ITEA (1999), Vol. Extra 20 N.° 1

EVALUACIÓN DE UN NUEVO TEST DE ELISA PARA LA DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DEL VIRUS MAEDI-VISNA EN OVINOS DE LA RAZA RASA ARAGONESA.

R. Varea[1], E. Monleón[1], M.C. Pacheco[2], B. González[2], S. Andrés [2], L. Luján[1], A. Vargas[1], B. Amorena[2] y J.J. Badiola[1].

1 Dpto. de Patología Animal, Universidad de Zaragoza, M. Servet, 177, 50013 Zaragoza
2 CSIC-SIA (DGA), Unidad de Sanidad Animal. Car. Montañana, 177, 50016 Zaragoza

INTRODUCCIÓN

El Maedi-Visna (MVV) es un lentivirus responsable de una enfermedad crónica en ovino (Cutlip et al., 1988; Pépin et al, 1998). Tests de ELISA basados en proteínas recombinantes y péptidos sintéticos han mejorado el diagnóstico de campo (Zanoni et al, 1991; Kwang et al, 1993; Kwang and Torres, 1994; Keen et al, 1995), aunque ninguno ha logrado desbancar la técnica de inmunodifusión en gel agar (AGID, Windward et al., 1979), prueba de referencia en la Unión Europea.

El objetivo de este trabajo es evaluar un nuevo test de ELISA basado en una proteína recombinante (p25) y un péptido sintético (TM1) (Saman et al., 1997) de la cepa de MVV EV1 (Sargan et al., 1991).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 1941 sueros ovinos de Rasa Aragonesa. 1716 sueros pertenecían a 572 adultos sangrados a lo largo de tres años, 186 sueros se obtuvieron de 93 adultos sangrados en dos años consecutivos y 67 sueros procedían de 67 jóvenes de un año. Además, se estudiaron 8 ovinos infectados experimentalmente. Un grupo de 161 cabras fue estudiado, con el fin de determinar la aplicabilidad del ELISA en esta especie para la detección del virus de la artritis encefalitis caprina (CAEV), análogo al MVV.

Los resultados en AGID y ELISA fueron confrontados en una tabla de contingencia. Para establecer un estándar de referencia de seropositividad y sensibilidad frente al cual comparar los resultados de ELISA y AGID se realizó el seguimiento del estatus serológico del individuo (estudio secuencial) y se realizó otra prueba serológica, el Western Blotting (WB; Burnett, 1981). Los controles utilizados para validar los tests de ELISA y WB fueron confirmados por LTR-PCR (Extramiana et al, 1998). Los resultados obtenidos mediante el estudio secuencial y el WB permitieron establecer un estándar de referencia, frente al cual comparar los resultados de ELISA y AGID . Utilizando dicho estándar, se determinó la sensibilidad, la especificidad y la eficacia del ELISA y del AGID. Además, se calculó la concordancia entre tests mediante el test de κ (Fleiss, 1981) y se estudió la repetitibilidad del ELISA calculando el coeficiente de variación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos al enfrentar las dos técnicas (ELISA y AGID) se presentan en Tabla 1. La baja eficacia global del test ELISA respecto del IDGA, es explicable ya que este último no puede usarse como referencia en solitario debido a su falta de sensibilidad (Houwers et al., 1982, Keen et al., 1995). Cada técnica fue confrontada con el estándar de referencia establecido. Las Tablas 2 y 3 muestran los resultados obtenidos.

Tabla 1: Comparación de los resultados serológicos de ELISA frente AGID.

	AGID positivo	AGID negativo	TOTAL
ELISA positivo	579	210	789
ELISA negativo	37	1115	1152
TOTAL	616	1325	1941

Sensibilidad: 94.0%; Especificidad: 84.2%; Eficacia global: 89.1%; κ = 0.73% (I.C.95%=0.70%-0.76%).

Tabla 2: Clasificación de sueros según los resultados obtenidos en ELISA frente a los resultados estándar.

	Resultados estándar		
	Positivo	Negativo	TOTAL
ELISA positivo	764	21	785
ELISA negativo	17	1139	1156
TOTAL	781	1160	1941

Sensibilidad: 97.8%; Especificidad : 98.2%; Eficacia global: 98.0%; κ = 0.96% (I.C.95%=0.95%-0.97%).

Tabla 3: Clasificación de sueros según los resultados obtenidos en IDGA frente a los resultados estándar.

