

# EL EXAMEN SEROLÓGICO CON MUESTRAS DE SANGRE OBTENIDAS EN PAPEL DE FILTRO

Villa Espinosa A, Pueyo Pintor R, Navarro Serrano A, Baselga JM, Baselga R.

EXOPOL. Pol. Río Gállego, calle D, Parcela 8, 50840 – San Mateo de Gállego. Zaragoza. España.  
Tel 976 694525, [exopol@exopol.com](mailto:exopol@exopol.com) - [www.exopol.com](http://www.exopol.com)

## INTRODUCCIÓN



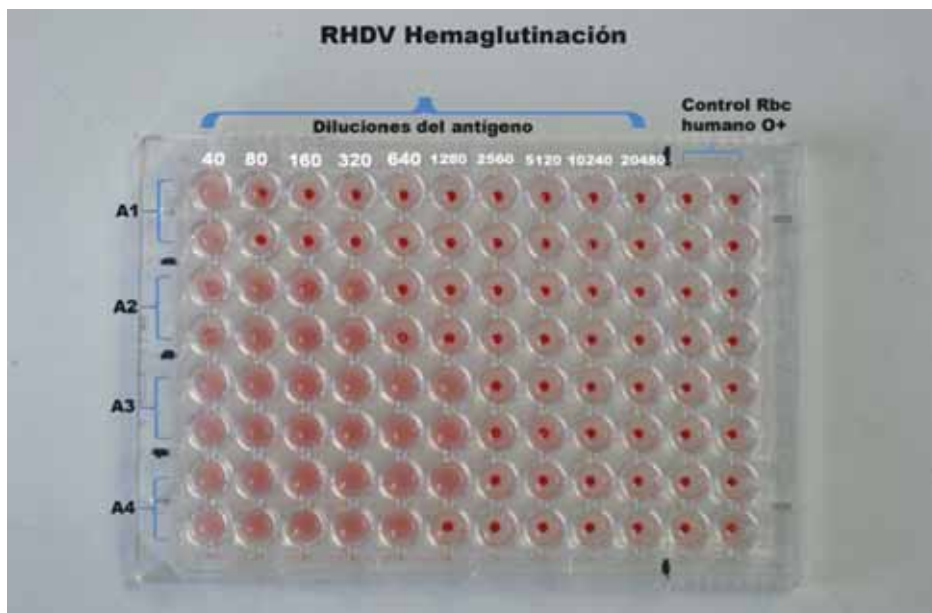
Los ensayos serológicos pueden tener dos objetivos diferentes: el diagnóstico de una infección y/o el establecimiento del estado inmunitario. Se puede establecer que las determinaciones realizadas sobre una única dilución, para el screening o cribado, generan de forma fiable resultados cualitativos (positivo/negativo), que son considerados suficientes en la mayoría de las ocasiones (4, 5), tanto para el dictamen de diagnóstico (IgM e IgG), como el estado inmunitario (IgG y anticuerpos totales). Las determinaciones cuantitativas son de aplicación cuando se analizan muestras pareadas, al objeto de demostrar la seroconversión o variaciones significativas en el título de anticuerpos. (5)

En los conejos, el análisis serológico es de gran importancia para el diagnóstico, prevención y vigilancia de enfermedades de diversas etiologías. La respuesta humoral es predictiva del nivel de protección frente a las infecciones, para la valoración

