura comercial, ya que su aislamiento es frecuente a partir de casos clínicos en los diferentes tipos de parvadas existiendo mermas considerables en la producción. En la industria avícola es muy difícil cuantificar la pérdida financiera debida a enfermedades, ya que no existe una fuente central de información (Jordán, 1998).

Diferentes técnicas diagnósticas han sido adaptadas para monitorear o detectar diferentes enfermedades de importancia avícola, una de las más usadas son los ensayos inmunológicos, esto debido a su sensibilidad, especificidad, fácil diseño y velocidad para la obtención de resultados (Ashraf, 2006; Wit, 2001; Herdt; 2005).

En la actualidad, el diagnóstico de la enfermedad causada por *G. anatis* se realiza considerando la observación de signos clínicos, identificación del agente causal y presencia de anticuerpos a partir de muestras enviadas al laboratorio, en donde puede confirmarse mediante pruebas bioquímicas, PCR, aglutinación en látex y ELISA indirecta. Sin embargo, las pruebas bioquímicas, además de utilizar múltiples medios, tienen el inconveniente de identificar otras bacterias de la familia *Pasteurellaceae*. Por otro lado, la prueba de aglutinación en látex depende de la subjetividad en la interpretación del analista. Estas técnicas son sencillas de realizar, sin embargo solo son pruebas de tamizaje que presentan una menor especificidad y necesitan ir de la mano de pruebas confirmatorias, como la técnica

de PCR que, si bien presenta mayor sensibilidad, tiene la desventaja de tener un costo más elevado.

La técnica de ELISA es considerada una prueba versátil y simple en su realización que emplea reactivos económicos y presenta la ventaja de ofrecer una alta sensibilidad por su capacidad para detectar una mínima cantidad de anticuerpos. Además la técnica de ELISA puede ser una técnica analítica eficaz para utilizarse como control de calidad en la liberación de lotes vacunales, en donde es necesario constatar que los lotes producidos son biológicamente efectivos.

Actualmente existe una técnica de ELISA; la cual fue diseñada con fines de servir como un control en el proceso de producción de biológicos, por lo tanto es poco específica, lo que impide que pueda ser utilizada como una herramienta única en el diagnóstico de *G. anatis*; además, no se cuenta con un sistema de detección de seroconversión, con el que se pueda detectar animales vacunados y que se correlacione con el nivel de protección conferida.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar un protocolo utilizando la técnica de ELISA indirecta, para detectar anticuerpos con mayor especificidad y sensibilidad contra tres cepas de *G. anatis*, debido a que es de suma importancia para el establecimiento de un diagnóstico certero y rápido para determinar la participación real de este microorganismo en el ciclo productivo, sobre todo en las parvadas de gallinas de postura comercial; y que además sea capaz de monitorear seroconversión en aves vacunadas.

Para este propósito se obtuvieron proteínas totales a partir de cultivos de 3 cepas de *G. anatis*, las cuales se utilizaron como antígenos para el establecimiento de un prueba ELISA indirecto para la detección de anticuerpos en aves inmunizadas con un producto biológico elaborado por BIV para la prevención de la infección causada por *G. anatis*.

II. ANTECEDENTES

Los microorganismos hemolíticos, que pertenecen al género *Pasteurella*, fueron por primera vez reportados en los años 50s en asociación con peritonitis y salpingitidis en gallinas de postura (Campogarrido, 2004), donde pertenece *G. anatis*, una bacteria recientemente establecida como un nuevo microorganismo de la familia Pasteurellaceae, antes identificada como *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus salpingitidis* o *Pasteurella anatis* (Christensen *et al.*, 2003).

Morfología

G. anatis es un cocobacilo, gram -, no móvil, encapsulado con ligero pleomorfismo. En placas de agar sangre forma colonias semitransparentes grisáceas y circulares de 1-2 mm de diámetro con actividad β -hemolítica después de 16-24 hrs de incubación a 37 ° C (Fig. 4).

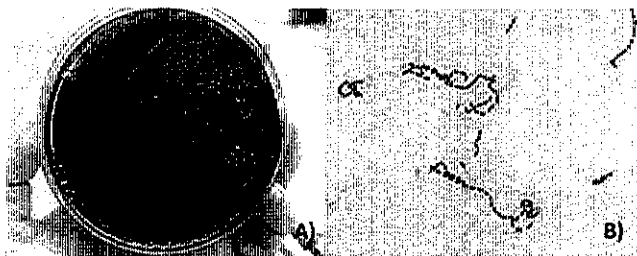


Figura 4. A) Apariencia de colonias y actividad hemolítica en placa de agar sangre, B) células en crecimiento en caldo triptosa vistas al microscopio con objetivo de inmersión (100 X).

G. anatis, no forma endosporas, es mesofílico y anaerobio facultativo o microaerofílico (Christensen *et al.*, 2003). Esta bacteria es nutricionalmente exigente y crece en medios complejos como triptosa, infusión cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés), Caldo Luria Bertani (LB), caldo tripticaseina y en placas de agar sangre.

Detección e identificación

G. anatis, además de ser detectada por la apariencia de colonias y producir β -hemolisis (hemolisis completa) en agar sangre, puede ser identificada por características fenotípicas (pruebas bioquímicas), tales como catalasa (+), oxidasa

(+), fosfatasa (+) e indol (-), que se realizan de manera muy rápida (Christensen, *et al.*, 2003)

Las pruebas bioquímicas que se emplean para la clasificación de *G. anatis* se basan en la fermentación de azúcares que conduce a la producción de ácido. Dado que el medio de cultivo tiene un indicador del cambio de pH, la producción de ácido promoverá el cambio de color del medio de cultivo.

Existen dos esquemas de identificación de *G. anatis*, uno basado en la publicación de Jaworski *et al.*, 1998; en donde la bacteria se clasifica por Biogrupos (**Cuadro 1.**) y otro de acuerdo a la publicación de Christensen, 2003 en donde se clasifica por biovares (**Cuadro 2.**).

También existen pruebas moleculares específicas para *G. anatis* recientemente desarrolladas, como: PCR convencional y de tiempo real utilizadas para la verificación de colonias sospechosas, (Bojesen *et al.*, 2007, Robles *et al.*, 2009).

Hospederos

G. anatis ha sido aislado de una gran variedad de aves incluyendo pollos, patos, pavos, perdices y gansos (Bojesen *et al.*, 2003), sin embargo se ha encontrado con más frecuencia en pollos. Este microorganismo raramente ha sido aislado de mamíferos como cerdos y vacas, y solo se ha reportado un aislamiento en humanos. Por lo que las aves son consideradas su principal hospedero, tanto de aves domésticas como de aves silvestres (Kristensen, 2010).

	BIOVARIANTES															
	BIOVAR 1				BIOVAR 2				BIOVAR 3				BIOVAR 4			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Hemólisis	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tinción Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MacConckey	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
TSI	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Arabinosa	-	-	-	[+]	-	-	-	[+]	[+]	-	-	[+]	[+]	-	-	-
Celobiosa	-	-	-	-	[+]	[+]	[+]	-	-	[+]	-	[+]	-	[+]	[+]	[+]
Sorbitol	[+]	-	-	[+]	[+]	[+]	+	-	-	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	-	-
Xilosa	+	+	[+]	[+]	-	[+]	+	[+]	+	+	+	+	+	+	-	-
Trealosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	[+]	-	-	-	-	-	-	[+]	[+]
Ornitina	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[+]	[+]
β-Glucosidasa	-	-	-	[+]	[+]	[+]	[+]	-	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]
α-Fuocsidasa	[+]	-	-	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	-	-
β-Galactosidasa	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[-]	[-]

Cuadro 1. Identificación de Biogrupos de acuerdo a la publicación de Jaworski *et al.*, 1998 ("Workshop de *Gallibacterium*" realizado por BIV).

Azúcar	Biovar No.																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
L(-)-Arabinosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D(+)-Xilosa	[+]	[+]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Meso-Inositol	[+]	[+]	-	[+]	[+]	-	(*)	-	[+]	[+]	-	+	+	-	+	[+]	-	-	-	+	-	-	+	
D(-)-Sorbitol	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Trealosa	[+]	[+]	+	[+]	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	[+]	-	+	+	+	+	
Dextrosa	[+]	[+]	-	[+]	[+]	+	+	+	+	+	-	[+]	[+]	-	-	-	-	[+]	-	-	-	-	+	
Hemólisis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Cuadro 2: Identificación de Biovars de acuerdo a publicación de Christensen, 2003 ("Workshop de *Gallibacterium*" realizado por BIV).

Es importante mencionar que este es un microorganismo que ha podido ser aislado de aves sin signos clínicos, por lo que algunos autores han sugerido que *G. anatis* forma parte constitutiva del tracto superior respiratorio y de la flora del tracto inferior genital (Bisgaard, 1977).

Sin embargo también ha sido aislado en cultivos puros de aves enfermas con salpingitis, ooforitis, peritonitis, septicemia, pericarditis, hepatitis y lesiones del tracto respiratorio superior (Bojesen *et al.*, 2004). Además ha sido aislado de parvadas con lesiones de órganos reproductivos y severas bajas en la producción de huevo (Bisgaard y Dam, 1981).

Enfermedad y signos causados por *G. anatis*

La enfermedad según su grado de avance se puede dividir en dos etapas: sub-clínica y clínica; el impacto económico es importante debido a que en la etapa sub-clínica las aves lucen a simple vista sanas, pero existe una baja de producción de huevo o un retraso considerable para alcanzar el pico de postura (URL 2). En la etapa clínica se presenta descarga nasal, fiebre, depresión, crestas caídas y cianóticas, anorexia, deshidratación, diarrea verdosa-parda, cojera, postración, mortalidad y en algunas ocasiones se han observado orejuelas ennegrecidas y cianosis periorbital (Vázquez *et al.*, 2003). *G. anatis* es del interés de los clínicos de campo encargados de la producción en la avicultura comercial, ya que su aislamiento es frecuente a partir de casos clínicos en los diferentes tipos de parvadas existiendo mermas considerables en la producción de un 5 % - 21 %. Por tal razón, es de suma importancia el establecimiento de un diagnóstico certero y rápido para poder determinar la participación real de este microorganismo en el ciclo productivo, sobre todo en las parvadas de gallinas de postura comercial.

Diagnóstico de la enfermedad

En la actualidad, el diagnóstico de la enfermedad se hace mediante la integración del trabajo de campo considerando la observación de signos clínicos y los resultados obtenidos a partir de muestras enviadas al laboratorio, donde

utilizan diferentes pruebas microbiológicas e inmunológicas; como identificaciones bioquímicas, aglutinación en látex, PCR y prueba de ELISA.

ENSAYO INMUNOLÓGICO LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

Los ensayos inmunológicos son procedimientos que se basan en la detección de la unión antígeno-anticuerpo y tienen aplicación universal para la determinación o cuantificación de fármacos terapéuticos y no terapéuticos, diversas sustancias biológicas, sustancias infecciosas o anticuerpos de respuesta del huésped en el suero y en cualquier líquido biológico donde se encuentre la sustancia a investigar (por ejemplo: en la orina, líquido cefalorraquídeo y en saliva).

A través de los últimos 39 años se han desarrollado incontables aplicaciones basadas en la técnica de ELISA, (por sus siglas en inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, dicha técnica fue desarrollada en 1971 por Engvall y Perlmann y por Weemen van y Schuurs para evitar problemas asociados con el radioinmunoensayo (Lequin, 2005). Desde entonces han sido ampliamente usados para medir anticuerpos (monoclonales y policlonales) y antígenos en fluidos biológicos o en medios de cultivo, con alto grado de sensibilidad. Actualmente muchos equipos comerciales y sistemas automatizados están disponibles para detectar anticuerpos específicos a antígenos después de la vacunación o para detectar anticuerpos para diagnosticar enfermedades infecciosas (Miura, 2008).

El fundamento de la técnica radica en las interacciones antígeno-anticuerpo, que se llevan a cabo mediante un soporte sólido y el empleo de enzimas como marcadores inmunoquímicos de estos complejos.

Los antígenos o anticuerpos pueden ser asociados a las superficies fácilmente por adsorción pasiva durante un tiempo y temperatura de incubación. Después de la incubación, algún exceso de antígeno que no se logró unir a la fase sólida es removido por un simple paso de lavado usando una solución

amortiguadora (buffer). Cuando lo que se está probando son sueros, éstos son añadidos a los pozos y solo los anticuerpos en los sueros serán unidos a la capa de antígenos fijados y los anticuerpos no específicos son removidos por lavados. Después, la presencia de la unión antígeno-anticuerpo es detectada por la adición de una solución que contiene una anti-inmunoglobulina químicamente ligada a una enzima (Anticuerpo secundario) a través de una incubación y el exceso es eliminado por un paso de lavado. Finalmente se adiciona el sustrato de la enzima para tener una reacción colorimétrica. La enzima y el sustrato tienen que ser seleccionados para asegurar el desarrollo del color. La intensidad del color que se desarrolla es proporcional a la cantidad de enzima unida a la anti-globulina, que a su vez es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente (Tizard, 2009). El hecho de que una pequeña cantidad de enzima pueda catalizar una gran cantidad de sustrato, permite amplificar la reacción antígeno-anticuerpo de tal manera, que es posible detectar cantidades ínfimas de antígeno o anticuerpo en las muestras estudiadas.

Los resultados obtenidos pueden ser analizados visualmente o medidos con un espectrofotómetro, ya que cada pozo emite una señal después de una reacción cromogénica, lo cual hace a esta técnica objetiva y deseable cuando se requieran resultados mesurables.

Componentes de un ELISA: Fase sólida

El principio de la fase sólida está basado en la habilidad que poseen los antígenos y anticuerpos para fijarse a polímeros.

Numerosas fases sólidas han sido probadas para inmovilizar los antígenos o anticuerpos por enlaces covalentes sobre soportes de vidrio, nylon y celulosa; sin embargo las placas de microtitulación de 96 pozos fabricadas de policloruro de vinilo (PVC), polipropileno (PP) ó poliestireno (PS) son la mejor opción debido a que han sido tratadas para aumentar su capacidad de absorción de moléculas y permiten la remoción rápida de aquellas que no lograron unirse; además los

fondos de los pocillos son ópticamente claros para poder realizar las medidas de densidad óptica.

El uso de una amplia variedad de placas de diferentes fabricantes se han reportado para un amplio espectro de investigaciones biológicas. Sin embargo, es imposible recomendar las placas de un solo fabricante como universalmente aceptado, además de las variables que pueden existir de un lote a otro; por tanto, es necesario definir para cada nuevo lote las condiciones de sensibilidad de las placas, incluso se podría esperar que algunos lotes funcionen mal.

