

Comportamiento de la técnica ELISA de competición en el diagnóstico de anemia infecciosa equina (AIE)

Sandrigo, G.; Martínez, D.E.; Cipolini, M.F.; Storani, C.A.; Espasandin, A.G.

Cátedra Enfermedades Infecciosas, Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Sargento Cabral 2139, Corrientes, Argentina.

E-mail: gabrielaespasandin59@gmail.com

Resumen

Sandrigo, G.; Martínez, D.E.; Cipolini, M.F.; Storani, C.A.; Espasandin, A.G.: Comportamiento de la técnica ELISA de competición en el diagnóstico de anemia infecciosa equina (AIE). *Rev. Vet. 32: 2 192-195, 2021.* La AIE es una enfermedad causada por un virus específico de los équidos, capaz de inducir una considerable morbilidad y mortalidad. Además, los animales infectados permanecerán en esa condición por el resto de su vida. El objetivo fue evaluar el comportamiento de la técnica de ELISAc en comparación con la IDGA (inmunodifusión en gel de agar) para el diagnóstico serológico de AIE en equinos provenientes de zonas endémicas del noreste argentino. El trabajo se realizó con 94 muestras de equinos de diferentes establecimientos del noreste argentino, zona en la cual la enfermedad es endémica. Se llevó a cabo el diagnóstico por medio de la técnica de IDGA y luego por la técnica de ELISAc de competencia. Se llevó a cabo el análisis de característica operativa del receptor y de concordancia (ROC). Se obtuvieron 66 resultados negativos y 28 positivos en cada una de las técnicas. Las concordancias entre la técnica de ELISAc comparándola con la de referencia IDGA con un nivel de confianza del 95%, arrojó un coeficiente Kappa de 0,89. El análisis ROC entre IDGA y ELISAc reveló que con una sensibilidad (Se) del 100% y una especificidad (Sp) del 95,45%, de las 28 muestras positivas para IDGA, 26 resultaron positivas para ELISAc. El área bajo la curva (AUC) obtenido fue de 0,997 y el índice de Youden fue de 0,95, demostrando que es una técnica eficaz para el diagnóstico de AIE en las condiciones evaluadas, teniendo en cuenta ello y sabiendo la importancia que tiene contar con un diagnóstico efectivo y rápido para mejorar las situaciones contra la lucha de esta enfermedad, siendo de gran importancia poder incorporar la pericia en la rutina diaria, principalmente como técnica *screening* para esta enfermedad.

Palabras clave: equinos, serología, inmunodifusión en gel de agar, diagnóstico.

Abstract

Sandrigo, G.; Martínez, D.E.; Cipolini, M.F.; Storani, C.A.; Espasandin, A.G.: Behavior of the technical ELISA of competition in the diagnosis of equine infectious anemia (EIA). *Rev. Vet. 32: 2 192-195, 2021.* EIA is a disease caused by a specific virus of equines, it can frequently induce considerable morbidity and mortality and infected animals will remain in this condition for the rest of their lives. The aim of this study was to evaluate the performance of the ELISAc technique in comparison with the IDGA for the serological diagnosis of EIA in equines from endemic areas of northeastern Argentina. The work was carried out with 94 equine samples from different establishments in northeastern Argentina, an area where the disease is endemic. The diagnosis was carried out by means of the IDGA technique and then by the competition ELISAc technique. The receiver operative characteristic and concordance analysis was carried out. Results obtained were 66 negative and 28 positive in each of the techniques. The concordances between the ELISAc technique, comparing it with the reference IDGA technique with a confidence level of 95%, yielded a Kappa coefficient of 0,89. The ROC analysis between IDGA and ELISAc revealed that with a sensitivity (Se) of 100% and a specificity (Sp) of 95,45% of the 28 samples positive for IDGA, 26 were positive for ELISAc. For this technique, the area under curve (AUC) obtained was 0,997, and the Youden index 0,95, demonstrating that it is an effective tool for the diagnosis of EIA. The importance of having an effective and rapid screening diagnosis represented by the use of ELISAc as a daily routine technique, would be an improvement in the fight of EIA around the world.

Key words: equines, serology, immune diffusion in agar gel, diagnostic.

INTRODUCCIÓN

La anemia infecciosa equina (AIE) es una enfermedad causada por un virus específico de los équidos, del género *Lentivirus* y la familia *Retroviridae*, relacionado con el virus de la inmunodeficiencia humana, HIV-I. El virus AIE frecuentemente puede inducir una considerable morbilidad y mortalidad y los animales infectados permanecerán en esa condición por el resto de su vida ¹.