	Resultados estándar		
	Positivo	Negativo	TOTAL
AGID positivo	600	20	620
AGID negativo	186	1135	1321
TOTAL	786	1155	1941

Sensibilidad: 76.3%; Especificidad : 98.3%; Eficacia global: : 87.3%; κ = 0.77% (I.C.95%=0.74%-0.80%).

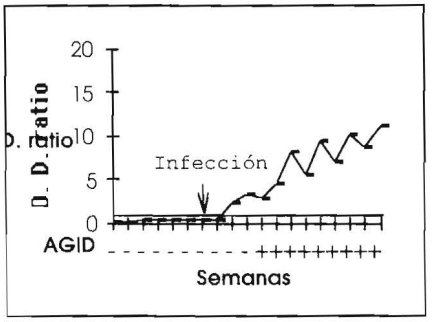


Fig. 1: Evolución de la tasa de anticuerpos en infección experimental.

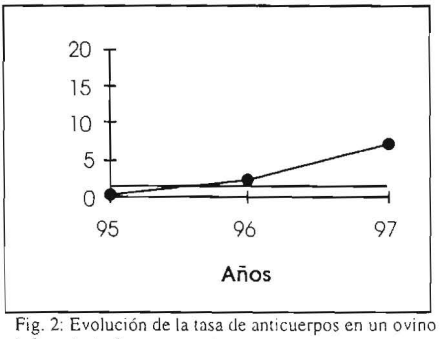


Fig. 2: Evolución de la tasa de anticuerpos en un ovino infectado de forma natural.

Según se indica en las Tablas 2 y 3, con la técnica de ELISA, se reducen las discrepancias frente al estándar, mejorándose la sensibilidad y especificidad. Además, el alto valor de κ demuestra que la concordancia entre este ELISA y el estándar de referencia es superior a la existente entre AGID y dicho estándar.

Los coeficientes de variación intraplaca e interplaca fueron de 7.3% y 7.7% respectivamente, lo cual indica que la repetitibilidad del nuevo test ELISA es alta.

En cuanto al seguimiento en individuos infectados natural y experimentalmente (Figs. 1 y 2), el ELISA detectó las seroconversiones con mayor precocidad que el AGID. El ELISA se anticipó al AGID hasta 3 años en infecciones naturales y hasta 5 semanas en infectados experimentalmente.

El ELISA ha demostrado ser aplicable en el ganado caprino, a pesar de haber sido evaluado frente a IDGA y no frente a un resultado estándar. La sensibilidad alcanza el 100% y la especificidad un 99.1%. No obstante, el test no está todavía optimizado para aplicarse en esta especie, por lo que deben llevarse a cabo estudios adicionales.

El nuevo ELISA evaluado en este trabajo ha demostrado tener una mayor sensibilidad y eficacia global que el IDGA superándolo en casi 21 y 11 puntos respectivamente. Además, el test de ELISA aporta las conocidas ventajas de automatización y objetividad, junto con una repetibilidad muy aceptable. Una ventaja adicional del test de ELISA es su precocidad con respecto a IDGA. Por ello, puede considerarse la conveniencia de la sustitución del actual test de inmunodifusión en gel por este ELISA para el diagnóstico, control y erradicación del MVV en la población ovina.

Agradecimientos.- Estudio financiado por el proyecto AIR3-CT94-1492 de la Comisión Europea y por el proyecto SC95-036 del INIA. Así mismo agradecemos la colaboración de la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino de la raza Rasa Aragonesa (ANGRA).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Burnett, 1981. A. Anal. Biochem., 112: 195-203.
2. Cutlip et al., 1988. Vet. Microbiol., 17: 237-250.
3. Extramiana et al, 1998. Symposium on Prion and Lentiviral Diseases, 1998.
4. Fleiss, J. L., 1981. Statisical methods for rates and proportions, 2nd ed. John Wiley, N.Y. pp: 212-236.
5. Houwers et al, 1982. Vet. Microbiol., 7: 209-219.
6. Keen et al., 1995. Vet. Immunol. Immupathol., 47: 295-309.
7. Kwang and Torres, 1994. J. Clin. Microbiol., 32: 1813-1815.
8. Kwang et al, 1993. J. Vet. Diagn. Invest. 5: 189-193.
9. Pépin et al, 1998. Vet. Res., 29: 341-367.
10. Saman et al, 1997. 3rd European Workshop on Ovine and Caprine Retroviruses, 1997.
11. Sargan et al, 1991. Journal of General Virology, 72: 1893-1903.
12. Windward et al., 1979. Amer. J. Vet. Res., 40: 564.
13. Zanoni et al, 1991. J. Clin. Microbiol., pp. 1290-1294