Enzimas

Una enzima, en la técnica de ELISA, es una proteína cuyo sustrato es un cromógeno que al ser degradado desprende un color. La enzima marcadora es la porción crítica de estos métodos de análisis, por lo tanto su elección es muy importante. Los criterios principales de elección son: que la enzima sea estable en condiciones de almacenamiento, su capacidad de enlace y análisis, alta especificidad o velocidad del procesamiento del sustrato, la no toxicidad de los sustratos a usar, la disponibilidad de ésta y que sea económica. Y como punto fundamental es que la enzima no esté presente en el antígeno o el preparado de antisuero que se va a utilizar para las prueba serológicas, de lo contrario obtendríamos falsas pruebas positivas. Los resultados negativos falsos pueden ser causados por la presencia de inhibidores o inactivadores de enzimas en los reactivos serológicos. Por tal motivo es necesario incluir en las pruebas de ELISA controles adecuados para identificar esos problemas potenciales (Crowther, 2001).

Antígeno

Los antígenos son macromoléculas extrañas como: proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos que al entrar a un organismo, son capaces de inducir la formación de anticuerpos, cada anticuerpo puede reaccionar con un sitio específico del antígeno utilizado, llamado *determinante antigénico* o *epítopo* (Stryer, 2007).

En las pruebas de ELISA los antígenos son utilizados para detectar la presencia de anticuerpos en fluidos biológicos o en medios de cultivo.

La mayoría de los antígenos son adheridos a la superficie de plástico de las placas, probablemente como resultado de las interacciones hidrofóbicas entre las proteínas no-polares y el poliestireno. Las interacciones son independientes de la carga neta de las proteínas, y cada proteína tiene una constante de unión.

La hidrofobicidad de la interacción plástico-proteínas puede ser aprovechada para incrementar la unión, dado que la mayoría de los residuos proteicos hidrofílicos se encuentran afuera, mientras que los residuos hidrofóbicos se orientan hacia el interior (Stryer, 2007).

Anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas sintetizadas por un organismo como respuesta a la presencia de una sustancia extraña, llamada antígeno. Los anticuerpos (también son llamados inmunoglobulinas) tienen una afinidad específica por los antígenos que promueven su síntesis (Stryer, 2007). Los anticuerpos, son llamados anticuerpos de captura, cuando son unidos en una fase sólida para capturar el antígeno. Los anticuerpos primarios son anticuerpos específicos a antígenos que en un sistema de ELISA indirecto están unidos a una fase sólida

Los anticuerpos secundarios o anticuerpos antiespecie; son producidos cuando proteínas (anticuerpos) de una especie son introducidos dentro de otra especie y para ser utilizados en el sistema de ELISA son marcados con una enzima que es responsable de catalizar la reacción del sustrato; lo que origina un cambio en el color de un cromógeno, y por lo tanto es su densidad óptica.

Conjugados

Consiste en acoplar proteínas a enzimas. Los conjugados enzima-anticuerpos se preparan de preferencia con anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad y las enzimas utilizadas deben ser estables de alta reactividad y disponibles en forma purificada. La enzima debe actuar sobre un

sustrato que, por degradación enzimática, determine la aparición de productos estables, solubles y fáciles de medir. La fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rabano picante han sido las de elección por su bajo costo, fácil conjugación y por poseer una alta variedad de sustratos. El conjugado se conserva en forma concentrada y se diluye inmediatamente antes de usar en PBS.

Existen otros sistemas que sustituyen al conjugado anti-especie para la detección de IgG como la utilización de proteína A y B marcadas con peroxidasa (Crowther, 2001).

Sustratos cromógenos

Los sustratos son utilizados para medir las reacciones enzimáticas. La elección del sustrato es de gran importancia para la estandarización del método de ELISA y varios factores como la sensibilidad, especificidad, facilidad de lectura, estabilidad después de haber parado la reacción y complejidad de la preparación en caso de que éste no pueda ser comprado son tomados en cuenta. Actualmente existen muchos sustratos colorimétricos. El **cuadro 3**, se muestran las enzimas más comúnmente utilizadas, los cromógenos y la solución que detiene la reacción.

Tipos de enzimas, sustratos, cromógenos y condiciones de parado en ELISA							
Enzima	Sustrato	Cromógeno	Color		Absorbancia (nm)		Solución de paro
			No parado	Parado	No parado	Parado	
Peroxidasa de rabano picante (HRP)	Péroxido de hidrogeno (0.004%)	OPD	verde/naranja	naranja/café	450	492	1.25 M ácido sulfúrico
	Péroxido de hidrogeno (0.004%)	TMB	azul	amarillo	650	405	SDS (1%)
	Péroxido de hidrogeno (0.002%)	ABTS	verde	verde	414	414	No parar
	Péroxido de hidrogeno (0.006%)	5-As	café	café	450	450	No parar
	Péroxido de hidrogeno (0.02%)	Diaminobenzidina	café	café	N/A	N/A	No parar
Fosfatasa alcalina (AP)	Pnpp (2.5 mM)	pnp	amarillo/verde	amarillo/verde	405	405	Carbonato de sodio 2 M
β -Galactosidasa	ONPG (3 mM)	ONPG	amarillo	amarillo	420	420	Carbonato de sodio 2 M
Ureasa	Urea	Urea bromocresol	morado	morado	588	588	Mertiolate (1%)

Cuadro 3. Tipos de enzimas, sustratos, cromógenos y condiciones de paro comúnmente utilizados en el ELISA (Crowther, 2001).

TIPOS DE ELISA

Existen muchas configuraciones posibles del método de ELISA, sin embargo son tres los métodos básicos principales para el desarrollo de todas.

ELISA directa

ELISA indirecta

ELISA sándwich (directa e indirecta)

Los tres sistemas pueden ser utilizados para diseñar las bases de un grupo de ensayos llamados de competición o inhibición.

ELISA directa

El antígeno se une a la fase sólida por adsorción pasiva, después se realizan lavados, los anticuerpos marcados con una enzima son añadidos. Después de un periodo de incubación y un paso de lavado, se agrega el sustrato y se desarrolla el color.

ELISA indirecta

Los anticuerpos de una especie en particular reaccionan con el antígeno unido a una fase sólida. Algunas uniones de anticuerpos son detectadas por la adición de un antisuero anti-especie marcado a una enzima. Este tipo de ELISA es utilizada ampliamente para diagnóstico.

ELISA sándwich

El ELISA sándwich puede estar dividido dentro de dos sistemas: ELISA sándwich directa y ELISA sándwich indirecta.

ELISA sándwich directa

Este sistema aprovecha los anticuerpos unidos a una fase sólida para capturar el antígeno, el cual es detectado utilizando suero específico para este antígeno. La detección de anticuerpos es marcada con una enzima. La captura de anticuerpos y la detección de anticuerpos pueden estar el mismo suero o ser de

diferentes animales de la misma especie o de diferentes especies. El antígeno tiene que tener al menos dos diferentes sitios antigénicos.

ELISA sándwich indirecta

En este sistema el antígeno es capturado por anticuerpos que están unidos a una fase sólida. El antígeno es entonces detectado usando anticuerpos de otra especie, éstos son detectados por un conjugado anti-especie. El conjugado anti-especie debe de ser de origen distinto al antígeno capturado en la fase sólida, para evitar que reaccionen entre ellos (Crowther, 2001).

OPTIMIZACIÓN DE REACTIVOS

Muchos sistemas de ELISA requieren que los reactivos usados sean optimizados, es decir, las concentraciones de trabajo de cada componente de la prueba tienen que ser evaluados (Crowther, 2001). La concentración ideal de cada reactivo utilizado en el ensayo, debe ser establecida en base a la realización varias repeticiones.

Titulación de reactivos

Todos los reactivos de ensayo inmunológico deben de ser optimizados, es decir, la concentración de cada componente debe de ser evaluado. El **cuadro 4** muestra los reactivos que necesitan ser optimizados en los sistemas básicos de ELISA.

Una función que ayuda en este proceso es la titulación de tablero de ajedrez (*Chessboard or Checkerboard Titrations*) mediante el uso de microplacas.

ELISA	Reactivos incluidos	Número de titulaciones
Directa	Ag, Ac, enzima conjugada	2
Indirecta	Ag, Ac, antiespecie conjugada	3
Directa sandwich	Ac de captura, Ag, Ac secundario conjugado	3
Indirecta sandwich	Ac de captura, Ag, Ac secundario conjugado, antiespecie conjugado contra Ac secundario.	4

Cuadro 4. Reactivos que necesitan ser optimizados en los sistemas básicos de ELISA.

Lectores de ELISA

Los lectores de ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa de ELISA, normalmente cuentan con varios filtros para poder leer a diferentes densidades ópticas.

Ventajas de la técnica de ELISA

Los ensayos de ELISA son actualmente aceptados como “estándar de oro” en diferentes áreas como la parasitología, bacteriología, virología, toxicología, etc. debido a sus diversas aplicaciones; algunos ejemplos son: diagnóstico clínico (tanto cualitativo como cuantitativo en modificaciones técnicas muy diversas), detección viral, isotipificación de anticuerpos, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc. (Crowther, 2001).

Estos ensayos son caracterizados por su elevada sensibilidad y especificidad, además de su rapidez y simplicidad, debido a que se realizan en unas cuantas horas y la lectura espectrofotométrica de una placa de 96 pozos puede ser leída en tan solo 5 segundos; su simplicidad, por la adición de reactivos

en volúmenes pequeños y la fácil remoción de los reactivos no unidos a través de lavados (Crowther, 2001).

En cuanto a la interpretación de los resultados, los productos finales con color pueden ser detectados visualmente para determinar si el ensayo funcionó de forma adecuada y los espectrofotómetros multicanal permiten cuantificar los resultados para realizar un análisis estadístico de los datos.

Los reactivos son comercialmente disponibles y ofrecen gran flexibilidad en el diseño de la ELISA, no son costosos y ofrecen seguridad, porque su desecho no es problemático debido a que no son mutagénicos.

Los ensayos de ELISA son comparables e incluso superiores a numerosas técnicas de diagnóstico serológicas (inmunofluorescencia, inmunolectroforesis, radioinmunoensayo, etc.). Actualmente existen muchos conjuntos de reactivos comerciales y sistemas automatizados que son viables para detectar anticuerpos específicos a antígenos post-vacunación o para detectar anticuerpos que diagnostican enfermedades infecciosas.

Determinación de la sensibilidad y especificidad de un ensayo

Los signos clínicos de muchas enfermedades en ocasiones carecen de especificidad, esto impide que se pueda aplicar un tratamiento y estimar su pronóstico para su prevención; para poder evitar grandes pérdidas de recursos es importante conocer la habilidad de un ensayo para clasificar correctamente a individuos clínicamente relevantes. La validación de una prueba involucra todos los procesos para determinar el desempeño de un ensayo para alcanzar el conjunto de objetivos definidos.

Para determinar la idoneidad de un ensayo de ELISA y poder confirmar el diagnóstico de casos clínicos e identificar los animales infectados con el fin implementar medidas de control, es importante conocer la exactitud; que es la principal cualidad clínica de una prueba diagnóstica y es evaluada en función de dos características: la sensibilidad y la especificidad de dicho ensayo.

La sensibilidad es la capacidad de una técnica de detectar los verdaderos positivos y la especificidad es la capacidad de una técnica para detectar la fracción de los verdaderos negativos, es decir, determina la probabilidad de obtener un resultado negativo cuando el individuo no tiene la enfermedad (Burgueño *et al.*, 1995).

Para valorar la sensibilidad y especificidad diagnósticas, los resultados de la prueba tienen primero que reducirse a la categoría de positivo-negativo; lo cual implica considerar un punto de corte también llamado límite de decisión o umbral. Un método utilizado para obtener estos dos parámetros (sensibilidad y especificidad), que establece un punto de corte basado en la distribución de frecuencias de los resultados con animales de referencia infectados y no infectados es el análisis de curvas ROC.

Análisis mediante Curvas ROC

Las curvas ROC (por sus siglas en inglés *Receiver Operating Characteristic*) es una prueba estadística que a través de un gráfico proporciona un buen índice de precisión para discriminar entre estados alternativos de salud, estimando los valores de sensibilidad y especificidad (Zweig, 1993). Sin embargo, éstas varían en función del criterio elegido como punto de corte de densidad óptica también llamado límite de decisión o umbral, que se basa en la distribución de frecuencias de los resultados de las pruebas con animales de referencia, de animales infectados y no infectados. Como el umbral de decisión varía a través del rango de resultados posibles, la sensibilidad y la especificidad se moverán en direcciones opuestas, cuando una aumenta la otra disminuye, para cada umbral de decisión o punto de corte hay una combinación de pares de sensibilidad y especificidad (Dominguez, 2002).

El área bajo la curva de ROC es una medida de qué tan bien un parámetro puede distinguir entre dos categorías de diagnóstico (sano/enfermo).

Si la prueba de ELISA fuera perfecta, sin solapamiento entre positivos y negativos, habría una región en la que cualquier punto de corte tendría sensibilidad y especificidad iguales a 1; la curva sólo tendría el punto (0,1). Si la prueba fuera inútil, la sensibilidad (verdaderos positivos) sería igual a la proporción de falsos positivos; la curva sería la diagonal de (0,0) a (1,1). Las pruebas de ELISA buenas tienen curvas cercanas a 1 y las regulares son intermedias, las malas son cercanas a la diagonal (Burgueño *et al.* 1995). Las curvas habituales tienen curvas intermedias. En la **figura 5**, se muestran los tipos de curvas ROC, en donde el eje de la ordenada "y", se sitúa la sensibilidad o fracción de verdaderos positivos y en el eje de las abscisas "X" se sitúa la especificidad.

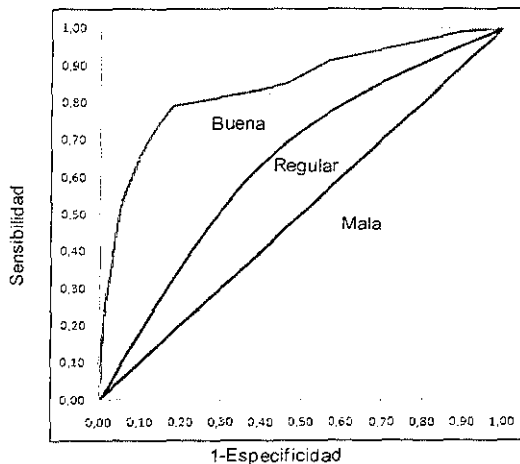


Figura 5. Tipos de curvas ROC

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las pérdidas económicas causadas por las enfermedades que provoca la bacteria *G. anatis*, son considerables para el sector avícola, debido a ésto, es de suma importancia obtener una metodología utilizando la técnica de ELISA (por sus siglas en inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, dadas sus ventajas para diagnosticar a tiempo la presencia de este patógeno en parvadas afectadas. Por lo que este estudio se enfocó en desarrollar un método de inmunodetección de anticuerpos específicos contra tres cepas de *G. anatis* confiable y consistente, con niveles de sensibilidad y especificidad adecuados que ayuden a medir la respuesta inmune después de la vacunación o dar seguimiento epidemiológico a los problemas en campo.