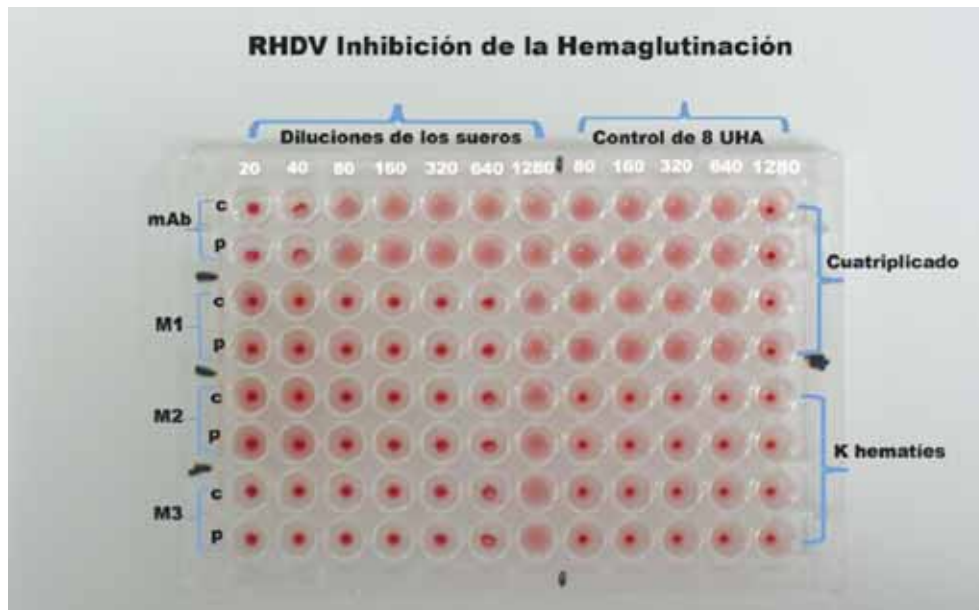


## LOS POSIBLES OBJETIVOS DE LOS ENSAYOS SEROLÓGICOS SON EL DIAGNOSTICO DE UNA INFECCIÓN O EL CONOCIMIENTO DE ESTADO INMUNITARIO

de los títulos de anticuerpos calostrales y post vacunales y tiene un destacado valor en la investigación de animales centinelas de áreas vacunadas de Mixomatosis y RHDV, en el comercio de semen de animales reproductores seleccionados como no portadores de Chlamydias y Encephalitozoon entre otros. (9)



**Figura 1:** HA. Obsérvese los títulos de los preparados antigénicos empleados títulos > 160. Ej muestras A2, A3, A4.



**Figura 1:** IHA. Los títulos de anticuerpos alcanzados por los eluatos del papel de filtro fueron similares o un logaritmo menor que los obtenidos con sueros de venopunción. Obsérvese M1, M2, M3 títulos de anticuerpo = 640. Control positivo anti VP 60 = 40.

En la práctica veterinaria, para realizar programas de prevención de enfermedades de micro mamíferos y en especial lagomorphos, el screening serológico requiere la extracción de sangre venosa, la cual puede ser difícil de obtener cuando los pesisajes son a mediana y a gran escala por la dificultad de hacer sangrías de calidad y obtener un volumen suficiente de muestra.

El objetivo del presente trabajo, fue evaluar la metodología de toma muestras de sangre en papel de filtro y compararla con muestras de sangre obtenidas por venopunción, para la realizar pruebas serológicas de detección de anticuerpos.

## MATERIAL Y MÉTODO

Las extracciones de sangre se llevaron a cabo por separado: con jeringa (obtención de suero de forma convencional coagulación y centrifugación) y mediante goteo sobre papel de filtro. Las muestras de sangre depositadas y secas expuestas a temperatura ambiente dentro del laboratorio, se emplearon para preparar los eluatos.

Las muestra de suero y los eluatos se conservaron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

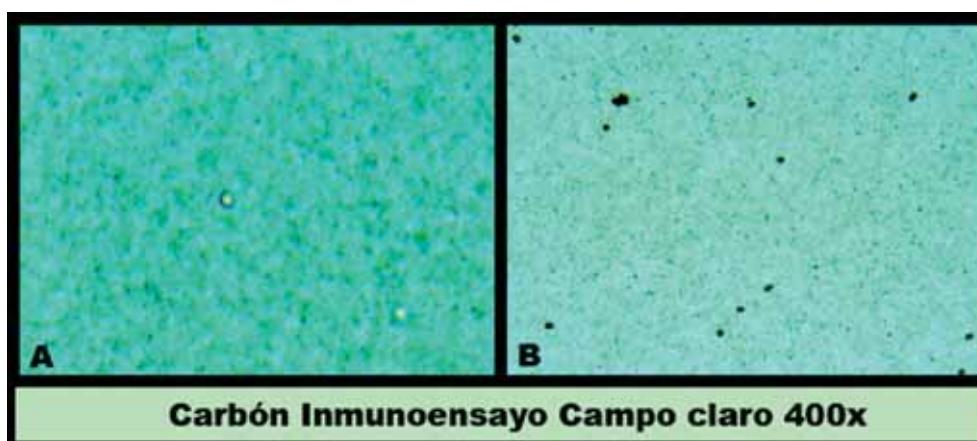
Los donantes de sangre fueron 94 conejos llegados al laboratorio de diagnóstico con o sin síntomas de enfermedad clínica relacionada con el estudio serológico de Enfermedad Hemorrágica Viral (RHD) *Encephalitozoon cuniculi*, (EC), Mixomatosis (RMV) y *Chlamydia spp*. Los sueros y los eluatos del papel de filtro que contenían muestras de los



mismos animales se compararon intra ensayos. Se consideró reactiva aquella muestra positiva al menos en una de las técnicas de muestreo empleada frente a sueros positivos de centros de referencia autorizados.

