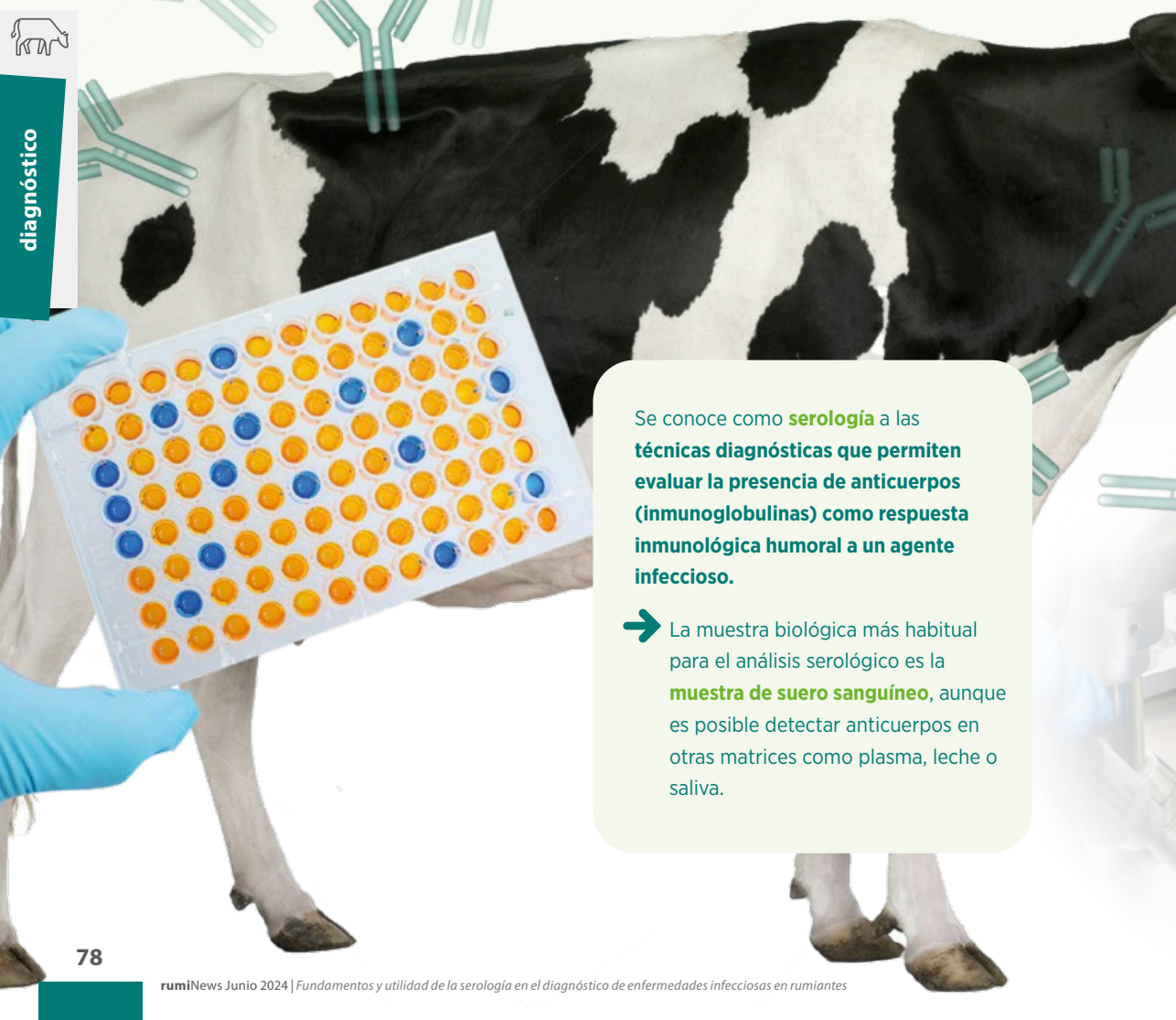
FUNDAMENTOS Y UTILIDAD DE LA SEROLOGÍA EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN RUMIANTES

Gema Chacón y Cristina Baselga
Exopol S. L.



Se conoce como **serología** a las **técnicas diagnósticas que permiten evaluar la presencia de anticuerpos (inmunoglobulinas) como respuesta inmunológica humoral a un agente infeccioso.**

La muestra biológica más habitual para el análisis serológico es la **muestra de suero sanguíneo**, aunque es posible detectar anticuerpos en otras matrices como plasma, leche o saliva.

FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS SEROLÓGICAS:

Las técnicas serológicas son técnicas inmunológicas basadas en la **unión irreversible entre una sustancia antigénica (Ag)** como virus, bacteria o parásito y su correspondiente **anticuerpo (Ac)** ***(Figura 1).***

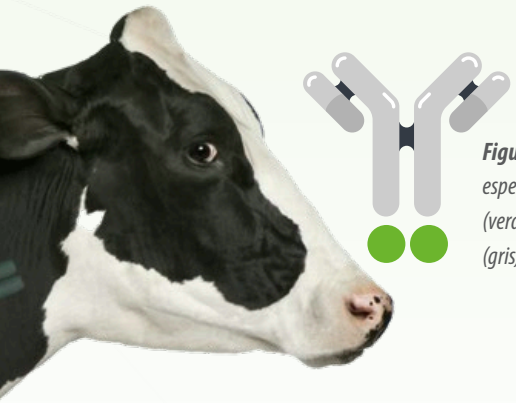


Figura 1. *Unión específica de antígeno (verde) y anticuerpo (gris).*

La formación de los **complejos Ag-Ac** se evalúa mediante marcadores (enzimáticos, fluorescentes, quimioluminiscentes, etc.) o por observación de la aglutinación que se produce tras la **unión Ag-Ac.**

TÉCNICAS SEROLÓGICAS

Las principales técnicas inmunológicas utilizadas en el diagnóstico serológico de procesos infecciosos en rumiantes son las siguientes:

Inmunoensayo en fase sólida (ELISA)

En este tipo de técnica el **Ag se encuentra unido a una fase sólida (placas de 96 pocillos)** y la unión Ag-Ac se evidencia enzimáticamente ***(Figura 2).***

> La actividad de la enzima sobre el sustrato apropiado se mide mediante **cromatografía**, siendo la técnica ELISA una de las más utilizadas y de las que hay más kits comerciales disponibles.

Figura 2. *Kit de ELISA para la detección de anticuerpos.*

Inmunofluorescencia

Los marcadores son sustancias fluorescentes capaces de emitir luz.

Se comercializan láminas con antígenos de los agentes a analizar. Al añadir el suero, los Ac presentes se unen al Ag en la lámina y, posteriormente, se añade Ac anti-inmunoglobulina de rumiantes marcado con fluorescencia **(conjugado)**.

El conjugado fluorescente se une a los Ac que previamente se habían unido a los Ag de la lámina, pudiendo visualizar esta unión mediante un **microscopio de fluorescencia *(Figura 3).***

En el diagnóstico rutinario de animales de producción, son técnicas menos utilizadas debido a que son muy laboriosas, dificultando la automatización.

diagnóstico

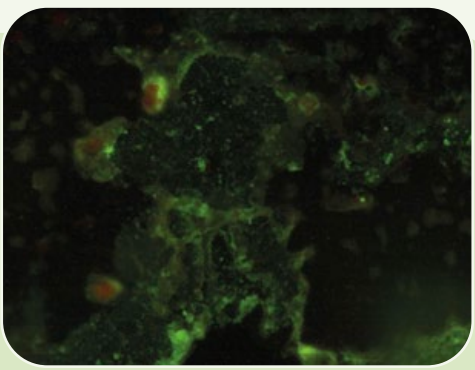


Figura 3. *Detección de anticuerpos frente a Coxiella burnetii mediante inmunofluorescencia con láminas antígenadas.*

Aglutinación

La unión Ag-Ac produce una aglutinación que es visible macroscópica o microscópicamente.

Macroaglutinación

El ejemplo más conocido es la técnica de Rosa de Bengala para la detección de anticuerpos frente *Brucella* sp. ***(Figura 4).***

Esta técnica es rápida y económica, por lo que se usa como técnica de screening. Sin embargo, es necesario confirmar los resultados positivos debido a la reacción cruzada con otras bacterias (*Yersinia enterocolitica* o algunos serovares de *Escherichia coli*).

Así mismo, **puede dar falsos negativos** para especies en fase rugosa como *Brucella ovis.*

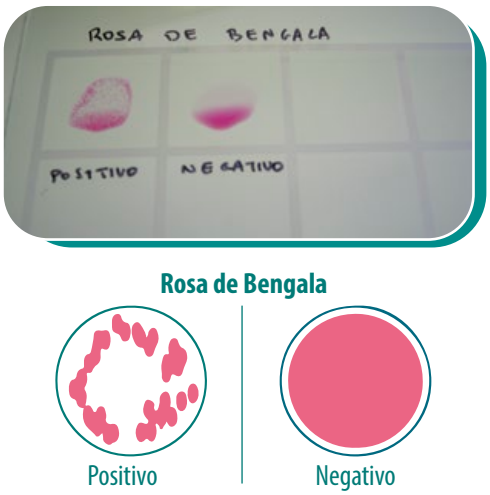


Figura 4. *Técnica de Rosa de Bengala para la detección de anticuerpos frente a Brucella sp. La observación de aglutinación macroscópica evidencia la presencia de anticuerpos.*

Microaglutinación

La técnica MAT (por sus siglas en inglés de "*Microscopic Agglutination Test*") requiere la utilización de un microscopio para evaluar la aglutinación producida por la unión Ag-Ac.