Actualmente existe una metodología de ELISA basada en la detección de anticuerpos contra *G. anatis* que utiliza antígenos preparados con la estructura completa de la bacteria, dando como resultado un antígeno de consistencia viscosa que impide colocar cantidades y concentraciones exactas en cada uno de los pozos de las placas de ELISA; además debido a la preparación del antígeno, existen gran cantidad de epítomos que pueden ser compartidos entre las bacterias que provocan otras enfermedades de interés en la industria avícola, lo que puede originar reacción cruzada y por tanto una disminución en la especificidad.

IV. OBJETIVOS

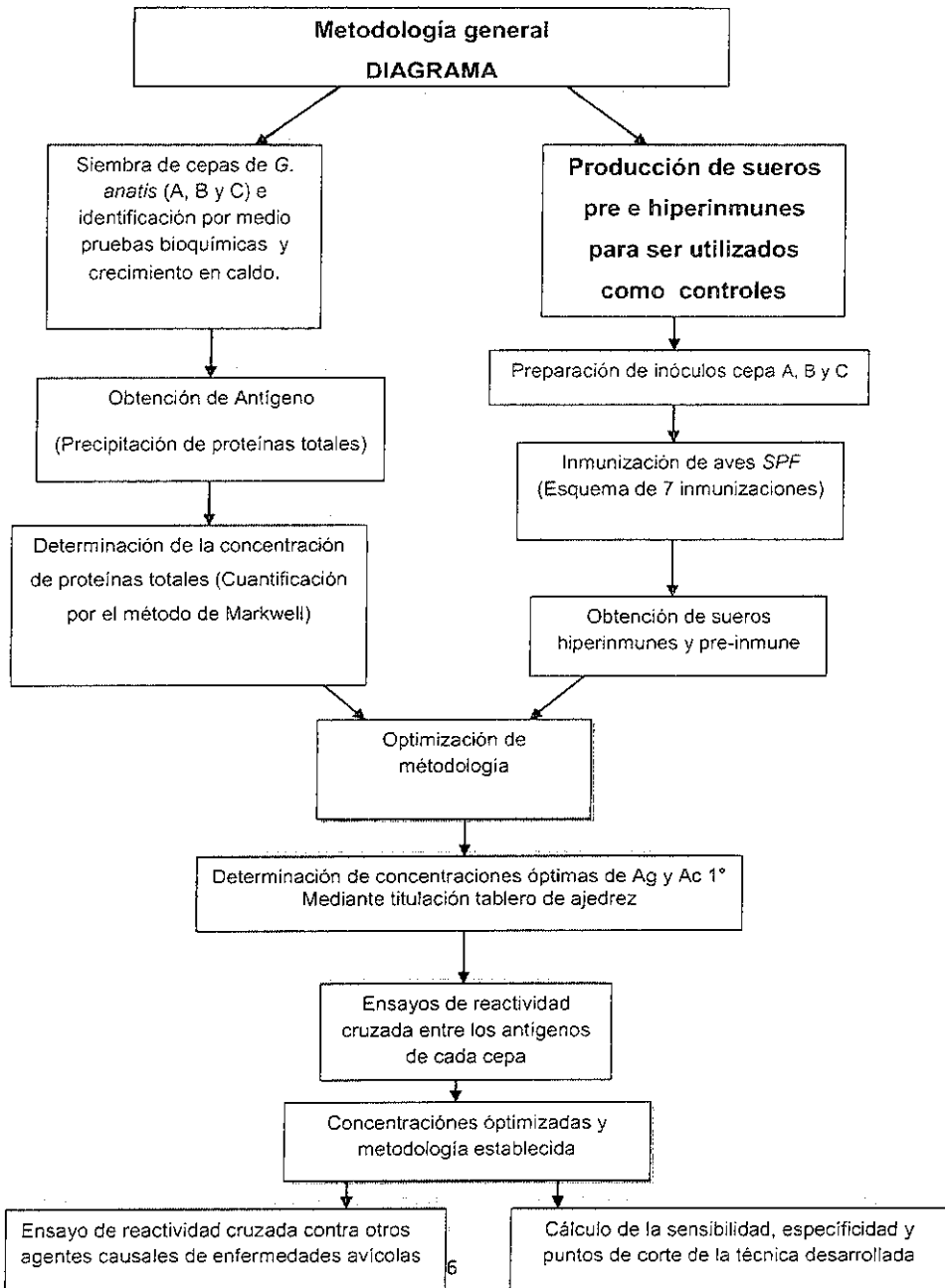
Objetivo General

Desarrollar una metodología de inmunodetección enzimática (ELISA) utilizando como antígeno proteínas totales, para detectar de manera específica anticuerpos contra *Gallibacterium anatis* de tres diferentes cepas (A, B y C) procedentes de Puebla y Yucatán, en sueros de aves.

Objetivos Específicos

- Cuantificar mediante el método de Markwell *et al.*, el rendimiento de proteínas totales extraídas de tres cepas de *G. anatis* en la misma fase de crecimiento.
- Determinar las concentraciones óptimas del antígeno protéico a usar mediante ensayos de titulación utilizando el método de tablero de ajedrez.
- Titular las diluciones óptimas del anticuerpo primario.
- Realizar ensayos de reactividad cruzada entre los antígenos de las tres cepas de *G. anatis*.
- Determinar valores de sensibilidad, especificidad y puntos de corte para la metodología de inmunodetección elaborada.
- Evaluar la efectividad de la metodología desarrollada, usando sueros de aves vacunadas con *G. anatis*.

V. MATERIAL Y MÉTODOS



Preparación de soluciones, amortiguadores y reactivos

La preparación de soluciones y amortiguadores utilizados en esta sección se adjuntan en el **anexo 1**.

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Bacterias

Tres diferentes cepas de *G. anatis* que fueron aisladas por el laboratorio de Investigación y Desarrollo de BIV fueron sembradas por estriado en placas de agar sangre e incubadas a 37°C durante 24 horas, posteriormente se observó el crecimiento y sus características morfológicas la cual fue descrita por Christensen, 2003.

Pruebas bioquímicas

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: determinación de indol, oxidasa (Difco) y catalasa para confirmar su identidad (**Figura 6**). Ver **anexo 2**.

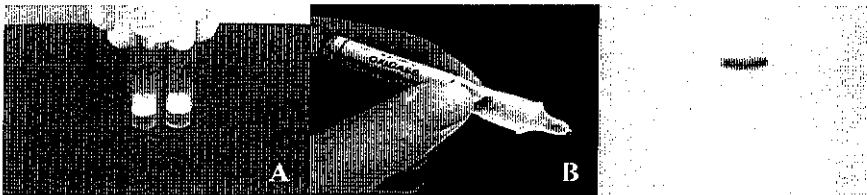


Figura 6. Pruebas bioquímicas para identificar *G. anatis*. A. Prueba de catalasa, B. Prueba de Oxidasa, C. Prueba de Indol

Medio de Cultivo

Ya identificadas las bacterias como *G. anatis*, se tomó una colonia aislada de cada cepa de *G. anatis* se inoculó en 200 ml de caldo triptosa estéril respectivamente. Los medios se incubaron a una temperatura de 37 °C, en agitación a 200 rpm durante 16 horas (Forma Orbital Shaker Thermo Electrón). Se

realizó una tinción de Gram para verificar la morfología de la bacteria antes de realizar el inóculo, y así asegurar que solamente había cocobacilos Gram -.

Obtención de antígeno

Como antígeno se utilizó extracto de proteínas totales de cada una de las cepas. A continuación se describe la metodología para la obtención de los mismos:

1. Los cultivos fueron centrifugados 6000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C y el sobrenadante fue desechado.
2. El sedimento se resuspendió por pipeteo, en 24 ml de solución de lisis que contenía 1.85N NaOH, 7.4% β-mercaptoetanol y 0.15 ml de mezcla de inhibidor de proteasas (Inhibitor proteases cocktail- Sigma, número de catálogo: P8465) y se incubaron en hielo durante 10 minutos.
3. Para precipitar las proteínas totales, se añadieron 24 ml de ácido tricloroacético (*TCA- Trichloroacetic acid*) al 50 % previamente almacenado a 4 °C y se dejaron en incubación en hielo durante 10 minutos.
4. Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C y el sobrenadante nuevamente fue desechado.
5. El sedimento fue resuspendido en 50 ml de acetona al 90 % previamente almacenada a -20 ° y se dejaron en incubación durante 20 minutos a una temperatura de -20 °C.
6. Posteriormente se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se desechó, para posteriormente resuspender la pastilla en 5 ml de Tris base 0.5M + 5% SDS.
7. Dado a que la pastilla es difícil de resuspender, la desintegración de la misma se realizó con un sonicador Ultrasonic cell disrupter Virsonic 100 a 0,8 mA y una frecuencia de 20 KHz durante tres minutos por seis ciclos en hielo, cerciorándose de que la pastilla estuviera completamente disuelta.

- Una vez resuspendida, 10 μ l de muestra de cada cepa fueron empleados para determinar la concentración de proteínas y con la proteína restante se realizaron alícuotas de 1 ml en crioviales para su conservación a -20°C .

Determinación de la concentración de proteínas

Para la cuantificación de proteínas de cada cepa de *G. anatis* se utilizó el método de Lowry modificado por Markwell *et al.*, (1978). Este método es más utilizado por los investigadores debido a su simplicidad, precisión y sensibilidad (Peterson, 1983). El método está basado en el desarrollo del color que se produce al reaccionar las proteínas con iones cúpricos y con el reactivo de Folin Ciocalteau, se divide en dos etapas que se describen a continuación.

- En condiciones alcalinas, el cobre (Cu^{+2}) forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas (reacción de tipo Biuret), reduciéndose a Cu^{+} .

- El Cu^{+} , junto con la tirosina y el triptófano de las proteínas reacciona con el reactivo de Folin-Ciocalteau originando un compuesto inestable que se reduce lentamente hasta dar lugar al reactivo molibdeno-túngstico de color azul. Dependiendo fundamentalmente de su contenido en tirosina y triptófano, las proteínas producen un color azul de distinta intensidad.

El método permite medir entre 10-100 μ g/ml, y como en cualquier técnica colorimétrica, existen variaciones según la proteína que se mida y según las condiciones del ensayo. Los reactivos que se utilizaron en esta técnica se enlistan en seguida:

- Solución A: Na_2CO_3 al 2 %; NaOH al 0.4 %; dodecil sulfato sódico (SDS) al 1 % y tartrato de sodio-potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) al 0,16 % en agua destilada.
- Solución B: $\text{CuSO}_4 (5 \text{ H}_2\text{O})$ al 4 % en agua destilada.
- Solución C: 100 partes de la solución A con 1 volumen de la solución B.

4.- Solución D: Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma No. de catálogo F9252) diluido en agua destilada en la proporción 1:1 (v/v).

La determinación de proteína se realizó en dos etapas:

1.- Se construyó una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA por sus siglas en inglés), proteína más usada como patrón para calcular la cantidad de proteínas totales en una muestra incógnita, con una concentración de 0 - 200 µg/ml y agua destilada como blanco.

Preparación de la curva estándar:

Se preparó una solución concentrada de la proteína BSA a una concentración de 200 µg en 3000 µl de agua destilada. A partir de esta solución se preparó la curva estándar de acuerdo al **cuadro 5**.

Tubo	Dilución de stock de proteína estándar (BSA)	Concentración final de BSA en µg/ml
1	1000 µl (stock) + 0 µl H ₂ O	200
2	800 µl (stock) + 200 µl H ₂ O	160
3	600 µl (stock) + 400 µl H ₂ O	120
4	400 µl (stock) + 600 µl H ₂ O	80
5	200 µl (stock) + 800 µl H ₂ O	40
6	0 µl (stock) + 1000µl H ₂ O	0

Cuadro 5. Preparación de la curva estándar con albúmina bovina sérica (BSA) con una concentración de 0 - 200 µg/ml.

2.- De las muestras que fueron analizadas, se hizo una dilución 1:100 en 1000 µL de agua destilada y se analizaron por triplicado. Una vez hecha la dilución de la muestra en un tubo cónico de 15 ml, se añadió a cada uno de los tubos 3 ml de la solución C, después de agitar, se dejaron los tubos en reposo a temperatura

ambiente durante 60 minutos. A continuación, se adicionaron a cada tubo 0,3 ml de la solución D y de nuevo, después de agitar, se dejaron los tubos en reposo a temperatura ambiente durante 45 minutos; transcurrido este tiempo se tomó 1 ml de cada tubo de las muestras y de cada tubo de la curva y se colocó en cubetas de espectrofotómetro y finalmente se midió la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro (Modelo Cintra 6), tomando como blanco el tubo de la curva que contiene 0µg/ml de concentración final de BSA.

Procesamiento de muestras y construcción de la curva estándar

Una vez que se obtuvieron las lecturas de las densidades ópticas de cada uno de los tubos de la curva y de las muestras, los datos se graficaron en el programa Excel, colocando la absorbancia en el eje de las "y" y la concentración en el eje de las "x" para obtener la regresión lineal de los puntos; obteniendo un coeficiente de correlación superior a 0.99.

Cuantificación de la concentración de proteínas en muestras

Para calcular la concentración de proteínas de cada muestra, las densidades ópticas obtenidas se interpolaron a la ecuación lineal obtenida con la curva estándar (**figura 7**), teniendo en cuenta el factor de dilución empleado para cada muestra; el cual fue multiplicado por el valor obtenido de la interpolación. Nota: Debido a que cada muestra fue analizada por triplicado, se calculó la concentración individualmente de cada una de las densidades ópticas y posteriormente se obtuvo el promedio.

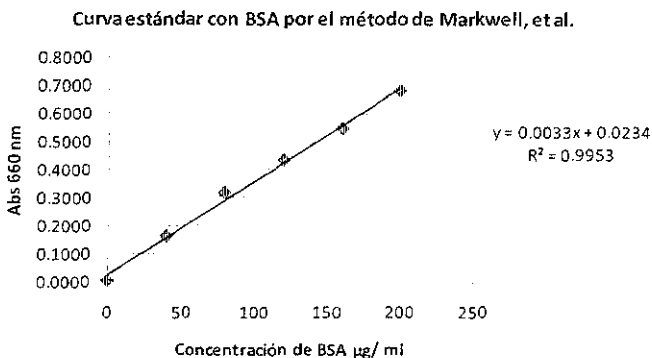


Figura 7. Ejemplo de curva estándar con BSA por el método de Markwell, et al., 1978, para poder determinar concentración de proteínas de una solución desconocida.

Producción de sueros pre e hiper inmunes como controles positivo y negativo.

