

AGLUTINACIÓN EN LÁTEX, ELISA Y HEMOAGLUTINACIÓN: ALTERNATIVAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA PARVOVIROSIS CANINA EN HECES

Ariza S¹, Fuentes D², Vera VJ³, Villamil LC⁴ y Ramírez GC⁵

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Universidad Nacional de Colombia

RESUMEN

En vista de su alta morbilidad y letalidad, se han desarrollado varios métodos para el diagnóstico de la parvovirus canina. Los más utilizados se basan en la detección de partículas virales excretadas en las heces durante la fase aguda de la enfermedad. Algunos requieren equipos especializados, lo que aumenta los costos y el tiempo de diagnóstico. Por esto, la simplificación de los métodos de diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad es prioritaria. Este trabajo presenta el desarrollo de la técnica de aglutinación en látex para el diagnóstico de la parvovirus canina en heces, comparada con un ELISA comercial y una hemoaglutinación.

Sobre una población de 71 caninos con signos compatibles con parvovirus canina, utilizando la prueba ELISA (SNAP[®]) como referencia, se seleccionaron 21 caninos positivos. Empleando las muestras de materia fecal de los animales positivos se desarrollaron y compararon las pruebas de hemoaglutinación y aglutinación en látex. Se encontró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 100% para aglutinación en látex y una sensibilidad del 95% y una especificidad del 100% para hemoaglutinación. Dada la sencillez de la prueba, los resultados obtenidos y sus costos, se recomienda la prueba de aglutinación en látex para el diagnóstico rápido y seguro de la parvovirus canina.

Palabras claves: parvovirus, aglutinación látex, hemoaglutinación, ELISA.

LATEX AGGLUTINATION, ELISA AND HEMOAGGLUTINATION AS ALTERNATIVE FOR THE DIAGNOSIS OF CANINE PARVOVIRUS IN FOECES

ABSTRACT

According to high morbidity, mortality and contagious nature of canine parvovirus many diagnostic methods have been developed. Most of them are based in viral particle detection eliminated in foeces during acute phase infection. Some methods require expensive equipment, increasing time and cost for the diagnosis. According to that, it its imperative to develop more simple, specific and high sensitive methods. This paper describes the development of a latex agglutination test for the diagnosis of canine parvovirus in foecal samples, compared with a commercial ELISA test and hemoagglutination test. Studying a population

¹ MV

² MV

³ DMV, MSc, PhD

⁴ DMV, MSc, PhD

⁵ MV, MSc

of 71 canines showing symptoms compatible with canine parvovirus, there were choose 21 animals using ELISA (SNAP) as a reference test. Foecal samples of positive animals were used to conduct latex agglutination and hemagglutination test. 100% sensibility and specificity were found for latex agglutination and 95% and 100% respectively for hemagglutination. According to the results and the simplicity and low cost we recommend latex agglutination test as a rapid and secure diagnostic method for canine parvovirus.

Key words: parvovirosis, latex agglutination, hemoagglutination, ELISA.

INTRODUCCIÓN

El virus de la parvovirosis canina se describió en la década de los años sesenta. La primera cepa aislada correspondió a la CPV-1, desencadenante de diarrea transitoria en neonatos (Carmichael *et al.*, 1981). Se documentó la forma reproductiva de la enfermedad causante de abortos y reabsorción fetal (Carmichael *et al.*, 1994; Pratelli *et al.*, 1999). Para 1974, la población canina se encontraba afectada por una gastroenteritis hemorrágica, caracterizada por su alta morbilidad y mortalidad. Desde ese mismo año, la enfermedad se ha notificado en diferentes países, donde se ha determinado la presencia del tipo II (CPV-2) (Appel *et al.*, 1979; Carmichael *et al.*, 1981; Lenghaus *et al.*, 1980). Posteriormente, se describieron dos variantes del virus (CPV-2a y CPV-2b) atribuidas a la mutación del genoma de la parvovirus canina. A estas últimas se les atribuye mayor virulencia, representada en títulos hemaglutinantes más altos (Greenwood *et al.*, 1996).