Se mencionan principalmente dos vías de contagio, una forma horizontal donde la enfermedad se produce a través del contacto con sangre contaminada, de forma natural a través de insectos hematófagos (*Tabanus spp.*) o iatrogénica por inyecciones, y por otro lado, la forma de transmisión vertical, cuando se transmite de madre gestante a cría por vía placentaria ¹².

Las diferentes formas clínicas de la enfermedad son: aguda, crónica y asintomática. La aguda generalmente ocurre en la fase inicial de replicación viral con un cuadro de fiebre y trombocitopenia severa, que en algunos casos los animales no superan tal etapa y mueren. Los caballos infectados a menudo se recuperan tornándose en portadores crónicos de la infección.

Esta forma acompaña al animal de por vida, el caballo afectado con la AIE crónica ha perdido su salud, se presenta letárgico, anoréxico, con un hematocrito bajo y una persistente trombocitopenia, eventos que coinciden con los episodios de fiebre ⁴.

Ante la ausencia de vacunas, el control epidemiológico de AIE se resume a la identificación y segregación de animales serológicamente positivos por medio del diagnóstico, por ello es importante disponer de técnicas diagnósticas eficaces ¹.

La Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) recomienda como método diagnóstico de elección al *test de Coggins* por medio de la prueba de inmuno difusión en gel de agar (IDGA), desarrollada por Leroy Coggins en 1972, por ser una prueba que detecta proteínas de la cápside viral, con máxima seguridad en los portadores de virus sin manifestaciones clínicas ¹⁴.

A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes tests para el diagnóstico de AIE, que buscan mejorar las opciones disponibles. Uno de ellos, desarrollado a fines de la década de 1980, es el “enzimo inmuno ensayo” para el diagnóstico de AIE. A fines de 1980 fue desarrollado un test de ELISAc de competición, el cual tuvo muy buena concordancia con las técnicas de IDGA, y pudo demostrarse que el mismo tuvo una alta sensibilidad, pero no especificidad como el test de Coggins, ya que puede generar reacciones cruzadas con otros virus ⁷.

En Argentina, la AIE se encuentra reglamentada por el ente que regula la sanidad animal –SENASA– que establece el diagnóstico serológico, la denuncia obligatoria, la interdicción preventiva ante la presencia de casos y la eliminación de animales enfermos y portadores ².

El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento de la técnica de ELISAc en comparación con los

resultados obtenidos mediante IDGA para el diagnóstico serológico de AIE en equinos provenientes de zonas endémicas del nordeste argentino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de equinos

El trabajo se realizó con muestras de 94 equinos de diferentes establecimientos del nordeste argentino, zona en la cual la enfermedad es endémica. Las muestras procedían de la seroteca del laboratorio de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas de la FCV -UNNE. Se llevó a cabo el diagnóstico por medio de la técnica de IDGA y luego por la de ELISAc de competencia.

Test de coggins (IDGA)

Se utilizó el kit comercial *VMRD INC Equine-Test kit*, que contiene antígeno p26 y sigue el protocolo del fabricante y la normativa vigente de la OIE. Por su parte, el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE asignó el protocolo de aprobación N° 0072 para realizar el trabajo.

Ensayo de competencia de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISAc)

Se utilizó un kit comercial de ELISAc de laboratorios IDEXX®. Este ELISAc de competición detecta anticuerpos utilizando un antígeno de AIE purificado y anticuerpos monoclonales frente a la proteína de la cápside viral p26 (OIE, 2004) ¹⁰. Se procedió según protocolo del fabricante y la lectura de la placa se realizó en un lector de ELISAc (ELX 800), 630 nm.

La interpretación de los resultados se realizó teniendo en cuenta el punto de corte del control positivo (0,269), es decir que aquellas muestras que evidenciaron una densidad óptica menor o igual al control positivo, fueron consideradas positivas y aquellas con una densidad óptica mayor al control positivo fueron consideradas negativas.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo el análisis *ROC* ⁸ a través del software *MedCalc* ¹³ de la técnica de cELISA. El análisis de concordancia expresado a través del coeficiente *Kappa* se estimó utilizando el programa Win Episcopo.

RESULTADOS

Sobre un total de 94 muestras analizadas, se obtuvieron 66 resultados negativos y 28 positivos en cada una de las técnicas, como se muestra en la Tabla 1. Cabe aclarar que no todas las muestras coincidieron en sus resultados.