Para el desarrollo de pruebas serológicas es necesario incluir sueros específicos con alta concentración de anticuerpos que sirvan como controles positivos, permitiendo la valoración e identificación del agente bacteriano en estudio y puedan ser utilizados con el fin de garantizar la fiabilidad de la prueba de ELISA.

Para obtener los controles positivos de ésta técnica fueron producidos sueros hiperinmunes mediante la inmunización de aves *SPF* (por sus siglas en ingles "*Specific Pathogen Free*"), a través de un esquema de siete inmunizaciones con suspensiones de los antígenos de las cepas A, B y C de *G. anatis* en PBS 1X, ajustados a una densidad óptica de 1.0, medidos a una longitud de onda de 575 nm e inactivados con formaldehido. Como controles negativos fueron utilizados sueros pre-inmunes, los cuales como su nombre lo indica son tomados antes de la inmunización de las aves para la elaboración de los sueros hiperinmunes. El procedimiento se describe a continuación:

Se formaron 4 grupos experimentales, cada uno con 15 aves *SPF* de 6 semanas de edad, estos grupos se designaron como: 1, 2, 3 y 4.

La preparación de los inóculos se realizó de la siguiente manera:

1. Se tomaron viales de la semilla de *G.anatis* de cada cepa, se descongelaron y sembraron en cajas de agar sangre con un hisopo estéril, hasta obtener un cultivo de alfombra en toda la superficie de la caja. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas.
2. Con un asa estéril se tomaron las colonias que crecieron de cada cepa y se resuspendieron en PBS 1X estéril.
3. Se ajustaron a una densidad óptica de 1.0, medidos a una longitud de onda de 575 nm; posteriormente se inactivaron con formaldehído a una concentración final de 0.09 % y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

La Inoculación de las aves se realizó de la siguiente manera:

1. Se inocularon las aves de los grupos 1, 2 y 3 con los inóculos de cada cepa de *G. anatis*. La vía de administración del inóculo fue intravenosa.
2. Se realizaron 7 aplicaciones con un periodo de 4 días entre cada una.
3. El grupo 4 se mantuvo sin inocular, ya que a partir de este se tomó el suero que sirvió como control negativo, además de que sirvió para validar que las aves de la prueba no tuvieron contacto con el agente de manera natural.
4. Cuatro días después de la última inoculación, se utilizó una bomba de vacío conectada a una aguja de calibre 18 y se insertó vía intracardiaca, con la finalidad de succionar la mayor cantidad de líquido sanguíneo de cada ave.
5. La sangre se colectó en matraces estériles, los cuales se mantuvieron a 37°C hasta observarse la separación de la fase sérica. Se extrajo el suero y se alicuató en viales, los cuales se identificaron y almacenaron a -20 ° C hasta su uso

Optimización de la Metodología

Se utilizaron parámetros establecidos para poder optimizar la metodología que se describen a continuación:

- Tiempo de fijación del Ag: durante 1 hr a 37° C
- Número de lavados: tres
- Tiempo de incubación de Ac primario: 1 hr durante a 37° C.
- Dilución y tiempo de incubación del Ac secundario: 1:4000 en PBS 1X, durante 1 hora a 37° C.
- Tiempo de incubación del sustrato cromógeno TMB: 1 min en oscuridad.
- Tiempo de la solución de paro: 1 min
- Lectura a 405 nm

Con la finalidad de saber si existe unión inespecífica entre antígeno y anticuerpo primario, entre antígeno- anticuerpo secundario ó contaminación de la solución cromógena, se realizó un experimento en donde las filas A-B de una placa de ELISA no fueron recubiertas con antígeno (para descartar contaminación de la solución cromógena); las filas C-D no se les añadió anticuerpo primario, pero si anticuerpo secundario y a las filas E-F no se les añadió anticuerpo secundario pero si anticuerpo primario (para verificar si existía unión inespecífica entre anticuerpos y antígeno).

Titulación del antígeno (Ag) y anticuerpo (Ac) primario y especificidad entre antígenos

Titulación del antígeno (Ag) y anticuerpo (Ac) primario

Con la finalidad de encontrar la concentración de trabajo del Ag y del Ac primario de cada cepa se utilizó el método llamado tablero de ajedrez, también llamado dilución en serie de dos dimensiones (**Figura 8**), este método se utiliza para optimizar las concentraciones de reactivos al realizar una ELISA indirecta que utiliza un anticuerpo secundario marcado.

Especificidad entre antígenos

Debido a que se obtuvieron antígenos de tres diferentes cepas de *G.anatis*, se realizaron ensayos para comprobar la especificidad de cada uno de ellos contra los anticuerpos primarios de cada cepa; el procedimiento se describe a continuación:

1. Se preparó una solución con antígeno a una concentración de 200µg/ ml (proteínas) de cada cepa, diluidos en amortiguador de dilución.
2. Se añadieron 200 µl de dicha solución a la columna 1, de tres placas de ELISA por cada antígeno, al resto de la placa solo se añadieron 100 µl del amortiguador de dilución.
3. Se realizaron diluciones seriadas 1: 2 en sentido horizontal, transfiriendo 100 µl de la columna 1 hasta la columna 12, pipeteando al menos 5 veces el mismo volumen en cada dilución para mezclar, al llegar a la columna 12 se desecharon los 100 µl restantes.

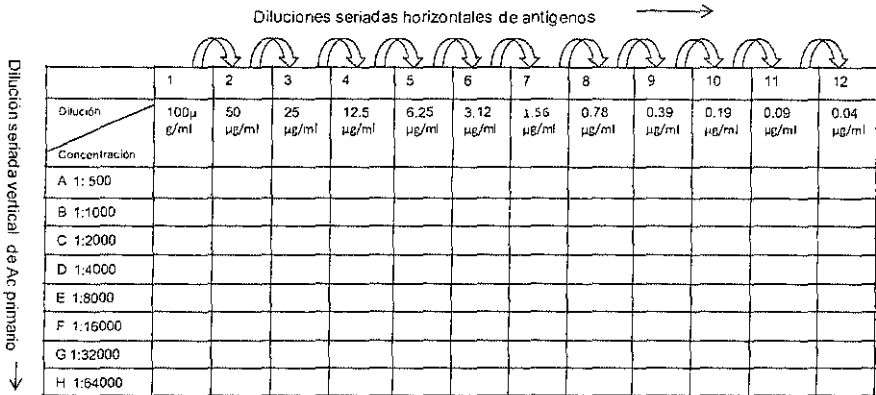


Figura 8. Titulación de tablero de ajedrez o diluciones en serie de dos dimensiones de antígeno contra anticuerpo primario para ELISA indirecta.

4. La adsorción del Ag a la placa de 96 pozos se llevó a cabo mediante 1 hora de incubación a 37 °C y después toda la noche a 4 °C; una vez transcurrido este tiempo el sobrenadante fue desechado.
5. Para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos, las placas fueron lavadas tres veces con 350 µl de solución de lavado en un lavador automático (Thermo Scientific Wellwash 4MK) e invertidas sobre papel absorbente, para eliminar cualquier exceso de la solución.
6. Posteriormente se preparó una dilución 1:500 en PBS 1X de cada Ac primario (suero hiperinmune).
7. A la primera placa de cada antígeno se les agregó 200 µl a cada pozo de la fila A (del pozo 1 hasta el pozo 12) de su suero hiperinmune específico, a las dos placas restantes de cada antígeno se les añadió 200 µl a cada pozo de la fila A (del pozo 1 hasta el pozo 12) de los otros dos sueros inespecíficos.
8. Se realizaron diluciones seriadas verticalmente, habiendo dispensado 100 µl de amortiguador de dilución en cada placa, de las filas B hasta la

columna H, pipeteando al menos 5 veces el mismo volumen en cada dilución para mezclar.

9. Las placas se incubaron durante 1hr a 37°C y después de realizar 3 lavados con la misma solución empleada en los primeros tres lavados de la misma manera que se describe en el paso 5.
10. Se añadió un anticuerpo de cabra anti-IgG de pollo (H+L) conjugado a peróxidasa (anticuerpo secundario) a una dilución de 1:4000 en PBS 1X, se incubaron durante 1 hora a 37° C.
11. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados como en el paso 5.
12. Posteriormente se agregaron 100µl a cada pozo de la placa del sustrato enzimático en solución TMB (*Tetramethylbenzidine liquid substrate system for ELISA*) y se almacenó a temperatura ambiente durante 1 minuto bajo oscuridad para que se llevará a cabo la reacción colorimétrica.
13. Para detener la reacción se añadieron 100 µl de ácido sulfúrico al 1N a cada pozo de la placa.
14. Por último la lectura de la placa se realizó mediante espectrofotometría a una densidad óptica (DO) de 405nm (Lector de ELISA Thermo Scientific SkanIt Software for Multiskan FC versión 2.5).

Técnica Inmuno enzimática (ELISA Indirecta)

Una vez determinados los parámetros adecuados, se estableció la siguiente metodología (ver figura 9)

1. Fijar cada pozo de la placa de ELISA con 100 µg de antígeno (proteínas totales) contenidos en 100 µl de amortiguador de dilución.
2. Incubar 1 hr a 37°C y posteriormente a 4°C durante toda la noche, para recubrir la placa según los estándares establecidos.
3. Lavar la placa 3 veces con 350 µl de solución de lavado y remover el exceso invirtiendo la placa sobre papel absorbente.
4. Añadir por triplicado el control positivo, el control negativo y las muestras en amortiguador de dilución de la siguiente manera: 1:4000 (cepas A y B) y 1:2000 (cepa C).
5. Incubar 1 hr a 37 °C.
6. Lavar las placas 3 veces con 350 µl de solución de lavado y remover el exceso invirtiendo las placas sobre papel absorbente.
7. Diluir el anticuerpo de cabra anti-IgG de pollo (H+L) conjugado a peróxidasa (anticuerpo secundario) 1: 4000 en amortiguador de dilución y añadir 100µl de esta dilución en cada pozo de la placa.
8. Incubar 1 h a 37 °C.
9. Lavar la placa 3 veces con 350 µl de solución de lavado y remover el exceso invirtiendo la placa sobre papel absorbente.
10. Añadir 100 µl por pozo TMB (solución cromógena).
11. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente en oscuridad.
12. Añadir 100µl de solución de paro a todos los pozos.

- Nota: Asegurarse de cubrir bien la placa, para reducir la humedad y evitar contaminación.
- Leer la absorbancia de todos los pozos en un espectrofotómetro a una densidad óptica (DO) de 405 nm (Lector de ELISA Thermo Scientific Skanit Software for Multiskan FC versión 2.5).
- Calcular el promedio y la desviación estándar de los triplicados del control positivo, control negativo y muestras.

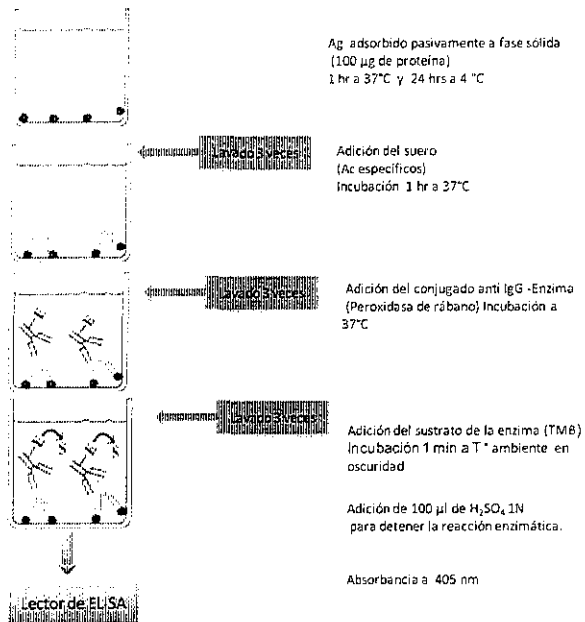


Figura 9. Determinación de anticuerpos séricos por el método de ELISA indirecta

Ensayo de reactividad cruzada con otros agentes

Para determinar si la técnica desarrollada no muestra reactividad cruzada contra sueros no relacionados o con presentaciones clínicas similares, se sensibilizaron placas con antígeno (proteínas totales) de cada una de las tres cepas, estas fueron probadas contra sueros hiperinmunes (marca SPAFA), contra agentes que afectan la industria avícola como son: virus de Influenza Aviar (AIV), virus de Newcastle (NDV), virus de síndrome de baja postura (EDS), virus de Fowl Pox (FP), virus de Gumboro (IBDV), virus de Bronquitis Infecciosa (IB), Marek, *Mycoplasma gallisepticum* (Mg), *Mycoplasma sinoviae* (Ms) y *Avivacterium paragallinarum* (AC), **figura 10**. Como control positivo se utilizó suero hiperinmune contra *G. anatis*, cepa correspondiente y como control negativo se utilizaron sueros preinmunes que fueron tomados de las aves SPF (libres de patógenos específicos) antes de la inmunización.

Las condiciones para las diferentes cepas de *G. anatis* se utilizaron según los resultados de los ensayos de titulación previamente realizados. Los controles positivos y negativos; así como los antisueros fueron diluidos 1:2000 para los antígenos A y B; y 1: 4000 para el antígeno C. Los antisueros se analizaron por triplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A	C+	C-	IA	IA	IA	ND	ND	ND				Placa fijada con antígeno
B	C+	C-	Ms	Ms	Ms	FP	FP	FP	IBDV	IBDV	IBDV	
C	C+	C-	Mk	Mk	Mk	IB	IB	IB				
D	C+	C-	EDS	EDS	EDS	IC	IC	IC				

IA	virus de Influenza Aviar
NDV	virus de Newcastle
EDS	virus de síndrome de baja postura
FP	virus de Fowl Pox
IBDV	virus de Gumboro
IB	virus de Bronquitis infecciosa
Mk	Marek
Mg	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
Ms	<i>Mycoplasma sinoviae</i>
IC	<i>Avivacterium paragallinarum</i>

Figura 10. Ensayo de reactividad cruzada contra agentes causantes de enfermedades avícolas.

Sensibilidad

Para validar la sensibilidad de la metodología obtenida, se analizaron sueros obtenidos de forma secuencial de aves Hy-line W36 de 3 semanas de edad, vacunadas experimentalmente 2 veces con una vacuna comercial. La primera vacunación se realizó a la tercera semana de edad y la segunda vacunación se realizó a la séptima semana de edad, obteniendo los sueros a la 1^a, 2^a, 3^a, 4^a semana post-vacunación 1 y 1^a, 2^a, 3^a, 4^a y 5^a semana post-vacunación 2.

Cálculos mediante curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*)

Con la finalidad de identificar un punto de corte que permitiera discriminar con alta sensibilidad y especificidad la seroconversión de las aves vacunadas contra las tres cepas de *G.anatis*, se analizaron los resultados de 30 sueros de aves no vacunadas (*SPF*), y se contrastaron con los resultados de 270 sueros de aves a diferentes tiempos post- vacunación (1^a, 2^a, 3^a, 4^a, semana post-vacunación 1 y 1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a post-vacunación 2), obtenidos mediante la metodología de ELISA indirecta desarrollada. Los promedios de los triplicados fueron calculados por el método de Curvas ROC mediante el programa estadístico Med Calc.