Se han desarrollado diferentes métodos diagnósticos (Abood *et al.*, 1995; Benavides y Forero, 1983; Calle, 1989; Carmichael *et al.*, 1980; Greenwood *et al.*, 1996; Mizak y Rzeutka, 1999). Los más utilizados son los que se basan en la detección de partículas virales en las heces excretadas en la fase aguda de la enfermedad (Gordon and Angrick, 1986; Hoskins, 1997; Mathys *et al.*, 1983). Dentro de estos métodos se encuentra la hemoagglutinación (HA) (Houston *et al.*, 1996; Mogollón *et al.*, 1984; Veijalainen *et al.*, 1983), el ensayo inmunoabsorbente de enzima ligada (ELISA), la aglutinación en látex (AL), la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR), la hibridación de DNA, el aislamiento en líneas celulares felinas y la visualización de las partículas virales por microscopía electrónica (Houston *et al.*, 1996; MacCaw *et al.*, 1998; Mizak and Rzeutka, 1999; Sanekata *et al.*, 1996; Teramoto *et al.*, 1984; Uwatoko *et al.*, 1995 y 1996; Veijalainen *et al.*, 1983). Para la detección de anticuerpos contra la parvovirosis canina se emplean los métodos de inhibición de la hemoagglutinación (HI) y seroneutralización (SN) (McCaw *et al.*, 1998; Miyamoto *et al.*, 1992). Algunas de estas pruebas requieren equipos especializados, que aumentan los costos y el tiempo de diagnóstico. La técnica de HA, por ejemplo, aunque se presenta como una opción adecuada, necesita tener una fuente constante de glóbulos rojos de cerdo o mono rhesus. Es por eso que la simplificación de los métodos de diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad, que disminuya los costos, es prioritaria.

Este trabajo describe el desarrollo de la técnica de aglutinación en látex para el diagnóstico de parvovirosis canina en heces, comparada con la prueba de ELISA comercial (SNAP) y la HA. Finalmente, también realiza la determinación de los títulos de anticuerpos por HI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

En el presente estudio se incluyeron caninos con síntomas de gastroenteritis hemorrágica, reportados en cuatro clínicas de Bogotá, con diagnóstico presuntivo

de parvovirus canina. La población total de caninos afectados incluyendo las cuatro clínicas fue de 125 animales. La muestra de estudio correspondió al 56,8% (71/125) de la población total. A cada animal se le tomó una muestra de materia fecal y sangre para su análisis. Cada muestra de materia fecal se recogió en un tubo estéril y se suspendió en nueve partes v/v de una solución de PBS. Posteriormente, se centrifugó a 5.000 rpm, durante 30 minutos, a 4°C (Benavides *et al.*, 1983). El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0,2µm y almacenado a -70°C hasta su procesamiento (Carmichael *et al.*, 1980). La suspensión fecal fue utilizada para la realización de HA, AL y ELISA. La muestra de sangre se colectó en tubos estériles sin anticoagulante y se centrifugó a 3.500 rpm, durante 5 minutos. El suero obtenido se inactivó a 56°C durante 30 minutos y se almacenó a -20°C.

Protocolo de inmunización para la producción de suero hiperinmune en conejo

Se produjo un suero hiperinmune empleando una cepa vacunal y una suspensión fecal positiva a parvovirus a través del siguiente esquema de inmunización: día 0, 0,5 ml del antígeno y 0,5 ml de adyuvante completo de Freund. Para los días 7, 14, 21 y 28 se emplearon las mismas dosis, pero se utilizó adyuvante incompleto, previa titulación de los anticuerpos. El sangrado final se realizó en blanco, previa tranquilización y anestesia de los animales, el día 35.