Las concordancias entre la técnica de ELISAc comparada con la de referencia IDGA, con un nivel de confianza del 95%, arrojó un coeficiente *Kappa* de 0,89. La interpretación de estos coeficientes se realizó siguiendo una escala establecida por Landis y Koch ⁹, con lo cual

Tabla 1. Cuadro de contingencia de resultados de IDGA y ELISAc sobre muestras de suero de 94 equinos de zona endémica de Argentina.

		IDGA		total
		positivo	negativo	
ELISAc	positivo	26	2	28
	negativo	2	64	66
total		28	66	94

se establece que la correlación entre IDGA y ELISAc fue muy buena en este ensayo.

El análisis ROC entre IDGA y ELISAc (Tabla 2) reveló que con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 95,45%, de las 28 muestras positivas para IDGA, 26 resultaron positivas para ELISAc. El AUC obtenido fue de 0,997 y el Índice de Youden (IY) fue de 0,95, demostrando que es una técnica eficaz para el diagnóstico de AIE, en las condiciones evaluadas.

Una prueba con discriminación perfecta tiene una curva ROC con 100% de sensibilidad y 100% de especificidad cerca de la esquina superior izquierda. Debido a ello, cuanto más cerca esté la curva de la esquina superior izquierda, mayor será la precisión de la prueba¹⁵.

DISCUSIÓN

Los resultados de la técnica ELISAc demostraron una concordancia muy buena (0,89) con la IDGA y un excelente rendimiento del análisis ROC. Eventualmente, con la técnica de ELISAc se pueden descubrir animales positivos antes que puedan ser detectados por IDGA, debido a que esta prueba tiene una alta sensibilidad y especificidad, dado que se usa antígeno de AIE purificado y anticuerpos monoclonales frente a la p26.

Debido a las bondades de la prueba de ELISAc, las probabilidades de un falso positivo o falso negativo son muy bajas en comparación al IDGA¹¹. Los resultados de sensibilidad (100%) y especificidad (95,45%) muestran que la técnica ELISAc es de utilidad para su uso masivo. Como ventaja frente a la IDGA presenta la rapidez con la que define los resultados.

Tabla 2. Análisis ROC para IDGA y ELISAc aplicados sobre 94 sueros de equinos de una zona endémica de Argentina.

cantidad de sueros (n)	(+) IDGA (n)	(-) IDGA (n)	AUC (95% IC)	Se (%)	Sp (%)	IY
94	28	66	0,997	100	95,45	0,95

Investigadores venezolanos realizaron un ensayo comparando ambas técnicas utilizando un kit de ELISAc de laboratorios IDEXX y obtuvieron una concordancia moderada con un valor Kappa de 0,53, una sensibilidad de 100% y una especificidad de 97%. Estos autores⁶ resaltaron que es una prueba más sensible que IDGA, y que puede detectar más tempranamente el animal positivo.

En un ensayo realizado con 91 muestras de equinos utilizando el mismo test de ELISAc, obtuvieron valores de Kappa 0,82, sensibilidad del 92% y especificidad del 90%³. El AUC fue 0,96 y el índice de Youden 0,82, lo cual indica que el rendimiento de ELISAc fue satisfactorio.

Por otra parte, y con respecto del momento a partir del cual las técnicas serían capaces de detectar como positivos a animales infectados, otros investigadores en un estudio de inoculación experimental⁵, reportaron sero-negatividad a la IDGA en el 25% de casos, hasta por lo menos 180 días post-inoculación, mientras que las técnicas de ELISAc a partir de los 35 días ya arrojaron resultados positivos.

Recientes investigaciones apoyan la aseveración que a través de un ELISAc se pueden detectar animales infectados en estadios tempranos de la enfermedad. Se ha descrito que el periodo de incubación del virus de la AIE va a depender de la dosis del inóculo y la especie equina afectada, pero se estima entre 21 y 28 días, pudiendo ser mayor si la cepa involucrada posee una menor capacidad de virulencia.

