

ADAPTACIÓN DE UNA ELISA COMERCIAL PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS A MUESTRAS DE FLUIDOS ORALES (ANTICUERPO DE SUERO PRRS COMERCIAL ELISA) A MUESTRAS DE FLUIDOS ORALES

A. Kittawornrat¹, J. Prickett¹, C. Wang^{1,2}, C. Olsen¹, C. Irwin¹, Y. Panyasing¹, A. Ballagi³,
A. Rice³, R. Main¹, C. Rademacher⁴, M. Hoogland⁴, J. Zimmerman^{1*}

¹Department of Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, Iowa State University, Ames, IA

²Department of Statistics, College of Liberal Arts and Sciences, Iowa State University, Ames, IA

³IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine 04092

⁴Murphy-Brown LLC, Ames, Iowa 50010

INTRODUCCIÓN

¿Anticuerpos en fluidos orales? Sí - como muestra una extensa historia de investigación. Anticuerpos contra *Treponema pallidum* fueron demostrados en fluidos orales en 1940 (Kanter y Appleton, 1940). Wheatcroft (1957) analizó suero y muestras de fluido orales pareados de personas infectadas con *Brucellamelitensis* y demostró una correlación ($r = 0.674$) entre títulos de fijación del complemento de anticuerpos de suero y títulos de aglutinación bacteriana en fluidos orales. Kraus y Konno (1963) mostraron la presencia de anticuerpos en fluidos orales cuando estaban presentes en el suero de la misma persona, concluyendo que era una evidencia de "transferencia selectiva e individualmente controlada de proteínas del suero a la saliva."

Evidencia definitiva de la transferencia de anticuerpos séricos (IgG, IgM, IgA) a la cavidad oral fue reportado por Challacombe et al. (1978) con monos Rhesus. Esto es, IgG, IgM y IgA marcados con radioisótopos fueron inyectados vía intravenosa y detectados en fluidos orales 30 minutos más tarde - la primera muestra recogida. Este simple experimento demostró a la transferencia rápida de anticuerpos derivados de suero a fluidos orales.

Entonces - la investigación mostró que los anticuerpos en el suero se transfirieron a fluidos orales, pero no fue la imagen completa. La producción local de anticuerpos por células plasmáticas derivadas del suero en tejido linfóide asociado a glándulas salivales y conductos (DALY) empezó a ser reconocido (Beckenkamp, 1985; Brandtzaeg, 1981, 1989; Crawford et al., 1975; Mestecky 1987, 1993;

Morrier y Barsotti, 1990). Estas células secretaron IgA en saliva junto con células epiteliales ductales y acinares expresando receptores específicos de IgA. También IgM e IgG fueron encontradas ser secretadas localmente, pero a menor concentración que IgA (Challacombe et al., 1995).

Datos corroborativos de varias especies apoyaron estas observaciones iniciales. Por ejemplo, las respuestas inmunológicas en los tejidos de las cavidades nasales y orales en ratones inmunizados oralmente con micropartículas biodegradables fueron examinadas y células secretoras, IgA fueron demostradas en las glándulas salivales y tejido linfóide asociado nasal (NALT) por ensayos ELISPOT y anticuerpos secretado fueron demostrados en fluidos orales por ELISA a todos los muestreos post-inoculación (Challacombe et al. 1997).

¿Cómo realmente comenzó el diagnóstico en fluidos orales? El informe que propulsó el diagnóstico en fluidos orales fue el aislamiento de VIH de fluidos orales recogidos de personas con SIDA (Groopman et al., 1984). En 1986, se reportaron anticuerpos en fluidos orales contra el VIH en los pacientes con SIDA o sus parejas sexuales (Archibald et al., 1986). Estos investigadores sugirieron que los diagnósticos de VIH podrían hacerse mediante muestras de fluidos orales en lugar de suero. Esta investigación se movió rápidamente y la FDA aprobó el primer kit de recolección de fluidos orales de los anticuerpos de VIH de detección en 1994 (Nightingale, 1995).

Relevancia en la producción porcina. Las muestras de fluidos orales se utilizan cada vez

más para la vigilancia epidemiológica de PRRSV en operaciones comerciales porcinas mediante ensayos basados en PCR (Chittick et al, 2011; Kittawornrat et al., 2010). Mientras que los ensayos basados en PCR son útiles para la detección de la circulación de PRRSV, los ensayos de anticuerpos son puede proporcionar información sobre la inmunidad de la pira e historia de infección previa. Es decir, los anticuerpos son detectables incluso cuando cerdos ya no están replicando el virus. La viabilidad de la detección de anticuerpos en líquidos por vía orales ya ha sido demostrada: ensayos basados en anticuerpos mediante muestras de fluidos orales están ampliamente disponibles en medicina humana para diagnóstico de una variedad de agentes patógenos (Prickett et al., 2010).