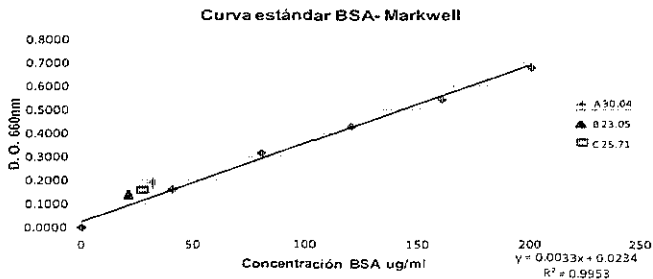
VI. RESULTADOS

Determinación de concentración de proteínas.

La determinación de concentración de proteínas para las tres cepas osciló generalmente en un rango de 20 mg/ml - 30 mg/ml, los cuales finalmente fueron ajustados a 100 μ g/ml con PBS 1X y leche descremada al 5 %. En la **gráfica 1** se muestra la curva estándar de BSA (albumina sérica bovina) y la determinación de concentración de proteínas totales de un lote de antígeno a partir de la ecuación de linealidad.

Curva estándar de BSA (stock: 50 mg/ml)			
Muestra	Concentración estimada (mg/ml)	Abs _{660nm}	Concentración final mg/ml real
BSA	0	0.0012	0.4
	40	0.1630	47.8
	80	0.3163	92.8
	120	0.4323	126.9
	160	0.5464	160.4
	200	0.6815	200.0

Muestra	Abs _{660nm}	Linearización	Factor de dilución	Concentración final mg/mL real	Concentración final mg/ml real	Promedio mg/ml
Cepa A	1.0717	317.6667	100	31,766.67	31.77	30.04
Cepa A	0.958	283.2121	100	28,321.21	28.32	
Cepa B	0.7645	224.5758	100	22,457.58	22.46	23.05
Cepa B	0.8033	236.3333	100	23,633.33	23.63	
Cepa C	0.86	253.5152	100	25,351.52	25.35	25.71
Cepa C	0.8836	260.6667	100	26,066.67	26.07	

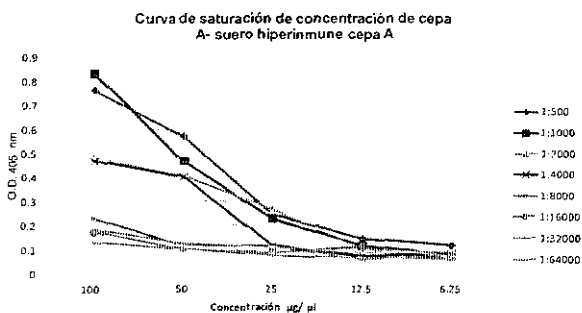


Gráfica 1. Curva estándar con BSA por el método de Markwell *et al.*, 1978, para poder determinar concentración de proteínas de una solución desconocida.

Antígeno y dilución del primer anticuerpo

Para determinar la concentración óptima del antígeno y la dilución del anticuerpo primario (suero hiperinmune) de la cepa A, se utilizó el método de tablero de ajedrez, donde se adsorbieron en las placas de ELISA cantidades decrecientes de proteínas totales (Ag), ordenadas horizontalmente, desde 100 μg hasta a 0.48 μg . Los sueros se diluyeron en la placa de ELISA en orden vertical usando diluciones seriadas del suero hiperinmune de cada cepa, en diluciones desde 1:500 hasta 1:32000. Se evaluó la reactividad de dos sueros dirigidos contra cepas distintas (ver metodología) para probar que no haya reacción cruzada con sueros dirigidos a las otras dos cepas, bajo el mismo rango de diluciones.

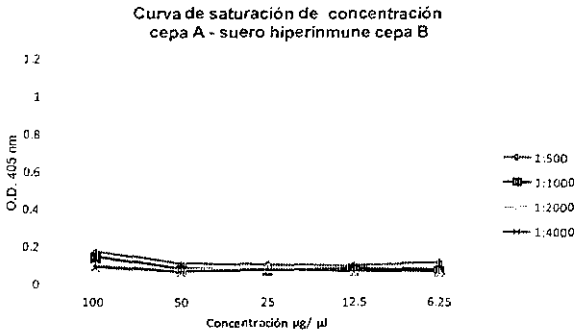
Los resultados obtenidos se graficaron en forma de curva de saturación para visualizar el efecto de dosis-respuesta con el suero hiperinmune dirigido a la cepa A (homólogo) **gráfica 2**, y con dos sueros heterólogos (**gráfica 3 y 4**).



Gráfica 2. Curva de saturación del antígeno cepa A con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa A (homólogo).

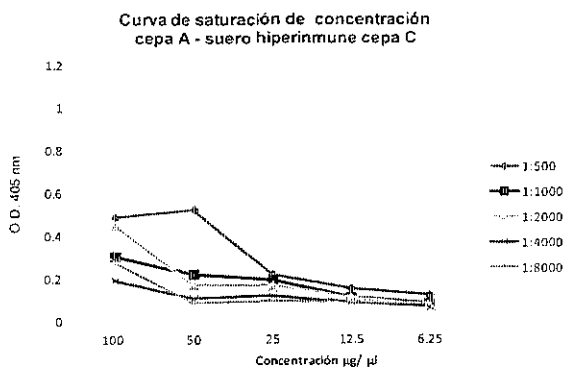
En el caso de la curva con el suero homólogo, se observa claramente un efecto dosis-respuesta cuando se adsorben cantidades de antígeno superiores a 12.5 μg . Este efecto se detecta usando el suero desde diluciones 1:4000 y menores. Los valores de densidad óptica superan 0.2 y alcanzan lecturas cercana a 1, lo cual sugiere un rango de detección de al menos 5 veces.

En el caso de la curva con el suero hiperinmune de la cepa B (heterólogo, **gráfica 3**), no se observó una curva dosis-respuesta, es decir, no se observan los efectos en las densidades ópticas a las diferentes diluciones y concentraciones utilizadas. Los valores de densidad óptica no superan lecturas de 0.2, lo cual coincide con la curva encontrada para el suero homólogo. Es decir, no hay reacción cruzada. Estos resultados indican que esta reacción es específica para el suero hiperinmune de la cepa A y no existe reactividad cruzada con el suero hiperinmune de la cepa B, bajo las condiciones probadas.



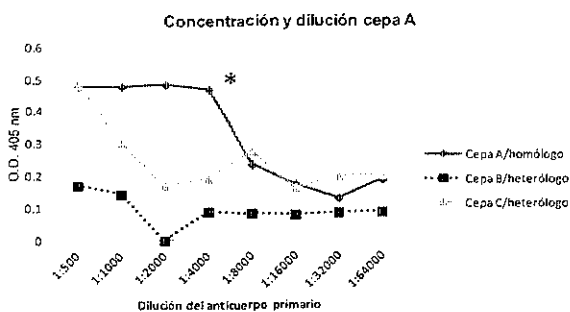
Gráfica 3. Curva de saturación del antígeno cepa A con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa B (heterólogo).

Mientras que en la curva de saturación con el suero hiperinmune de la cepa C (**gráfica 4**), se observa cierto comportamiento que indica dosis-respuesta, denotando reactividad cruzada en las diluciones menores. Sin embargo, las densidades ópticas alcanzadas son inferiores a las encontradas con el suero homólogo.



Gráfica 4. Curva de saturación del antígeno cepa A con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa C (heterólogo).

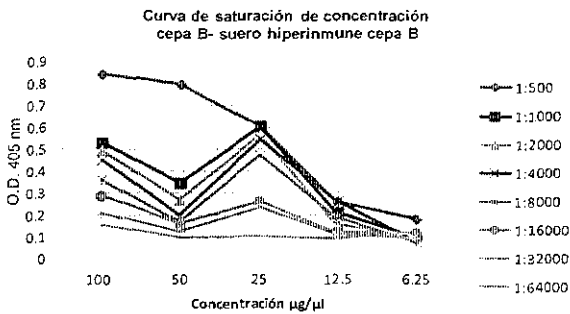
En la **gráfica 5** se muestran los valores de densidad óptica de los sueros hiperinmunes de cada cepa, a una concentración de 100 µg de Ag y en las diferentes diluciones utilizadas (desde 1:500 hasta 1:32000), en donde se concluye que en el rango de diluciones de 1:1000 hasta 1:4000 se encuentra una diferencia entre las cepas.



Gráfica 5. Curva de saturación a una concentración de 100 µg de antígeno de la cepa A de *G. anatis* a diferentes diluciones del anticuerpo primario cepa A (homóloga), cepa B y cepa C (heterólogas). * Indica la dilución óptima.

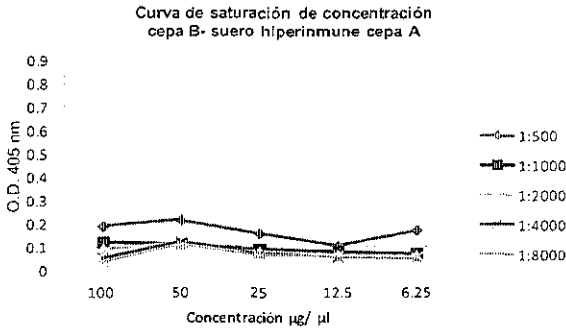
Para determinar la concentración óptima del antígeno y la dilución del anticuerpo primario (suero hiperinmune) de la cepa B se utilizó el mismo procedimiento descrito para la cepa A.

En el caso de la curva con el suero homólogo cepa B (**gráfica 6**), se observa claramente un efecto dosis-respuesta cuando se adsorben cantidades de antígeno superiores a 6.25 μg . Este efecto se detecta usando el suero desde diluciones 1:8000 y menores. Los valores de densidad óptica superan 0.2 y alcanzan lecturas cercanas a 9.0, lo cual sugiere un rango de detección de al menos 4.5 veces.



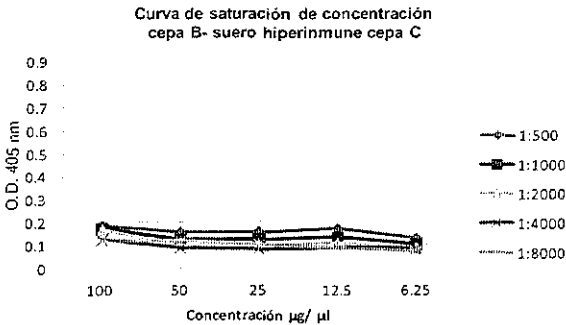
Gráfica 6. Curva de saturación de antígeno cepa B con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa B (homólogo).

En el caso de la curva con el suero hiperinmune de la cepa A (heterólogo, **gráfica 7**), no se observó una curva dosis-respuesta, es decir, no se observan los efectos en las densidades ópticas a las diferentes diluciones y concentraciones utilizadas. El mayor valor de densidad óptica alcanzado fue 0.2 en la dilución menor, mismas densidades ópticas obtenidas en las diluciones mayores en la placa homóloga; estos resultados indican que no hay reacción cruzada con este suero hiperinmune.



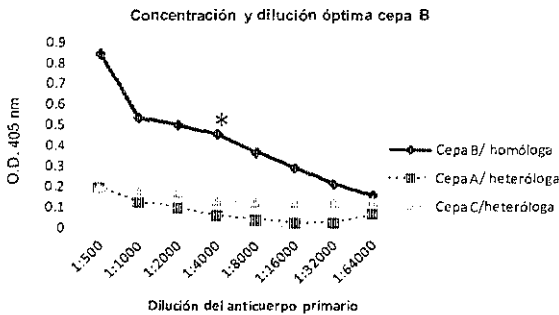
Gráfica 7. Curva de saturación de antígeno cepa B con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa A (heterólogo).

En la curva con el suero hiperinmune de la cepa C (gráfica 8), al igual que la gráfica anterior no se observó un efecto dosis-respuesta, alcanzando densidades ópticas no mayores a 0.2 denotando que no existe reactividad cruzada del Ag cepa B con este suero hiperinmune heterólogo.



Gráfica 8. Curva de saturación del antígeno cepa B con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa C (heterólogo).

En la gráfica 9 se graficaron las densidades ópticas de los sueros hiperinmunes de cada cepa, a una concentración de 100 µg de Ag y en las diferentes diluciones utilizadas (desde 1:500 hasta 1:32000), en donde se concluye que en el rango de diluciones de 1:500 hasta 1: 8000 se observa una diferencia entre las cepas. (*) Indica la dilución elgida.

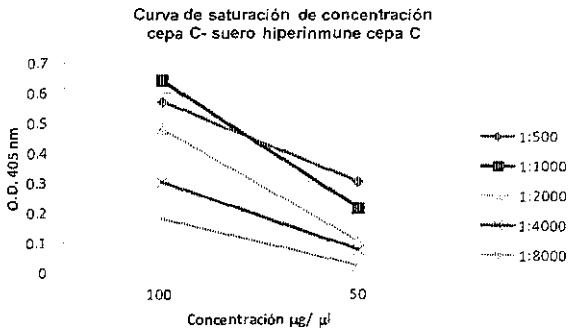


Gráfica 9. Curva de saturación con una concentración de 100 μg de antígeno de la cepa B de *G. anatis* a diferentes diluciones del anticuerpo primario cepa B (homóloga), cepa A y cepa C (heterólogas).

Para determinar la concentración óptima del antígeno y la dilución del anticuerpo primario (suero hiperinmune) de la cepa C se utilizó el mismo procedimiento descrito para la cepa A y B.

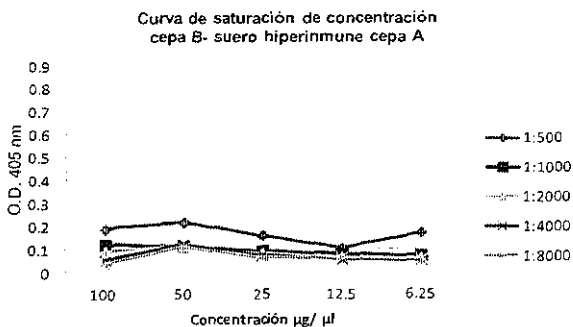
Las siguientes curvas, solo se graficaron en un rango de concentración de 100 y 50 μg , ya que en las demás concentraciones el espectrofotómetro no fue capaz de realizar lecturas con una densidad óptica de 405 nm en las demás concentraciones.

En la curva con suero hiperinmune cepa C (homóloga), solo se observó linealidad bajo las condiciones mostradas en la **gráfica 10** (100 y 50 μg , diluciones desde 1:500 hasta 1: 8000). Los valores de densidad óptica superan lecturas cercanas a 0.2 y alcanzan lecturas cercanas a 0.7, con la cantidad de Ag más grande, lo cual sugiere un rango de detección de al menos 3.5 veces en esta concentración.