Los resultados obtenidos fueron evaluados en sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo.

1.- Hemaglutinación – Inhibición. La inhibición de la hemaglutinación (IHA) se realizó en frío, según recomendación de la OIE (5) con RBCs humano grupo O+, sueros inactivados a  $56^{\circ}\text{C}$  30 minutos y tratados dos veces con Caolín. La elución del papel filtro se realizó con 450  $\mu\text{l}$  de PBS 0,02 M pH 6,5 a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Se eliminó el papel de filtro y se agregó 500  $\mu\text{l}$  de caolín al 25% al eluido, con agitación ocasional



**Figura 3:** CIA. La intensidad de reacción de los eluatos del papel de filtro en la dilución de screening fue similares a la obtenida con sueros de venapunción. Observase la morfología de *E. cuniculi* y la fuerte reacción con el carbón. Cuantía mínima del reactor positivo = 10 parásitos x campo en dilución  $\geq 1:40$

durante 30min a temperatura ambiente para eliminar los inhibidores inespecíficos y se centrifugaron a 450g durante 30min, obteniendo una dilución final de 1:20. El antígeno utilizado en la prueba IHA fue obtenido a partir de pools de hígados homogenizados y clarificados de animales con enfermedad clínica y títulos hemaglutinantes  $> 640$ .

Las diluciones de cada suero se enfrentaron a 8 unidades hemaglutinantes del virus y los resultados se compararon con los ensayos de eluidos de la sangre de papel de filtro que contenía muestras de los mismos animales. El título asignado fue la mayor dilución capaz de inhibir la hemaglutinación (8 UHA / 25  $\mu$ l) provocada por el antígeno viral. El valor diagnóstico de los reactores positivos se consideró  $\geq 20$ . El control positivo fue el anticuerpo monoclonal anti VP60 de Ingenasa.



2.- **Inmuno-carbon (CIA):** para la detección y verificación de anticuerpos contra *Encephalitozoon cuniculi*, se utilizó el Kit de Medicago que emplea antígeno de células completas de *E. cuniculi* mezcladas con una suspensión de carbón. La elución del papel filtro se realizó con 450  $\mu$ l de PBS 0,02 M pH 7,2. El valor diagnóstico de los reactores positivos se consideró en screening  $\geq 40$  y más de 10 de *E. cuniculi* marcados en negro por campo de 400x en la observación microscópica. Sueros de conejos naturalmente infectados de Megacord / Eurovet, se emplearon como control positivo.

3.- **Inmunofluorescencia indirecta (IFI).** Se empleó para detectar anticuerpos de tipo IgG de Mixomatosis y *Chlamydia* en screening, la elución de los discos de papel filtro absorbidos con sangre se realizó con 2 ml PBS 0,02M pH 7,2 y albúmina bovina fracción V al 0,5% a 4°C durante toda la noche, obteniendo una dilución de 1:100.

Para la serología de estas entidades se empleó antígeno laminar. En Mixomatosis consistió de la cepa homóloga Lausanne cultivada in vitro y un anticuerpo policlonal de INRA, Francia, como control positivo. En *Chlamydia psittaci*, el antígeno laminar era de Eurovet y el control positivo policlonal *C. género específico* de BIOTREND. En ambos casos la conjugación se efectuó con el anticuerpo policlonal anti conejo FITC de SIGMA F-1262.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En casi todas las especies, el plasma normalmente representa el 55% del volumen sanguíneo (dependiendo del hematocrito) y el suero es aproxi-



madamente el 40% del plasma. En este trabajo empleamos un área de muestra de 2.8 cm<sup>2</sup> de papel de filtro para 50 µl de sangre seca.