Los sueros hiperinmunes fueron precipitados con ácido octanoico, concentrados con membrana de celulosa (SIGMA D-9127) y utilizados para la sensibilización de las partículas de látex. Los títulos obtenidos por HI fueron de 1:1024 para el conejo inoculado con la vacuna monovalente y para el inmunizado con la suspensión fecal.

Pruebas para la detección del antígeno

Prueba de hemoaglutinación: basados en la técnica descrita por Carmichael (1980), se emplearon glóbulos rojos de cerdo al 0,7% en placas de 96 pozuelos de fondo en U, se hicieron diluciones 1:2 del sobrenadante preparado de la materia fecal y se determinó el título hemoaglutinante. Los títulos de aglutinación mayores o iguales a 1:64 fueron considerados como específicos para parvovirus canino (McCartney *et al.*, 1988; Mathys *et al.*, 1983; Veijalainen *et al.*, 1983).

Prueba de ELISA: siguiendo las recomendaciones de la casa fabricante⁶ se utilizó un kit comercial desarrollado para la detección del antígeno en heces. La lectura se realizó a los 8 minutos, teniendo en cuenta el control positivo y negativo del kit.

Aglutinación en látex: se utilizaron perlas de látex de poliestileno⁷ (0,33µ de diámetro y 10% p/v). Las partículas de látex se cubrieron con los anticuerpos, de acuerdo con lo descrito por Severin (1972) y Veijalainen (1983).

Las inmunoglobulinas dializadas se disolvieron en un buffer de glicina salino 0,054 M (pH 8,2) y se obtuvo una concentración de 1:20 unidades hemoaglutinantes. Iguales volúmenes de la solución de inmunoglobulinas con la suspensión de la partícula de látex 10% p/v se mezclaron e incubaron a 37°C en baño de María durante 2 horas.

Las partículas se lavaron por centrifugación a 4.000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se reemplazó por un buffer de glicina 0,27 M (pH 8,2) y el lavado se repitió dos veces más. Los sitios de unión de proteínas remanentes en las partículas de látex fueron bloqueados al suspenderlas al 10% v/v en un buffer de glicina salino 0,27 M con albúmina sérica bovina al 0,1%. La aglutinación se realizó mezclando 30µl de las partículas sensibilizadas con el anticuerpo

⁶ SNAP® Parvo (IDEXX).

⁷ SIGMA®

antiparvovirus y 30µl de la suspensión fecal homogenizada durante 3 minutos. El control positivo se realizó utilizando una vacuna monovalente a parvovirus canina, y el control negativo, con perlas sensibilizadas con un suero dializado no inmune a parvovirus canina enfrentada a la misma vacuna. Toda aglutinación fue positiva.

Prueba serológica

Inhibición de la hemoaglutinación: la prueba de inhibición de hemoaglutinación se desarrolló de acuerdo con Carmichael (1980).

Análisis de los resultados

Las técnicas se compararon en términos de sensibilidad y especificidad, a través del programa Win Episcope. También se analizó la concordancia empleando la prueba de kappa.

RESULTADOS

Mediante la prueba de ELISA (prueba de referencia) se detectaron, sobre un total de 66 caninos examinados, 21 casos positivos (31,81%) y 45 casos negativos

(68,19%). Por HA se encontró el 31,81% de las muestras con títulos $\geq 1:64$ positivas y el 68,18% negativas. Los títulos obtenidos se clasificaron de la siguiente manera: entre 1:64 y 1:512, el 19% (títulos bajos); entre 1:1.024 y 1:4.096, el 38% (títulos medios) y superiores a 1:8.192, el 49% (títulos altos) (gráfico 1). En la prueba de aglutinación en látex, a partir de la suspensión de la materia fecal, se encontraron 20 positivas (30,3%) y 46 negativas (69,7%). Lo anterior demuestra la alta correlación entre los tres métodos diagnósticos (gráfico 2).