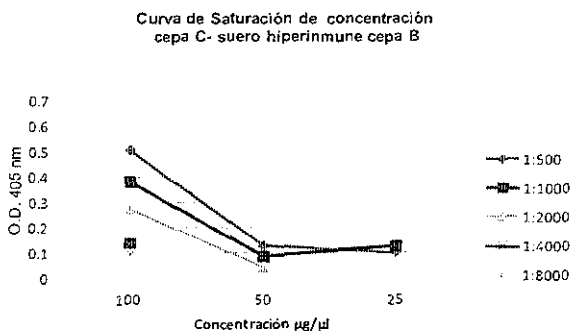
Gráfica 10. Curva de saturación de antígeno cepa C con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa C (homólogo).

En cuanto a la curva con el suero hiperinmune cepa A (heterólogo), solo se observó linealidad bajo las condiciones mostradas en la **gráfica 11** (100 y 50 μg y desde 1:500 hasta 1:4000). En donde los valores de densidad óptica alcanzadas fueron lecturas de 0.2 y fue obtenida en la menor dilución, lo que indica que no existe reactividad cruzada con el Ag cepa C.



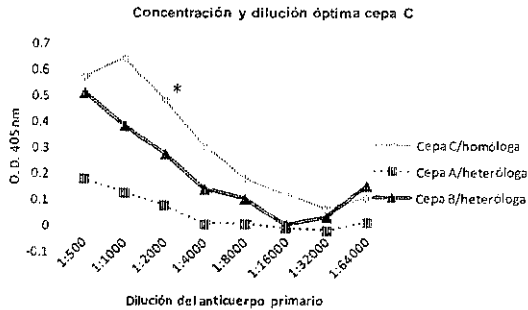
Gráfica 11. Curva de saturación de antígeno cepa C con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa A (heterólogo).

En cuanto a la curva con suero hiperinmune cepa B, sólo se observó linealidad en las condiciones mostradas en la **gráfica 12** (100, 50 y 25.5 μg y diluciones desde 1:500 hasta 1: 4000). En donde los valores de densidad óptica superan lecturas a 0.1 y alcanzan lecturas a 0.5.



Gráfica 12. Curva de saturación de antígeno cepa C con diferentes concentraciones de antígenos y a diferentes diluciones del suero hiperinmune cepa B (heterólogo).

En la **gráfica 13** se graficaron las densidades ópticas de los sueros hiperinmunes de cada cepa, a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ag y en las diferentes diluciones utilizadas (desde 1:500 hasta 1:64,000), en donde se concluye que se observa una diferencia entre las cepas de al menos el doble a partir de la dilución 1:500 hasta 1:2000. (*) Indica la dilución elgida.



Gráfica 13. Curva de saturación de la fase sólida con 100 µg de antígeno cepa C de *G. anatis* a diferentes diluciones del anticuerpo primario cepa C (homóloga), cepa A y cepa B (heterólogas).

Luego del análisis de las diferentes condiciones probadas para encontrar la concentración y diluciones de trabajo más adecuadas de cada una de las cepas, el **cuadro 6**, resume los resultados de dosis-respuesta para los sueros probados, el cual sugiere una concentración de antígeno de 100 µg/ml por pozo para las tres cepas y una dilución del primer anticuerpo de 1:4000 para las cepas A y B; mientras que para la cepa C una dilución de 1:2000, logrando con estas condiciones diferenciar anticuerpos entre cada una de las cepas a una lectura de longitud de onda de 405nm.

Cepa	Concentración de antígeno óptima	Dilución de anticuerpo primario (Suero hiperinmune)
A	100 µg / ml	1:4000
B	100 µg / ml	1:4000
C	100 µg / ml	1:2000

Cuadro 6. Condiciones de detección del antígeno y anticuerpo primario óptimas, en donde NO se observó reactividad cruzada.

Así mismo la dilución óptima para los anticuerpos conjugados fue la de 1:4000.

Especificidad de la unión de antígeno y anticuerpo

De acuerdo al **cuadro 7**, se observa que en las filas A-B de una placa ELISA las cuales no fueron fijadas con antígeno, la solución cromógena no desarrolló color, descartando contaminación de la solución cromógena utilizada.

Las filas B-C a las cuales no se les añadió Ac primario y las filas C-D a las que no se les añadió Ac secundario, no emitieron ningún tipo de señal visual o cambio de color después de la adición del sustrato cromogénico, y se confirmó al medir la absorbancia en el espectrofotómetro (405 nm), de acuerdo a los resultados de los promedios de las densidades ópticas de los controles positivos de cada una de las cepas, comprobando que no existe unión inespecífica entre antígenos y anticuerpos (primario y secundario). Esto se corroboró mediante el análisis estadístico comparando los promedios de los controles positivos y los promedios de cada una de las filas, por medio de la prueba t de estudent, con un valor de significancia de $p \leq 0.05$.

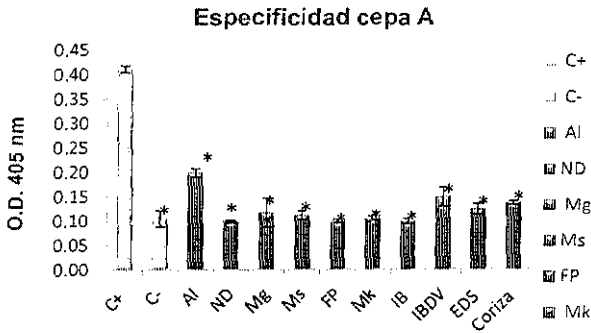
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.079	0.076	0.073	0.079	0.097	0.086	0.123	0.099	0.098	0.104	0.081	0.093	Sin Ag
B	0.069	0.05	0.052	0.057	0.05	0.049	0.05	0.053	0.05	0.058	0.061	0.061	
C	0.065	0.144	0.057	0.063	0.137	0.096	0.051	0.059	0.061	0.064	0.059	0.079	Sin Ac 1°
D	0.104	0.063	0.052	0.06	0.078	0.057	0.051	0.104	0.095	0.068	0.119	0.071	
E	0.052	0.056	0.053	0.047	0.092	0.055	0.054	0.052	0.063	0.075	0.054	0.057	Sin Ac 2°
F	0.058	0.092	0.064	0.06	0.054	0.048	0.056	0.052	0.054	0.06	0.048	0.052	
G	0.442	0.445	0.091	0.111	0.408	0.474	0.119	0.108	0.480	0.481	0.107	0.105	C+
H	0.447	0.448	0.097	0.091	0.423	0.408	0.093	0.112	0.471	0.474	0.104	0.095	C-
	Cepa A				Cepa B				Cepa C				

	cepa A		cepa B		cepa C	
	Promedio D.O.	Desv. Est.	Promedio D.O.	Desv. Est.	Promedio D.O.	Desv. Est.
C+	0.446	0.00	0.428	0.03	0.476	0.00
C-	0.098	0.00	0.108	0.01	0.103	0.00
Sin Ag	0.067	0.01	0.075	0.02	0.075	0.02
Sin Ac 1°	0.076	0.03	0.079	0.03	0.077	0.02
Sin Ac 2°	0.060	0.01	0.057	0.01	0.057	0.00

Cuadro 7. Experimento para comprobar la especificidad de la unión de antígeno y anticuerpo y descartar contaminación de la solución cromógena.

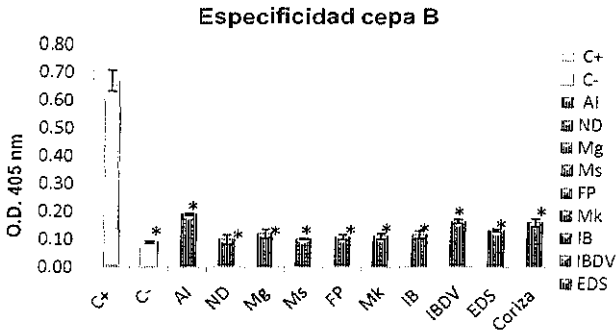
Especificidad (Reactividad cruzada con antisueros de agentes causantes de enfermedades avícolas).

En cuanto a la especificidad, para la cepa A se observó que existe una diferencia significativa entre el control positivo y las 10 enfermedades avícolas contra las que fue probada, ésto de acuerdo a los resultados arrojados por la prueba estadística T-estudent con un valor de significancia de $p \leq 0.05$ y Tukey (con un valor de significancia de $p \leq 0.01$) **gráfica 14**.



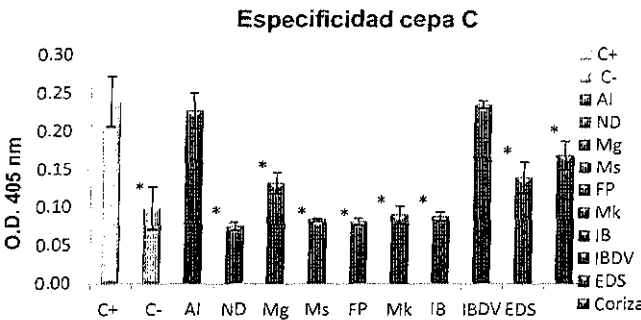
Gráfica 14. Especificidad de la cepa A probada con sueros hiperinmunes contra agentes causantes de enfermedades avícolas.

Los resultados de la especificidad para la cepa B mostraron que no existe reacción cruzada con ninguno de los 10 agentes con las que fue probada, debido a que existe diferencia significativa de acuerdo a la prueba estadística T-estudent y Tukey con los mismos valores de significancia ($p \leq 0.05$ y $p \leq 0.01$ respectivamente) **gráfica 15**.



Gráfica 15. Especificidad de la cepa B probada con sueros hiperinmunes contra agentes causantes de enfermedades avícolas.

En la **gráfica 16** se observa que en la cepa C, a diferencia de los resultados de la cepa A y B, existe reacción cruzada respecto al control positivo con el promedio de Influenza Aviar (IA) y la enfermedad de gumboro (IBDV).



Gráfica 16. Especificidad de la cepa C probada con sueros hiperinmunes contra agentes causantes de enfermedades avícolas.

El **Cuadro 8** muestra los resultados de las diferencias analizadas por la prueba de Tukey, en donde los promedios de las D.O. con diferentes superíndices en la misma fila son significativamente diferentes con una probabilidad de $P < 0.01$.

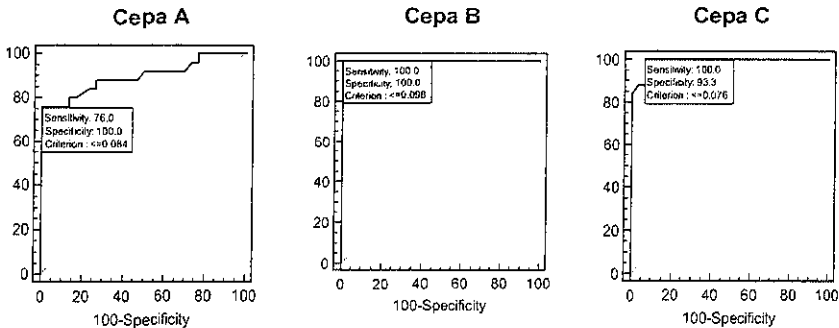
Cepa	C+	C-	AI	ND	Mg	Ms	FP	Mk	IB	IBDV	EDS	CI
A	0.373 ^a	0.110 ^b	0.198 ^b	0.098 ^b	0.118 ^b	0.111 ^b	0.097 ^b	0.109 ^b	0.099 ^b	0.149 ^b	0.123 ^b	0.136 ^b
B	0.683 ^a	0.086 ^b	0.190 ^b	0.098 ^b	0.122 ^b	0.100 ^b	0.107 ^b	0.111 ^b	0.116 ^b	0.164 ^a	0.133 ^b	0.160 ^b
C	0.233 ^a	0.085 ^b	0.227 ^a	0.074 ^b	0.131 ^b	0.082 ^b	0.080 ^b	0.089 ^b	0.087 ^b	0.234 ^a	0.138 ^b	0.167 ^b

Cuadro 8. Resultados de la prueba de Tukey de la comparación de las cepas A, B y C de *G. anatis* contra las 10 diferentes enfermedades avícolas.

Sensibilidad y especificidad Curvas ROC

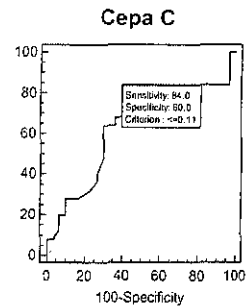
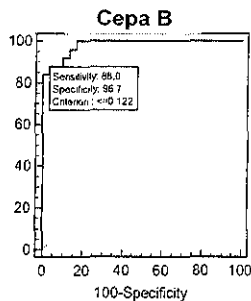
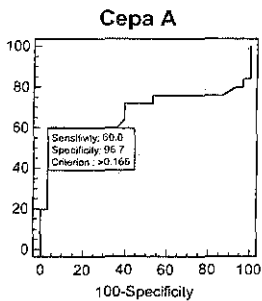
A continuación se presenta el informe detallado de las curvas ROC por semana post-vacunación en donde *AUC* significa área bajo la curva ROC por sus siglas en inglés (*area under curve*) y el punto de corte (*cut-off*) que ofreció la mejor sensibilidad y especificidad.