Las preguntas que debíamos responder eran sobre la seguridad de las pruebas diagnósticas. ¿Con qué seguridad la toma de muestra sobre papel de filtro predice la presencia o ausencia de la enfermedad? Ante un resultado positivo ¿Qué probabilidad existía de que ese resultado indicase presencia de la enfermedad?.

La seguridad viene determinada por el valor predictivo (validez predictiva) de un resultado positivo o negativo y es de enorme utilidad a la hora de tomar decisiones clínicas y transmitir la información sobre el diagnóstico.

*Valor predictivo positivo*  $VPP = VP / VP + FP$

*Valor predictivo negativo*  $VPN = VN / VN + FN$

Consideramos VP y VN a los resultados obtenidos con el muestreo por venopunción y FP y FN a los resultados discordantes obtenidos con los eluatos.

En IHA se obtuvieron 32 muestras reactivas de las cuales 31 fueron reactivas por las 2 técnicas. Esto arrojó VPP (32/32) con VPN (10/11).

En CIA, 10 muestras fueron reactivas de las que 8 coincidieron en ambos muestreos para VPP (10/10) y VPN (18/20). En IFI el nivel de coincidencia fue de 100%. La sensibilidad y especificidad relativa del muestreo sobre papel de filtro también fue calculada.

*Especificidad* =  $VN / VN + FP$

*Sensibilidad* =  $VP / VP + FN$

En la tabla 1 se muestran los valores predictivos obtenidos en cada prueba cuando los muestreos

**Tabla 1:** Muestreo con sangría convencional y con papel de filtro

Entidad	Ensayo	Muestras	Positivas		Negativas		VPP	VPN
			Papel	Sueros	Papel	Sueros		
RHD	IHA	42	31	32	11	10	1	0,9
EC	CIA	28	8	10	20	18	0,83	0,9
Mixomatosis	IFI	12	12	12	0	0	1	1
Chlamydias	IFI	12	2	2	10	10	1	1

**Tabla 2:** Sensibilidad y especificidad del muestreo sobre papel de filtro

Suero	Positivo	Negativo	Indeterminado	Total	Validez
Positivo	53	0	0	53	Especificidad 100%
Negativo	3	38	0	41	Sensibilidad
<b>Total</b>	<b>56</b>	<b>38</b>	<b>0</b>	<b>94</b>	<b>94,9%</b>

fueron comparados. La especificidad y sensibilidad del conjunto de los ensayos sobre papel de filtro fue de 100% y 93% respectivamente. Ver tabla 2.

El muestreo de la sangre sobre papel de filtro, ha sido avalado por varios autores que han encontrado un alto valor de concordancia de los resultados y por ello es ampliamente utilizado para realizar encuestas sero epidemiológicas de Trypanosomiasis (Chagas) (3, 7, 10), Dengue (1), HTLV 1 (2, 8) y resulta de especial utilidad en el diagnóstico de enfermedades genéticas (4) y en pesquisajes de identificación de individuos con biología molecular (6).

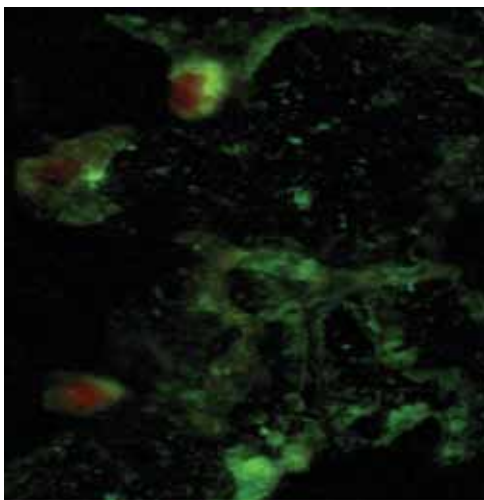
Los resultados obtenidos en este trabajo fueron satisfactorios y significan que la toma y el transporte de muestras de sangre en papel de filtro es una técnica útil y exacta para realizar estudios epidemiológicos en que se analizan anticuerpos contra las entidades RHD, Mixomatosis y Chlamydias en conejos. Además, la muestra de sangre seca sobre papel de filtro, permite reducir costes en la



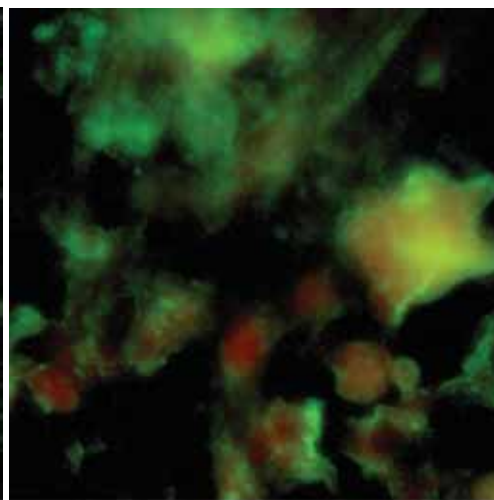
extracción, envío y almacenamiento (10) por lo que debe estar estandarizada (4).