La serología de *Leptospira* sp. se realiza mediante MAT y es específica de cada serovariedad ***(Figura 5).***

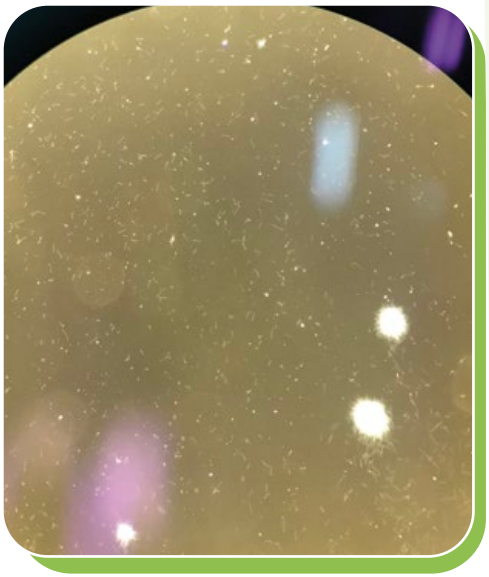


Figura 5. *Técnica de microaglutinación (MAT) para la detección de anticuerpos frente a Leptospira hardjo.*

Inmunodifusión

Se utiliza como soporte de la prueba un **gel de agarosa o gel noble** donde se realiza un orificio central y seis orificios externos.

En el orificio central se inocula Ag soluble y en los periféricos se inoculan los sueros a analizar alternados con sueros positivos (controles positivos, Cp). **La unión Ag-Ac produce una precipitación que se visualiza como una línea entre el pocillo de Ag y el pocillo de suero.**

La inmunodifusión se ha utilizado para el diagnóstico de Maedi-Visna o *Brucella ovis,* entre otras; sin embargo, tiende a ser sustituida por técnicas menos manuales como las técnicas de ELISA.

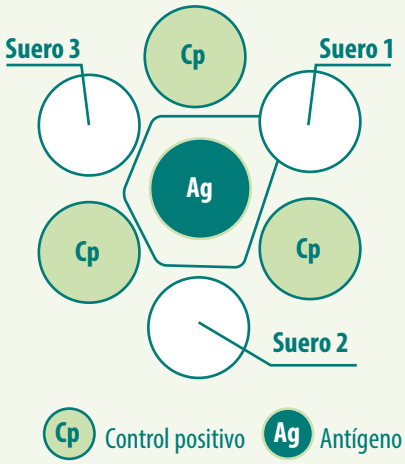


Figura 6. *Técnica de inmunodifusión para la detección de anticuerpos. En los sueros 2 y 3 se observa línea de precipitación indicando que son positivos, mientras que en el suero 1 no se observa precipitación (suero negativo).*

TÉCNICAS DE INMUNOENSAYO EN FASE SÓLIDA (ELISA)

Nos detendremos en profundizar en las técnicas de ELISA, ya que son las más utilizadas actualmente. Los diseños de los ensayos son diversos, siendo común en todos ellos la utilización de enzimas como marcadores ***(Figura 7).***

ELISA de bloqueo

Los pocillos de la placa están tapizados con el Ag.

- Al agregar la muestra de suero a analizar, los Ac presentes se unen al Ag.
- En una segunda fase, se añade un **segundo anticuerpo marcado enzimáticamente** (conjugado) que se unirá a las moléculas de Ag que queden libres.
- Por último, se incorpora un sustrato que **será modificado por la enzima del conjugado** observándose un **cambio de color.**

Este cambio de color se mide con un espectrofotómetro.

La intensidad del color del pocillo es inversamente proporcional a la cantidad de Ac en el suero a estudiar.

ELISA de competición

Es muy parecido al de bloqueo. La diferencia es que se añade **simultáneamente** el suero a analizar y el conjugado de anticuerpos marcados enzimáticamente.

Los Ac presentes en el suero compiten con el conjugado por unirse al Ag adherido a la fase sólida.

ELISA indirecto

La unión del Ag con los Ac presentes en el suero se evidencia con la **adición de un conjugado específico frente a inmunoglobulinas de rumiantes,** por lo que se une a los Ac del suero que se habían unido a los Ag en el primer paso.

La intensidad del color es proporcional a la cantidad de Ac presente en la muestra.

Figura 7. *Fases del proceso de los distintos tipos de ELISA más utilizados para la detección de anticuerpos frente a agentes infecciosos en rumiantes.*

CARACTERÍSTICAS DE LA SEROLOGÍA

A la hora de seleccionar una técnica de ELISA y valorar los resultados obtenidos, deberemos tener muy claras una serie de premisas:

Estado de vacunación de los animales

La mayoría de las técnicas serológicas **no diferencian entre anticuerpos vacunales y anticuerpos producidos en respuesta a una infección, dificultando la interpretación de resultados en caso de animales vacunados.**

Existen en el mercado algunos ensayos DIVA que permiten esta diferenciación.