1^{er} SEMANA POST-VACUNACIÓN 1



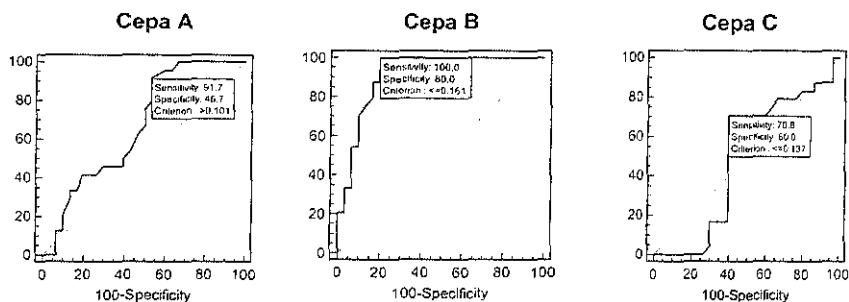
Cepas	A	B	C
Área bajo la curva	0.897	1.000	0.991
Error estándar	0.0470	0.000	0.00749
95% CI	0.786 a 0.963	0.935 a 1.000	0.919 a 1.000
Significancia (Área=0.5)	0.0001	0.000	0.0001
Cutoff (densidad óptica)	0.084	0.098	0.076
Sensibilidad (%)	76	100	100
Especificidad (%)	100	100	93.3

2do SEMANA POST-VACUNACIÓN 1



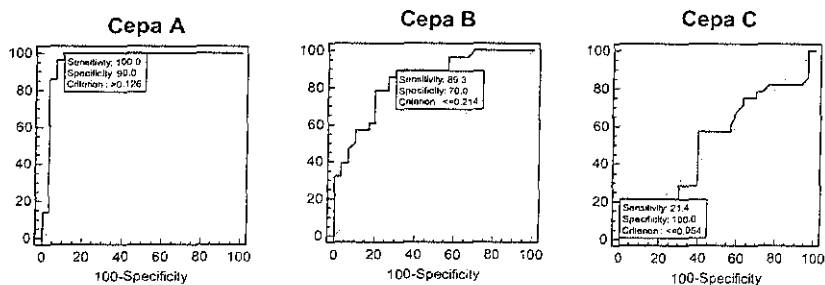
Cepas	A	B	C
Área bajo la curva	0.683	0.983	0.652
Error estándar	0.0846	0.0120	0.0790
95% CI	0.544 a 0.802	0.904 a 1.000	0.512 a 0.775
Significancia (Área=0.5)	0.0302	0.0001	0.0544
Cutoff (densidad óptica)	0.166	0.122	0.11
Sensibilidad (%)	60	88.0	84.0
Especificidad (%)	96.7	96.7	60.0

3er SEMANA POST-VACUNACIÓN 1



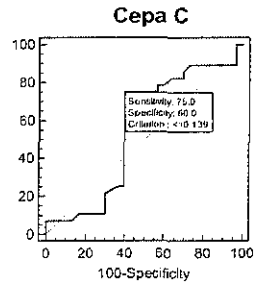
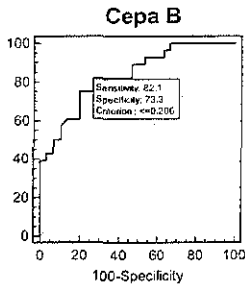
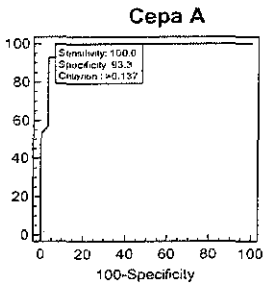
Cepas	A	B	C
Área bajo la curva	0.669	0.915	0.492
Error estándar	0.0743	0.0397	0.0836
95% CI	0.527 a 0.791	0.807 a 0.974	0.353 a 0.631
Significancia (Área=0.5)	0.0231	0.0001	0.9206
Cutoff (densidad óptica)	0.101	0.161	0.137
Sensibilidad (%)	91.7	100.0	70.8
Especificidad (%)	46.7	80.0	60.0

4ª SEMANA POST-VACUNACIÓN 1



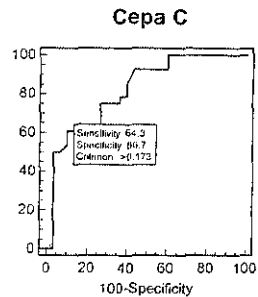
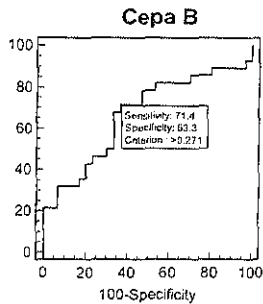
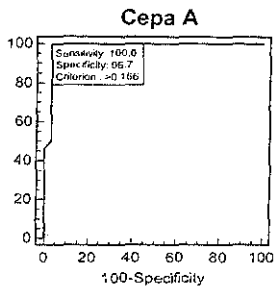
Cepas	A	B	C
Área bajo la curva	0.965	0.846	0.534
Error estándar	0.0291	0.0504	0.0787
95% CI	0.881 a 0.996	0.728 a 0.928	0.398 a 0.666
Significancia (Área=0.5)	0.0001	0.0001	0.6663
Cutoff (densidad óptica)	0.126	0.214	0.054
Sensibilidad (%)	100.00	89.29	21.43
Especificidad (%)	90.00	70.00	100.00

1ª SEMANA POST- VACUNACIÓN 2



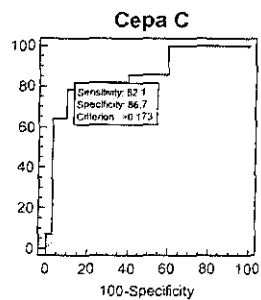
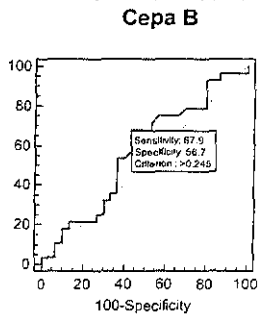
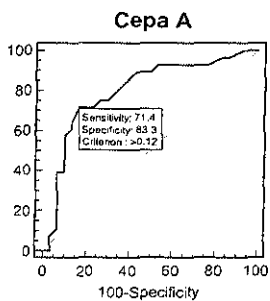
Cepas	A	B	C
Área bajo la curva	0.983	0.836	0.554
Error estándar	0.0155	0.0515	0.0804
95% CI	0.908 a 1.000	0.716 a 0.920	0.418 a 0.685
Significancia (Área=0.5)	0.0001	0.0001	0.5007
Cut off (densidad óptica)	0.137	0.206	0.139
Sensibilidad (%)	100.00	82.14	75.00
Especificidad (%)	93.33	73.33	60.00

2ª SEMANA POST- VACUNACIÓN 2



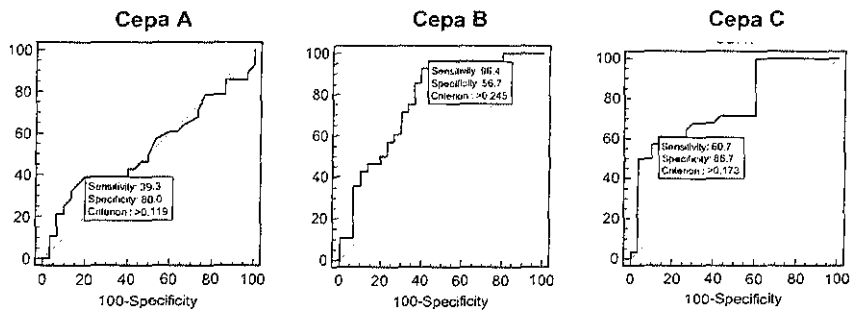
Cepas	A	B	C
Área bajo la curva	0.983	0.669	0.826
Error estándar	0.0175	0.0734	0.0546
95% CI	0.908 a 1.000	0.533 a 0.787	0.703 a 0.913
Significancia (Área=0.5)	0.0001	0.0214	0.0001
Cutoff (densidad óptica)	0.166	0.271	0.173
Sensibilidad (%)	100.00	71.43	64.29
Especificidad (%)	96.67	63.33	86.67

3ª SEMANA POST- VACUNACIÓN 2



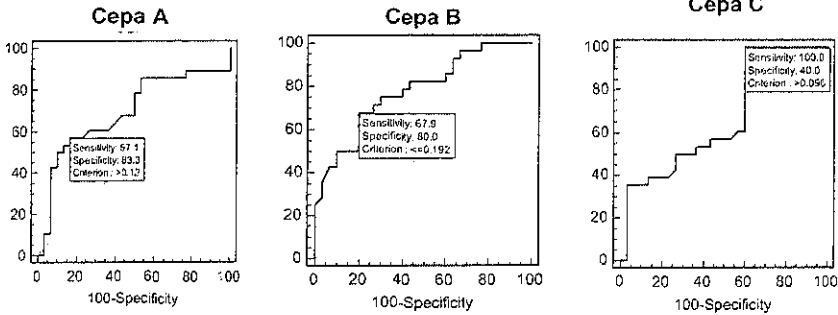
Cepas	A	B	C
Área bajo la curva	0.799	0.570	0.862
Error estándar	0.0618	0.0771	0.0512
95% CI	0.673 a 0.893	0.433 a 0.699	0.746 a 0.938
Significancia (Área=0.5)	0.0001	0.3663	0.0001
Cutoff (densidad óptica)	0.12	0.245	0.173
Sensibilidad (%)	71.43	67.86	82.14
Especificidad (%)	4.29	56.67	86.67

4ª SEMANA POST- VACUNACIÓN 2



Cepas	A	B	C
Área bajo la curva	0.529	0.782	0.767
Error estándar	0.0790	0.0614	0.0636
95% CI	0.393 a 0.661	0.654 a 0.880	0.637 a 0.868
Significancia (Área=0.5)	0.7176	0.0001	0.0001
Cutoff (densidad óptica)	0.119	0.245	0.173
Sensibilidad (%)	39.3	96.4	60.7
Especificidad (%)	80.0	56.7	86.7

5ª SEMANA POST-VACUNACIÓN 2



Cepas	A	B	C
Área bajo la curva	0.693	0.783	0.671
Error estándar	0.0734	0.0600	0.0725
95% CI	0.559 a 0.808	0.655 a 0.880	0.536 a 0.789
Significancia (Área=0.5)	0.0084	0.0001	0.0181
Cutoff (densidad óptica)	0.12	0.192	0.096
Sensibilidad (%)	57.14	67.86	100.00
Especificidad (%)	83.33	80.00	40.00

En el Cuadro 9 se observan los puntos de corte que ofrecieron los mejores pares de sensibilidad y especificidad cada semana post vacunación 1 y vacunación 2, para cada una de las cepas.

Cepas	% Sensibilidad			% Especificidad			Puntos de corte		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Semanas post- vacunación 1									
2*	60	88	84	96.7	96.7	60	≥0.166	≤0.122	≤0.11
3*	91.7	100	70.8	46.7	80	60	≥0.101	≤0.161	≤0.137
4*	100	89.3	21.4	90	70	100	≥0.126	≤0.214	≤0.054
Semanas post- vacunación 2									
1*	100	82.1	75	93.3	73.3	60	≥0.137	≤0.206	≤0.139
2*	100	71.4	64.3	96.7	63.3	86.7	≥0.166	≥0.271	≥0.173
3*	71.4	67.9	82.1	83.3	56.7	86.7	≥0.12	≥0.271	≥0.173
4*	39.3	96.4	60.7	80	56.7	86.7	≥0.119	≥0.248	≥0.173
5*	57.1	67.9	100	83.3	80	40	≥0.12	≤0.192	≥0.096

Cuadro 9. Puntos de corte que ofrecieron los mejores pares de sensibilidad y especificidad de cada semana post vacunación 1 y 2.

Los resultados muestran que el ensayo de ELISA desarrollado tiene un comportamiento distinto entre cada cepa y entre cada semana de muestreo de suero. Como se puede observar, los distintos puntos de corte establecidos por las curvas ROC dan un comportamiento aceptable (arriba del 80% tanto en sensibilidad y especificidad) en el ELISA de la cepa A, a partir de la 4° semana post- vacunación 1, hasta la 2° semana post-vacunación 2; para la cepa B un comportamiento similar en la 2° y 3° semana post-vacunación 1 y para la cepa C, la 3^{er} semana post- vacunación 2 arroja porcentajes de sensibilidad y especificidad arriba del 80 %.

I. DISCUSIÓN

La serología es un método utilizado para el diagnóstico de enfermedades, constituyéndose hoy en día como una herramienta de fundamental importancia en programas de medicina preventiva para el combate de enfermedades avícolas; como la causada por *Gallibacterium anatis*, que es un agente responsable de grandes pérdidas económicas que hoy sufren los avicultores en la producción de huevo.

Existen otras técnicas recientemente desarrolladas para identificar *G. anatis*, como la PCR punto final y PCR tiempo real (Bojesen *et al.*, 2007; Robles *et al.*, 2009). Sin embargo, estas técnicas solo permiten detectar y cuantificar el material genómico de la bacteria, pero no la respuesta humoral provocada por dicho agente, la cual puede ser observada a través de la seroconversión mediante un ensayo de ELISA.

El principal objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo mediante un ensayo de ELISA indirecta, para determinar la presencia de anticuerpos contra *Gallibacterium anatis* en sueros de aves *Gallus gallus*, utilizando como antígeno proteínas totales de tres cepas de *G. anatis*. El rendimiento proteico obtenido osciló en un rango de 20-30 mg/μl; éstas concentraciones fueron determinadas por el método de Markwell, mismo utilizado por Guerlava *et al.*, 1998, reportando en su trabajo que, en comparación con el método de Bradford, se obtiene una mayor concentración de proteínas. Otra ventaja de este método es, que al utilizar el ácido tricloroacético (TCA- *Trichloroacetic acid*), se elimina la posible interferencia con reactivos utilizados en la precipitación de proteínas, como el 2-betamercaptoetanol y el Tris –Base (John Wiley, 2006).

La concentración de antígeno elegida fue de 100 μg / en 100 μl por pozo, la cual es considerada alta de acuerdo a las recomendaciones de Abcam® en su protocolo (Abcam, 2010), donde refiere que al menos el 3 % del antígeno debe ser proteína, y la concentración del antígeno no deberá tener una concentración mayor a 20 μg/ μl por pozo en proteínas puras. Sin embargo, debido a que aún no se conoce la proteína o proteínas inmunogénicas de *Gallibacterium anatis* que

reaccionan contra el suero hiperinmune, se utilizaron proteínas totales y se incrementó 5 veces la cantidad para asegurar la presencia de antígeno necesario para reaccionar con los anticuerpos primarios.

La no reactividad cruzada que mostró la técnica de ELISA con las tres cepas de *G. anatis*, al ser probada contra 10 diferentes sueros hiperinmunes de enfermedades de importancia avícola, fue considerada como buena, a excepción de la cepa C, que presentó reacción cruzada contra las enfermedades virales de Influenza Aviar (IA) y la enfermedad de Gumboro (IBD). Estos resultados pueden atribuirse a que el control positivo utilizado en este ensayo en específico mostró valores de densidad óptica por debajo del promedio usual que presentaron los controles positivos de las cepas A y B; el cual estaba en un rango de 0.4-0.66 valores de D.O.

Cabe destacar que, aún cuando estos ELISAs mostraron reacción cruzada para virus aviáres, la metodología desarrollada en el presente estudio fue diseñada para detectar bacterias; sin embargo, se desafió contra sueros hiperinmunes de ambos tipos de agentes, pues se buscaba tener un amplio conocimiento en el desempeño de esta técnica, considerando que *G. anatis* es una de las enfermedades de mayor prevalencia en las granjas avícolas mexicanas.

Al no contar con un punto de corte o un patrón de referencia para conocer la sensibilidad y especificidad de este ensayo, mediante un cuadro de contingencia 2-2, se utilizaron las Curvas ROC, las cuales son una herramienta que, además de dar a conocer estos dos parámetros, proporciona diferentes valores de puntos de corte (Burgueño, 1995). Esta herramienta ha sido utilizada por otros autores como Srinand *et al.*, 1996, para la detección de anticuerpos de *Pasteurella haemolytica* y otras enfermedades aviáres (Singh, 2010).