Entonces...¿qué pasa con los cerdos?

ADAPTANDO LA ELISA PRRS X 3 A FLUIDOS ORALES PORCINOS

El objetivo del presente estudio fue intentar optimizar una ELISA comercial para PRRS (HerdChek® PRRS X 3 ELISA) a muestras de fluidos orales. Los parámetros de ELISA evaluados en el proceso de optimización incluyó: volumen de muestra, dilución de muestra, tiempo de incubación, isotipo de anticuerpo secundario (IgM, IgA, IgGH& L, IgGFc) y dilución de anticuerpos secundarios (véase la figura).

Estrategia... Para reducir la variación de la respuesta entre muestras de fluidos orales durante el proceso, 11 muestras de fluidos orales ("estándar de referencia") se utilizan en el proceso de optimización para medir los cambios en los parámetros. Las muestras estándar de referencia se obtuvieron de una granja comercial (1100 cerdos) un día antes de la vacunación contra PRRS (Ingelvac® PRRS MLV) y a los días postvacunación DPV 0, 10, 15, 20, 28, 35, 41, 49, 56, 75 y 91. (Estándares de referencias disponibles bajo petición).

Resultados y conclusiones Los resultados mostraron que la prueba ELISA fue fácilmente adaptada para detectar IgM, IgA e IgG en

muestras de fluidos orales. El protocolo desarrollado para la detección de IgG es fácilmente manejable para el desempeño de rutinario de la prueba en un laboratorio de diagnóstico comercial de alto rendimiento

Referencias

- Archibald DW, Zon L, Groopman JE, McLane MF, and Essex M. (1986). Antibodies to human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III) in saliva of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients and in persons at risk for AIDS. *Blood* 67:831-834.
- Beckenkamp G. (1985). Distribution pattern of the cellular oral immune system in the major and minor salivary glands, immunochemical findings. *HNO* 33:196-203.
- Brandtzaeg P. (1981). Transport models for secretory IgA and secretory IgM. *Clinical and Experimental Immunology* 44:221-232.
- Challacombe S, Percival R, and Marsh P. (1995). Age-related changes in Immunoglobulin isotypes in whole and parotid saliva and serum in healthy individuals. *Oral Microbiology and Immunology* 10:202-207.
- Challacombe S, Russel M, Hawkes J, Bergmeier L, and Lehner T. (1978). Passage of immunoglobulins from plasma to the oral cavity in rhesus monkeys. *Immunology* 35:923-931.
- Challacombe, S, Rahman D, and O'Hagan D. (1997). Salivary, gut, vaginal and nasal antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles. *Vaccine* 15:169-175.
- Chittick WA, Stensland WR, Prickett JR, et al. 2011. Comparison of RNA extraction and RT-PCR methods for the detection of PRRSV in porcine oral fluid specimens. *J Vet Diagn Invest* 23:248-253.
- Crawford J, Taubman M, Smith D. (1975). Minor salivary glands as a major source of secretory immunoglobulin A in the human oral cavity. *Science* 190:1206-1209.
- Groopman J, Salahuddin S, Sarnagadharan M, Markham P, Gonda M, Sliski A, Gallo R. (1984). HTLV-III in saliva of people with AIDS-related complex and healthy homosexual men at risk for AIDS. *Science* 226:447-449.
- Kanter F, Appleton J. (1940). Antibacterial effect of saliva on tubercle bacilli. *Journal of Dental Research* 19:279-280.

Kittawornrat A, Engle M, Johnson J, et al. 2010. PRRSV in serum and oral fluid samples from individual boars: Will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res* 154:170-176.

Kraus F, Konno J. (1963). Antibodies in saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences* 106:311-329.

Mestecky J (1987). The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 7:265-276.

Mestecky J (1993). Saliva as a manifestation of the common mucosal immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 694:184-194.

Morrier J, Barsotti O. (1990). [Secretary IgA and the oral cavity: general review] <original> IgA sécrétoire et cavitébuccale: revue générale. *Actualités Odonto-Stomatologiques* 44:349-64.

Nightingale S. (1995). From the Food and Drug Administration: Oral Fluid Specimen Test System for HIV-1 Approved. *Journal of the American Medical Association* 273:613.

Prickett JR, Zimmerman JJ. 2010. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Anim Health Res Rev* 11:207-216.

Wheatcroft M. (1957). A comparative study of human serum and salivary antibody titers in cases of *Brucellamelitensis* infections. *Journal of Dental Research* 36:112-117.