Este es el caso del diagnóstico de IBR (Rinotraqueitis infecciosa bovina), donde la cepa vacunal de las vacunas marcadas tiene deleccionada la proteína gE, proteína frente a la cual vamos a detectar anticuerpos con los ELISA DIVA.

Objetivo del análisis

Los ELISA indirectos están diseñados para evaluar prevalencias de enfermedades a nivel de población, siendo útiles en el seguimiento y monitorización de rebaños positivos. Sin embargo, **no son los más adecuados para el diagnóstico de animales individuales por una mayor probabilidad de falsos positivos.**

Los ELISA de bloqueo y de competición son más específicos y son los más indicados para la realización de diagnósticos individuales, siendo habitual su uso para **confirmar resultados** de otras técnicas usadas como screening (ELISAS indirectos, aglutinación etc.).

Momento de la infección

La presencia de anticuerpos en suero indica que el animal ha tenido contacto con el patógeno.

No suele discriminar entre un proceso agudo o una exposición lejana en el tiempo, lo que dificulta correlacionar un resultado serológico positivo con la etiología del proceso que cursan los animales.

Esta dificultad se puede superar con diferentes estrategias diagnósticas:

Repetir el estudio serológico

Repetir con una separación de 2-3 semanas para demostrar seroconversión frente al agente infeccioso, lo que confirmaría una infección activa.

Analizar animales de diferentes edades

Sirve para verificar la circulación reciente del patógeno. Resultados serológicos positivos en vacas adultas y negativos en terneras de reposición indican que no ha habido circulación de patógeno reciente.

Tipo de Ac detectado

Las técnicas indirectas, en función de la especificidad del conjugado, pueden detectar anticuerpos totales, IgM o IgG. **La detección en paralelo de IgM e IgG aporta información sobre el tiempo de evolución del proceso:** las IgM se producen durante las primeras fases de la respuesta inmunitaria, mientras que las IgG predominan en la respuesta inmunitaria secundaria.

1. **IgM positivo + IgG negativo:** proceso agudo
2. **IgM positivo + IgG positivo:** proceso subagudo
3. **IgM negativo + IgG positivo:** proceso crónico

EJEMPLO PRÁCTICO: DIAGNÓSTICO DE ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI) DE BVD

La búsqueda de animales **persistentemente infectados (PI) de BVD (Diarrea viral bovina)** se basa en el uso de técnicas serológicas.

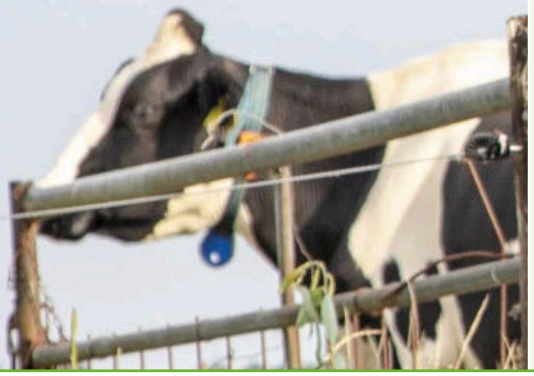
Los animales PI aparecen en el rebaño cuando **una vaca gestante contrae la infección** por primera vez durante los días 40 a 120 de gestación.

El virus se introduce en el feto y, como éste todavía no tiene el sistema inmunitario desarrollado, presentará una **inmunotolerancia al virus** de por vida.

Por tanto, es un animal que no genera anticuerpos frente al virus y **tiene una viremia constante.**

La combinación de técnicas directas (detección de Ag) e indirectas (detección de Ac) permiten confirmar que estamos ante un animal PI.

Para el diagnóstico laboratorial es necesario suero sanguíneo y sangre entera. En caso de animales jóvenes la muestra idónea es el cartílago auricular para la detección de Ag.



Cuando el resultado del laboratorio es Ac negativo y Ag positivo, es posible que estemos ante un PI o que sea un animal infectado de manera transitoria.

Por ello, es importante volver a tomar muestras del animal para realizar un segundo ensayo 2-3 semanas después:

Si el resultado es el mismo (Ac negativo y Ag positivo) **el animal es un PI** y lo recomendable es eliminarlo del rebaño para evitar que sea un foco de contagio para el resto.

En caso de obtener un **resultado Ac positivo y Ag positivo/negativo** el animal presenta una infección de BVD **activa,** ya que presenta seroconversión.

Figura 8. *Diagnóstico de animales persistentemente infectados (PI) de BVD.*

Fundamentos y utilidad de la serología en el diagnóstico de enfermedades infecciosas en rumiantes.

DESCÁRGALO EN PDF