Se sabe que la sensibilidad y la especificidad se relacionan inversamente en función del punto de corte elegido; por lo tanto, es necesario tener en cuenta que

las características del funcionamiento del ensayo deseadas (sensibilidad y especificidad) sean elegidas (Swets, 1988).

En este ensayo de ELISA se buscó obtener valores altos de sensibilidad por encima de la especificidad, como mencionan Van der Goot *et al.*, 2009, debido a que se detectaron anticuerpos inducidos por dos vacunaciones, aunque en su trabajo evaluaron la respuesta de anticuerpos producidos en aves vacunadas contra IA.

Se encontraron porcentajes de sensibilidad arriba del 96.7 % en cada cepa; sin embargo, estos porcentajes se observaron a diferentes semanas después de cada vacunación. Para la cepa A se mostraron en la segunda semana, después de la primera vacunación, para la cepa B tres semanas después de la primera vacunación, y para la cepa C en la tercera semana después de la segunda vacunación, en donde los valores del punto de corte para cada cepa fueron bajos. Estos resultados concuerdan con Swets, 1988 el cual menciona que si los valores del punto de corte son bajos, generalmente son asociados con alta sensibilidad y baja especificidad y viceversa.

Aunque se eligieron puntos de corte en donde la sensibilidad esta por arriba de la especificidad, los porcentajes de esta última para cada cepa, fueron igual o mayores al 80 %, en las mismas semanas mencionadas en el párrafo anterior. Burgueño *et al.*, 1995, mencionan que si la sensibilidad o especificidad de una prueba son inferiores al 80 % se debe dudar de su confiabilidad, por lo tanto, en este estudio, el ensayo es confiable, ya que se presentaron porcentajes arriba del 80%.

Los pares de sensibilidad y especificidad de las semanas restantes, después de la primera y segunda vacunación varían y son bajos con el valor de corte elegido; sin embargo, Singh menciona que la sensibilidad y especificidad de un solo valor de punto de corte no describen el desempeño de la prueba de otros valores de punto de corte (Singh, 2010).

II. CONCLUSIONES

Se precipitaron proteínas totales de tres cepas de *G. anatis* y se cuantificó su rendimiento, el cual osciló en un rango de 20-30 mg/ml.

Se determinó que 100 µg de antígeno proteico es la concentración óptima para la sensibilización de las placas, en cada una de las cepas.

Se determinaron que las diluciones del anticuerpo primario para las cepas A y B son de 1:2000 y para la cepa C de 1:4000, siendo éstas en donde se encontró menor reactividad cruzada entre las cepas.

Una vez seleccionadas las concentraciones de antígeno y diluciones de cada cepa, se optimizó una metodología para determinar anticuerpos séricos utilizando la técnica de ELISA indirecta.

Se evaluó la efectividad de la metodología estandarizada mediante el análisis de sueros tomados de aves vacunadas dos veces contra *G. anatis* y se concluye que la metodología es capaz de detectar seroconversión en diferentes semanas post vacunación 1 y 2.

Se determinaron los valores de sensibilidad y especificidad para cada sangrado después de la primera y segunda vacunación de cada cepa, los cuales son diferentes y relativamente bajos en cada semana, a excepción de la semana 2, después de la 1° vacunación de la cepa A, la semana 3 después de la 1° vacunación en la cepa B y en la semana 3 después de la 2° vacunación de la cepa C, en donde los valores de estos dos parámetros fueron igual o por encima del 80 %.

No en todos los sangrados se obtuvieron buenos valores de sensibilidad y especificidad con el punto de corte elegido; por tanto la metodología desarrollada aún no puede ser empleada como herramienta serológica única para detectar *G. anatis*, por lo que deberá ser probada con sueros de aves desafiadas con *G. anatis* y aves SPF como referencia para corroborar su utilidad, mientras tanto, debe ser empleada como prueba soporte a los datos que involucran observaciones clínicas para poder dar un diagnóstico de exposición natural al

agente patógeno de *G. anatis*, analizando sueros exclusivamente en las semanas que se obtuvo buena sensibilidad y especificidad.

III. BIBLIOGRAFIA

- Bermudez AJ. (2008): Principles of disease prevention: diagnosis and control. En: *Diseases of poultry*, 12^a ed. Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, Blackwell Publishing, pp 3-46.
- Bisgaard M. (1977): Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis. Characterisation of 213 strains. *Avian Pathol.*, 6: 285-292.
- Bisgaard M, Dam A. (1981): Salpingitis in Poultry II. Prevalence bacteriology, and possible pathogenesis in egg-laying chickens *Nord. Vet. Med.*, 33:81-89
- Bojesen AM, Vázquez ME, Robles FG, Soriano EV, Olsen JE, Christensen H. (2007): Specific identification of *Gallibacterium* by PCR using primers targeting the 16SrRNA and 23S Rrna genes. *Vet. Microbiol.*, 123:262-268.
- Bojesen AM, Nielsen SS, Bisgaard M. (2003): Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels. *Avian Pathol.*, 32, 503-510
- Bojesen AM, Nielsen OL, Christensen JP, Bisgaard M. (2004): In vivo studies of *Gallibacterium anatis* infection in chickens. *Avian Pathol.*, 33(2):145-52.
- Bojesen AM, Torpdahl M, Christensen H, Elmerdahl JE, Bisgaard M. (2003): Genetic diversity of *Gallibacterium anatis* isolates from different chicken flocks. *Clin. Microbiol.*, 41(6), 2737-2740
- Burgueño MJ, García-Bastos JL, González-Buitrago JM (1995): Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Med. Clín. (Barc)* 104: 661-670.
- Campogarrido R, Vázquez ME, González CP. (2004): Diagnóstico y prevención de *G. anatis*. ANECA.

- Christensen H, Bissgaard M. (2008): Taxonomy and Biodiversity of Members of *Pausterellaceae*. En: *Biology, Genomics and Molecular Aspects*, 1 ed. Kuhnert P, Christensen H, ed. Caister Academic Press, pp. 1-26.
- Christensen H, Bisgaard M, Bojesen AM, Mutters R, Olsen JE. (2003): Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, 'Actinobacillus salpingitidis' or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53(1):275-87
- Céspedes M, Gienny MA, Felices V, Balda L, Suárez V. (2002): Prueba de ELISA Indirecta para la detección de Anticuerpos IgM para el diagnóstico de Leptospirosis humana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 19 (1).
- Crowter JR. (2001): *The ELISA Guidebook*, Humana press. New Jersey, USA. pp. 83-113.
- Domínguez EA, González RS. (2002): Análisis de las Curvas *Receiver Operating Characteristic*: Un método útil para evaluar procederes diagnósticos. *Revista Cubana Endocrinología.* 13 (2): 169-76.
- Guerlava P, Izac V, Tholozan JL. (1998): Comparison of different methods of cell lysis and protein measurements in *Clostridium perfringens*: application to the cell volume determination. *Curr Microbiol. Mar*; 36(3):131-5.
- Jordán FT, Pattison M. (1998): *Enfermedades de las aves. El manual moderno*, 3a edición, México D.F. pp 1-8.
- Kristensen BM, Frees D, Bojesen AM (2010): Gt xA *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX- toxin with a novel domain organization. *Vet Med.*, 41: 25.
- Kristensen BM (2010): Identification and characterisation of the RTX-toxin GtxA from *Gallibacterium anatis*. PhD thesis. University of Copenhagen. pp 1-91.

- Lowry O, Rosebrough N, Farr L, Randall R. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193: 265-275.
- Lequin RM, (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin Chem.*, 51:2415–2418.
- Markwell M, Haas S, Bieber L y Tolbert N (1978): A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.*, 87:206-210.
- Mosser I, Hellmann E. (1989): In vitro binding of *Campylobacter jejuni* surface proteins to murine small intestinal cell membranes. *Med Microbiol Immunol.*, 178 (4): 217-228.
- Peterson GL. (1983): Determination of total protein *Methods in Enzymology*, Vol. 91 (95- 119)
- Robles F, García N, Uribe A ,Curiel C,González C.(2009): Development and standardization of a molecular technique (Real time PCR) for the diagnosis of *Gallibacterium anatis*. 16 th WVPA congress.
- Ashraf S, Abdel-Alim GA, Saif B. (2006): Detection of Antibodies Against Serotypes 1 and 2 Infectious Bursal Disease Virus by Commercial ELISA Kits. *Avian Dis.*, 50:104–109.
- Sapan CV, Lundblad RL, Price NC. (1999): Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol Appl Biochem. Apr; 29 (Pt 2):99-108.*
- Singh NK, Dey S, Sohini D, Mohan, CM, Kataria, Vakharia, VN. (2010): Evaluation of four enzyme linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to infectious bursal disease in chickens. *J Virol Methods.*, 165: 277-282.
- Srinand S, Hsuan SL, Yoo HS, Maheswaran SK, Ames TR, Werdin RE. (1996): Comparative evaluation of antibodies induced by commercial *Pasteurella*

- haemolytica* vaccines using solid phase immunoassays. *Vet Microbiol.* 49(3-4):181-95.
- Tizard IR. (2009): Immunodiagnostic Techniques. En: Veterinary Immunology, an Introduction Saunders Elsevier. Texas, USA. 38: 509-531.
- Van der Goot JA, Engel B, van de Water SG, Buist W, de Jong MC, Koch G, van Boven M, Stegeman A. (2010): Validation of diagnostic tests for detection of avian influenza in vaccinated chickens using Bayesian analysis. *Vaccine.* 17; 28(7):1771-7.
- Vázquez ME, Campogarrido MR, Rodríguez H, González CP. (2003): Metodología para el diagnóstico e identificación de la enfermedad causada por microorganismos *Pasteurella haemolytica – like* en aves. ANECA
- Russell, David, Sambrook, MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, Joseph, CSHL PRESS Edit. 3ª edición. Volumen III. (2001).
- Watson D, Reddy S, Brahmakshatriya V, Lupiani B. (2009): A multiplexed immunoassay for detection of antibodies against avian influenza virus. *Journal of Immunological Methods* (340) 123–131.
- Zweig MH, Campbell G. (1993): Receiver- Operating Characteristic (ROC) Plots: A fundamental evaluation tool in clinical Medicine. *Clinical Chemistry*, 39 (4): 561-77.
- Herd P, Jagt E, Paul E, Van Colen S, Renard R, Destrooper C, Van den Bosch G. (2005): Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bursal disease virus (IBDV) and the estimation of the optimal age for IBDV vaccination in broilers. *Avian Pathol.*, 34(6), 501-504.
- Wayne WD. (2002): Estadística- Base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa Wiley. México d.f. pp161-165.

URL 1 Unión Nacional de Avicultores www.una.org.mx

URL2 <http://www.gallibacterium-anatis.com.mx/inicio.html>

I. ANEXOS

ANEXO 1: Reactivos, prearación de soluciones, amortiguadores

a) Reactivos

Caldo Luria Bertani-LB (Sigma No L-3022)

Anticuerpo secundario: Anticuerpo de cabra anti- IgG de pollo (H+L) conjugado a peróxidasa (Southern Biotechnology Cat. No. 6100-05)

b) Amortiguador fosfato salino pH 7.4 (PBS): (Russell, David and Sambrook, 2001).

Materia Prima	Formula	Cantidad g/l
Cloruro de sodio	NaCl	8
Fosfato de sodio dibásico anhidro	KH_2PO_4	1.44
Fosfato de potasio monobásico	Na_2HPO_4	0.24
Cloruro de Potasio	KCl	0.2

Después de disolver las materia prima ajustar el pH a 7.4 si es que se va a esterilizar por autoclave, si se esteriliza por filtración con membrana de 0.22 μm ajustar el pH a 7.2

Aforar con agua destilada a 1000 ml

Esterilizar por autoclave por 15 min a 121 °C / filtración por 0.22 μm .

c) Amortiguador de dilución: PBS1 X y leche descremada al 5%.

- d) **Solución de lavado:** PBS 1X conteniendo 0.01% de Tween 20 (Sigma Cat: P1379).
- e) **Solución de bloqueo:** PBS 1X y leche descremada 5%.
- f) **Amortiguador de dilución del anticuerpo secundario:** Buffer fosfato salino pH 7.4 (PBS 1X)
- g) **Solución cromógena:** TMB (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine) sustrato líquido para ELISA (Sigma, Cat: T-0440).
- h) **Solución de paro (Solución stop):** Ácido sulfúrico 1N (H_2SO_4 1N 2.54 ml H_2SO_4 + 97.46 ml H_2O).

ANEXO 2: Pruebas bioquímicas para la detección de *G. anatis*

Pruebas bioquímicas- Son distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, nos permiten identificar distintos microorganismos presentes. Su sistema de funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no.

En *G. anatis* al realizar pruebas bioquímicas se sabe que son positivas si la catalasa y la oxidasa resultan positivas y únicamente el indol sale negativo.

Prueba de la Oxidasa. Busca la presencia de la enzima *Citocromo C oxidasa*. Se trata de un enzima que oxida el *citocromo C* de la cadena transportadora de e-. Este se detecta utilizando el *tetra para fenilendiamina*: el reactivo de oxidasa contiene este compuesto que va a ser oxidado por la *citocromo C oxidasa*. En estado reducido es incolora, pero cuando se oxida vira a púrpura. Las bacterias que dan positivo a esta prueba tienen generalmente un ciclo respiratorio oxidativo. Se considera positiva esta prueba cuando toma un color púrpura la muestra.

Prueba de la Catalasa- busca la presencia de la enzima catalasa. El peróxido de hidrógeno se produce al utilizar la bacteria el azúcar por vía oxidativa. Al ser éste un compuesto muy oxidante las bacterias la eliminan mediante la producción de la enzima catalasa ($H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$). La prueba se considera como positiva si observamos burbujas de oxígeno.

Prueba indol. Detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano. Dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa. La prueba del indol es una prueba bioquímica realizada en especies bacterianas para determinar la habilidad del organismo de romper el indol del aminoácido triptófano. Esta división molecular es lograda por una serie de enzimas intracelulares diferentes, un sistema que en conjunto se le llama con frecuencia *triptofanasa*. Las triptofanasas catalizan la reacción de desaminación, durante el cual se remueve el grupo amino (NH_2) de la molécula de triptófano. Los productos finales de la reacción son el indol, ácido pirúvico, amoníaco (NH_3) y energía. Como coenzima dae la reacción se requiere al fosfato de piridoxal.

ANEXO 3: Pruebas estadísticas utilizadas y resultados de Curvas ROC

Pueba de distribución t ó de t-estudent: es una distribución de probabilidad que surge del problema de estimar la media de una población normalmente distribuida cuando el tamaño de la muestra es pequeño. (Wayne W, 2002).

Prueba tukey: esta prueba consiste en realizar comparaciones múltiples .Se utiliza para determinar en dónde se encuentran las diferencias significativas. (Wayne W, 2002).