La sensibilidad y especificidad de HA fue del 100% frente a la prueba de referencia (ELISA); a su vez, la sensibilidad de AL fue del 95% y 100% de especificidad, con un nivel de confianza del 95%. En la prueba de concordancia kappa para HA el valor fue de 1, lo que indica una concordancia total; para AL fue de 0,965, resultado que se considera bueno.

De un total de 64 sueros, el 85,93% (55/64) mostró títulos a parvovirus canina $\geq 1:80$ y el 14,07% (9/64) no presentó títulos. De estos títulos, el 34,37% fue discriminado en niveles bajos (1:80-1:512), el 32,81% en medios (1:1.024-1:4.096) y el 18,75% en altos ($\geq 1:8.192$) (gráfico 1).

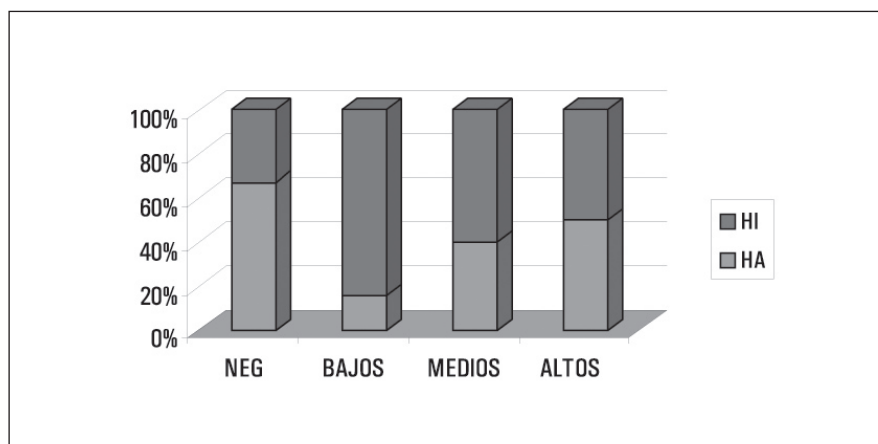


Gráfico 1. Proporción de hemoaglutinación (HA) para heces y títulos de hemoaglutinación (HI) a parvovirus canina.

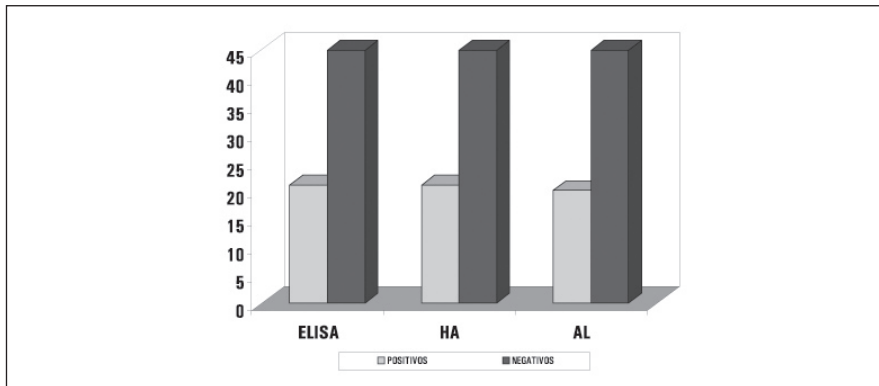


Gráfico 2. Comparación de los resultados positivos y negativos por ELISA, HA, AL, en heces, para el diagnóstico de parvovirus canina

DISCUSIÓN

Para este estudio, la prueba de hemoaglutinación ofrece unos rangos notables de sensibilidad y especificidad y un nivel de concordancia perfecto frente a la prueba de referencia (ELISA).