En este trabajo el test de ELISAc ha demostrado muy buenos resultados arrojando una sensibilidad del

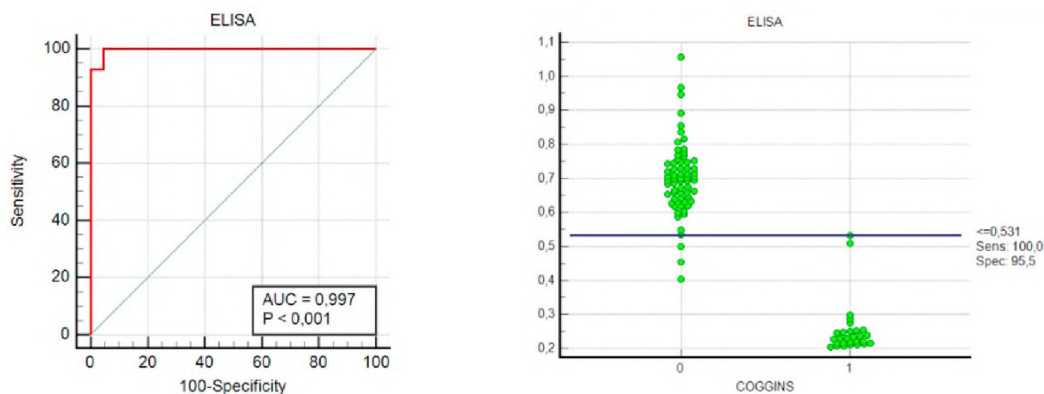


Figura 1: Análisis ROC entre la técnica de ELISAc e IDGA.

Izquierda: especificidad y sensibilidad obtenida para la técnica de ELISAc.

Derecha: distribución de positivos y negativos en función del punto de corte óptimo.

100% y una especificidad del 95,45% con valores Kappa de 0,89. Teniendo ello en cuenta y sabiendo la importancia que tiene contar con un diagnóstico efectivo y rápido para mejorar las situaciones contra la lucha de esta enfermedad, sería de gran importancia poder incorporar dicha práctica en la rutina diaria, principalmente como técnica screening para esta enfermedad.

REFERENCIAS

1. Cook RF, Cook SJ, Issel CJ. 2009. Equine infectious anemia. Infectious diseases of the horses. *Department of Veterinary Science, University of Kentucky, USA*.
2. Delasota MD. 2005. Manual de procedimientos para la anemia infecciosa equina. Dirección de luchas sanitarias. Dirección Nacional de Sanidad. http://www.senasa.gov.ar//Archivos/File/File906-manual_anemia_infecciosa.pdf
3. Espasandin AG et al. 2021. Comparison of serological techniques for the diagnosis of equine infectious anaemia in an endemic area of Argentina. *Journal of Virological Methods* 291: 114101, doi: 10.1016/j.viromet.2021.114101.
4. Harrold SM et al. 2000. Tissue site of persistent infection and active replication of equine anemia infectious virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. *J Virol* 74: 3112-3121.
5. Issel C et al. 2013. Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. *Vet Rec* 172: 210-220.
6. Márquez AY et al. 2015 Comparación de las técnicas de IDGA y ELISAc para el diagnóstico de anemia infecciosa equina en caballos criollos venezolanos. *Rev Cient FCV-LUZ* 25: 5, 381-385.
7. Matsushita T, Hesterberg LK, Porter JP, Smith BJ, Newman LE. 1989. Comparison of diagnostic tests for the detection of equine infectious anemia antibody. *J Vet Diagn Invest* 1: 50-52.
8. Metz CE. 1978. Basic principles of ROC analysis [ROC = receiver operating characteristic, a factor used in decision making regarding the optimization of diagnostic techniques]. *Semin Nucl Med* (United States) 8: 4.
9. Landis JR, Koch GG. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* Mar 33: 159-174.
10. Oficina Internacional de Epizootias (OIE). 2004. *Terrestrial Manual*, Anemia Infecciosa Equina (Chapter 2.5.4), 735-736.
11. Pisa A et al. 2007. Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in *Escherichia coli* antigen. *Prev Vet Med* 78: 3-4, 239-245.
12. Radostits OM et al. 2002. *Medicina veterinaria: tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. McGraw Hill Interamericana, 9° ed., Madrid, ISBN 84-486-0320-6, pags. 1222-1227.
13. Schoonjans F. 2005. Receiver operator characteristics (ROC) curve analysis. *Med Calc Statist for Biomedical Sciences, Software Manual Science*, 240: 4857.
14. Sellon DC, Long MT. 2007 *Enfermedades Infecciosas Equinas*, Elsevier Health Sciences, Chapter 23: 213-218.
15. Zweig MH, Campbell G. 1993. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical Chemistry* 39: 4, 561-577.