## BIBLIOGRAFÍAS

1.- García, María, Cabeza, César, Callajan, Johny et al. Determinación de IgG y anticuerpos totales contra el Virus Dengue, en muestras obtenidas en



**Figura 4:** Chlamydia psittaci. Reactores positivos  $\geq 100$ . Obsérvese la inmunofluorescencia verde amarilla con localización extra e in tra citoplasmática de los cuerpos elementales.



**Figura 5:** Reactor positivo a Mixomatosis  $\geq 100$ . Inmunofluorescencia de localización intracitoplasmática. 400 x

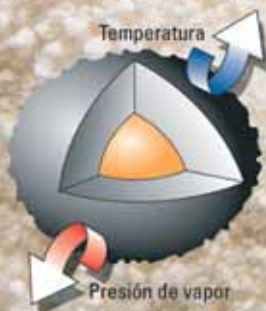
¡AHORA PARA CONEJOS!

# Nemutín Premix

2%

## Tiamulina hidrógeno fumarato recubierta

Formulado a base de tiamulina recubierta que ofrece grandes ventajas:



- Total estabilidad durante la granulación.
- Mínima pulverulencia.
- Gran fluidez.
- Máxima homogeneidad del pienso.
- Rápida absorción tras la ingestión.

TIEMPO DE ESPERA EN CONEJOS **0** días



**Composición:** Tiamulina hidrógeno fumarato... 2 g, (equivalente a 2,5 g de Tiamulina hidrógeno fumarato 80%). Excipiente c.s.p....100 g. **Especies de destino e indicaciones terapéuticas:** Conejos: Prevención y tratamiento de la enterocolitis epizootica. **Contraindicaciones:** No administrar con antibióticos polímeros ionóforos. **Posología y modo de administración:** Via oral mezclada con el pienso. Conejos: Enterocolitis epizootica: prevención y tratamiento: 1,9 mg de tiamulina/k p.v. administrada en el pienso. **Tiempo de espera:** Carne: conejos: 0 días. **Envases de 25 kg. - Registro n° 1716 ESP.**

### ¡Eficacia y seguridad!

Solución oral para administrar en agua de bebida conteniendo 100 mg de Enrofloxacin/ml

# Colmyc-C

## ¡Más especies, menos tiempo!



**Composición:** Enrofloxacin... 10 g, Excipiente c.s.p....100 g. **Especies de destino e indicaciones terapéuticas:** Conejos: tratamiento de infecciones respiratorias causadas por T. Multicida. **Posología y modo de administración:** Administrar vía oral en agua de bebida. La cantidad de enrofloxacin efectiva es 10 mg/kg p.v. Esta concentración se consigue administrando; Conejos: 1 ml de Colmyc C/litro agua bebida. El tratamiento se realiza durante 5 días en conejos, renovando diariamente el agua de bebida medicada. **Tiempo de espera:** Carne: conejo: 2 días. **Envases de 1 y 5 litros. - Registro número: 1.718 ESP.**



s.p. veterinaria, s.a.

Ctra. Reus-Vinyols Km. 4,1 - Ap. Correos, 60 - Teléfono 977 850 170 - Fax 977 850 405  
43330 RIUDOMS (Tarragona) - [www.spveterinaria.com](http://www.spveterinaria.com)

papel filtro. *Rev. peru. med. exp. salud pública, ene./jul. 1997, vol.14, no.1, p.45-49. ISSN 1726-4634.*

2.- Fortes P, Menitovec J, Ross A, et al. *Evaluation of blood collection on filter paper for detection of antibodies to Human Immunodeficiency Virus type 1. J Clin Microbiol 1989;17:1380-1381.*