Los métodos diagnósticos de hemoaglutinación y aglutinación en látex demostraron ser más económicos, sensibles y específicos para el diagnóstico de la parvovirus canina en heces. Considerando las dificultades que tiene la prueba de hemoaglutinación (disponibilidad de glóbulos rojos e insumos), la técnica de AL se presenta como una prueba que puede usarse de modo rutinario para el diagnóstico en las clínicas para pequeños animales, a diferencia de lo dicho para la hemoaglutinación, pues las perlas de látex sensibilizadas son económicas, se conservan por largo tiempo y pueden tener fácil disponibilidad en el ámbito de los consultorios, ventajas comparativas para constituirse en la prueba de referencia para Latinoamérica.

La distribución de los títulos encontrados por prueba de hemoaglutinación podría explicarse por la posible presencia de la cepa CPV-2b en el país, que no está dentro de las cepas vacunales que comercialmente se emplean. Esto esclarece los altos títulos obtenidos, ya que las pruebas no diferencian la cepa CPV-2b de la CPV-2a, presente en las vacunas. Algunas de las muestras positivas

tuvieron títulos muy altos (1:131.072) que no se encuentran reportados en la literatura (Carmichael *et al.*, 1980; Mizak and Rzezutka, 1999; Teramoto *et al.*, 1984). Adicionalmente, la baja tasa de protección, a pesar de los antecedentes de vacunación, apoya la posible presencia de la cepa CPV-2b.

Para la aglutinación en látex, las perlas de látex fueron sensibilizadas con anticuerpos contra el virus de la parvovirus canina. El de mejor resultado fue el desarrollado a partir de la vacuna. El suero de conejo producido a partir de la suspensión fecal presentó múltiples aglutinaciones inespecíficas; esto podría explicarse por la poca especificidad del inóculo de la suspensión fecal, ya que contiene restos celulares y proteínas que mostraron reacciones cruzadas.

Los resultados serológicos para la población podrían sugerir que en algunos de los caninos el desafío de campo ocurrió antes del tiempo de la toma de la muestra de materia fecal, razón por la que no se encontró excreción viral para algunos de los caninos. Así mismo, la manifestación de gastroenteritis hemorrágica pudo involucrar otras etiologías virales (Coronavirus y Rotavirus), parasitarias (Toxascaris y Ancylostoma) o bacterianas (Campilobacter y Salmonella) de acuerdo con lo reportado por Bruenner (1985).

BIBLIOGRAFÍA

1. Abood SK, Dunn T, Hoskins D and Willard MD. Clinical management of canine parvovirus, part I. *Can. Pract.* 20:5, pp. 10-14, 1995a.
2. Appel MJG, Cooper BJ, Greisen H, Scott F and Carmichael LE. Canine viral enteritis. I. Status report on corona and parvo-like viral enteritides. *Cornell. Vet.* 69:3, pp. 123-133, 1979.
3. Benavides OJ y Forero GA. Estudio y comprobación de la parvovirus canina en Colombia. Tesis de grado. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, 1983.
4. Bruenner C and Swango L. Canine parvovirus infection: effects on the immune system and factors that predispose to severe disease. *Comp. Cont. Ed.* 7:12, pp. 979-987, 1985.
5. Calle BL. Estudio epidemiológico retrospectivo del síndrome de gastroenteritis hemorrágica canina (GHE) en cinco hospitales de Bogotá. 1983-1987. Tesis de grado. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, pp. 69-76, 1989.
6. Carmichael LE, Joubert JC and Pollock RVH. Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *Am. J. Vet. Res.* 42:5, pp. 784-791, 1980.
7. Carmichael LE, Joubert JC and Pollock RVH. A modified live canine parvovirus strain with novel plaque characteristics. I. Viral attenuation and dog response. *Cornell. Vet.* 71, pp. 408-427, 1981.
8. Carmichael LE, Schlafer DH and Hashimoto A. Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type - 1): Pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J. Vet. Diag. Invest.* 6, pp. 165-174, 1994.
9. Gordon JC and Angrick EJ. Canine parvovirus: environmental effects on infectivity. *Am. J. Vet. Res.* 47:7, pp. 1464-1467, 1986.
10. Greenwood NM, Chalmers WSK, Baxendale W and Thompson, H. Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction enzyme analysis. *Vet. Rec.* 138, pp. 495-496, 1996.
11. Hoskins JD. Update on canine parvoviral enteritis. *Vet. Med.* Agosto. pp. 694-727, 1997.
12. Houston DM, Ribble CS and Head LL. Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *JAVMA.* 208:4, pp. 542-546, 1996.
13. Lenghaus C and Studdert MJ. Relationships of canine panleucopenia (enteritis) and myocarditis parvovirus to feline panleucopenia virus. *Austral. Vet. J.* 56, pp. 152-153, 1980.
14. MacCartney I, McCandlish IAP, Thompson H and Cornwell HJC. Canine parvovirus: interaction between passive immunity and virulent challenge. *Vet. Rec.* 122, pp. 573-576, 1988.
15. Mathys A, Mueller R, Pedersen NC and Theilen GH. Comparison of hemmagglutination and competitive enzyme-linked immunosorbent assay procedures for detecting canine parvovirus in feces. *Am. J. Vet. Res.* 44:1, pp. 152-154, 1983.
16. McCaw D, Thompson MD, Bonderer A and Chen Y. Serum distemper virus and parvovirus antibody titers among dogs brought to a veterinary hospital for revaccination. *JAVMA.* 213:1, pp. 72-75, 1998.
17. Miyamoto J, Taura Y, Une S, Yoshitake M, Nakama S and Watanabe S. Changes in blastogenic responses of lymphocytes and delayed type hypersensitivity responses after vaccination in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 54:5, pp. 945-950, 1992.
18. Mizak B and Rzezutka A. Application of nested pcr for the detection of canine parvovirus in faeces. *Bull. Vet. Inst. Pul.* 43:19, pp. 19-24, 1999.
19. Mogollón JD, Cortés E, Benavides OJ y Forero G. Parvovirus canina en Colombia. II. Aislamiento y serología. *Rev. ICA.* 19:2, pp. 201-207, 1984.
20. Pratelli A, Buonavoglia D, Tempesta M, Guarda F, Carmichael LE and Buonavoglia

- C. Fatal canine parvovirus type-1 infection in pups from Italy. *J. Vet. Diag. Invest.* 11, pp. 365-367, 1999.
21. Sanekata T, Sugimoto T, Ueda S, Tsubokura M, Yamane Y and Senda M. Latex agglutination test for canine parvovirus. *Aust. Vet. J.* 73:6, pp. 215-217, 1996.
 22. Severin WPI. Latex agglutination in the diagnosis of meningococcal meningitis. *J. Clin. Path.* 25, pp. 1079-1082, 1972.
 23. Teramoto A, Mildbrand M, Carlson J, Collins JK and Winston S. Comparison of enzyme - linked immunosorbent assay, DNA hybridization, hemagglutination and electron microscopy for detection of canine parvovirus infections. *J. Clin. Microbiol.* 20:3, pp. 373-378, 1984.
 24. Uwatoko K, Sunairi M, Yamamoto A, Nakajima M and Yamaura K. Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection of canine parvovirus in feces of diarrheic dogs. *Vet. Microbiol.* 43, pp. 315-323, 1995.
 25. Uwatoko K, Sunairi M, Yamamoto A, Nakajima M and Yamaura K. Rapid and efficient method to eliminate substances inhibitory to the polymerase chain reaction from animal fecal samples. *Vet. Microbiol.* 52, pp. 73-79, 1996.
 26. Veijalainen PML, Neuvonen E, Niskanen A and Juokslahti T. Latex agglutination test for detecting feline panleucopenia virus, canine parvovirus, and parvoviruses of fur animals. *J. Clin. Microbiol.* 23:3, pp. 556-559, 1983.
 27. Win Episcopo 2.0. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, Wageningen University, University of Edinburgh, Epicom, Gobierno de Aragón. 1998.