3.- Marinkelle, C.J.; Sánchez, N.; Grogl, M. and Guhl, F. 1978. *Recomendaciones para el almacenamiento de sueros absorbidos en papel de filtro bajo condiciones rurales, para el diagnóstico de la infección chagásica con la prueba de inmunofluorescencia indirecta. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 20 (2): 112-114.*

4.- Merino Aguiar JM, Cercenado Mansilla E, de Ori Manchón F, Rojo Martín MD, de la Rosa Fraile M. *Procedimientos en Microbiología clínica. Recomendaciones de la sociedad Española de enfermedades infecciosas y Microbiología clínica. Editores Emilia Cercenado y Rafael Cantón. 2009. www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap32.asp#1c*

5.- OIE. *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Vol 2. Sección 2. 6.*

*Sixth Edition 2008.*

6.- Penacino AG. *Investigación e implementación de sistemas de identificación de individuos por técnicas de biología molecular en www.wwie-corp.com/tesis*

7.- *Prevalencia de la enfermedad de Chagas en niños y mujeres asistidos en centros de atención primaria de la salud de la ciudad autónoma de Buenos Aires.*

*www.bvs.pedriatia.org.ar/premios/chagas\_2007.doc*

8.- Preux PM, Hovinato DS, Nzisabira L, Verdeir M, Dumas M. *The validity of filter paper blood sampling for detection of HTLV 1 seropositive: A Benin study. AJNS 2002 Vol17, N° 12.*

9.- Rosell, JM, de la Fuente LF, García Ximénez F, Gracia E, Baselga R. *Enfermedades de la reproducción en Enfermedades del Conejo. Tomo II. Ediciones Mundi-Prensa, 2000*

10.-Serrano, Olga, Mendoza, Florencio, BENNY, Suárez et al. *Seroepidemiology of Chagas disease in two rural populations in the municipality of Costa de Oro, at Aragua State, northern Venezuela. Bio-médica, Jan./Mar. 2008, vol.28, no.1, p.108-115. ISSN 0120-4157.*

## METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE SANGRE EN PAPEL DE FILTRO PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Se ha puesto a punto una técnica de obtención de sangre total en papel de filtro para pesquisas serológicas de enfermedades de los conejos: RHVD; *Encephalitozoon*; *Chlamydia spp* y Mixomatosis y se propone como alternativa de muestreo para la determinación de anticuerpos, por ser un método sencillo que no requiere muchos cuidados en el envío al laboratorio y ser muy económico.

Material necesario: lanceta o bisturí estéril con punta de menos de 2.0mm, gasa, desinfectante, formulario para la anamnesis y datos epidemiológicos, papel de filtro Whatman N° 4 suministrado por el laboratorio) y guantes.

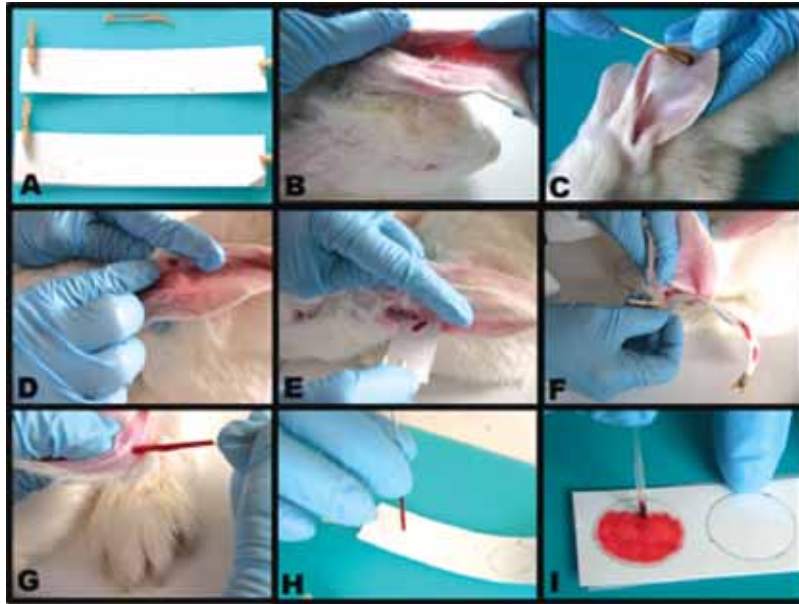
Primero complete toda la información en la hoja de toma de muestras. Para evitar la contaminación de los círculos del papel de filtro, no permita que los círculos entren en contacto con derrames ni tampoco los toque ni antes ni después de la toma de sangre. La foto indica la zona de la oreja donde puede hacerse una punción sin peligro. Limpie el área con un desinfectante y séquela con gasa estéril. Haga una punción en el borde externo de la oreja y deje que se forme una gota grande de sangre. Ver FIG. 1B y 1C.



ÉSTA ES UNA  
ALTERNATIVA A LA  
EXTRACCIÓN DE  
MUESTRAS DE  
SANGRE POR  
VENOPUNCIÓN

Toque la gota de sangre levemente con el papel de filtro. Deje que la sangre se absorba y que llene el círculo por completo con una sola aplicación. No quitar el papel de filtro antes de que la sangre llene por completo el círculo. Aplique la sangre solamente a uno de los lados del papel de filtro. Se deben realizar no menos de 5 círculos por animal. Ver FIG.1D, 1E, 1F

También se puede aplicar la sangre al papel con un tubo capilar u otro dispositivo desprovisto de anticoagulantes, si se realiza de forma continua.



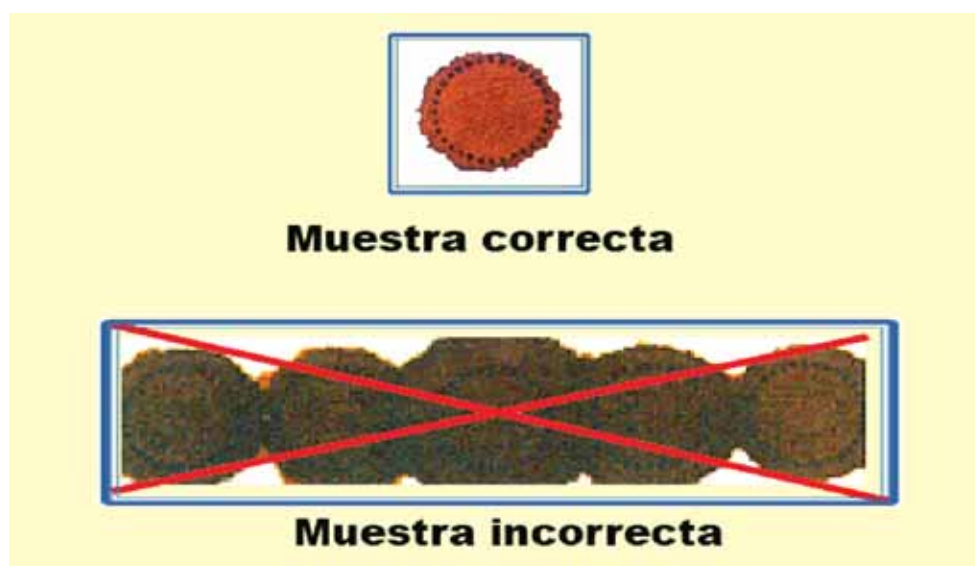
**Figura 1:** Reactor positivo a Mixomatosis  $\geq 100$ . Inmunofluorescencia de localización intracitoplasmática. 400 x

El volumen de muestra será el correspondiente a la gota grande de sangre (50 ml) sin anticoagulante. Ver Figura 1 G, 1H, 1I

Llene los círculos restantes de la misma manera con gotas de sangre sucesivas. No acumule capas sucesivas de gotas de sangre más de una vez al mismo círculo de recolección. Deje secar las manchas de sangre en una superficie plana no absorbente, que esté seca y limpia, durante un mínimo de cuarenta minutos. No la exponga al calor directo. Ver Figura 2

Evite tocar las gotas de sangre o que éstas se rieguen o contacten con las de los círculos colindantes. Las muestras secas se introducen en un sobre o bolsa impermeable cerrada y se envían al laboratorio.

No olvidar que las muestras deben estar acompañadas de una hoja de toma de muestras en la que se especifique claramente que tipo de prueba se solicita y un resumen clínico /vacunaciones, la fecha de la extracción, edad y sexo, estos documentos se colocan dentro de la bolsa de plástico sellada.



**Figura 2:** Manchas de sangre secadas al ambiente. Muestra obtenida correctamente con volumen adecuado y manchas de sangres mezcladas por exceso de muestra en cada círculo del papel de filtro.