

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA  
INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA  
Oficina en Paraguay

ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LAS TECNICAS INMUNOENZIMATICAS  
APLICACION PARA DETECTAR PESTE PORCINA

RICARDO ALASTRUE TIERRA  
Veterinario. Cooperante español  
Convenio IICA-M<sup>º</sup> Asuntos Exteriores de España

IICA  
# 2.131  
1985

ASUNCION, Agosto 1985



MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA  
INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA  
Oficina en Paraguay

ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LAS TECNICAS INMUNOENZIMATICAS  
APLICACION PARA DETECTAR PESTE PORCINA AFRICANA

RICARDO ALASTRUE TIERRA  
Veterinario. Cooperante español  
Convenio IICA-M<sup>o</sup> Asuntos Exteriores de España

ASUNCION, Agosto 1985

COLECCION ESPECIAL  
NO SAC DE LA BIBLIOTECA  
IICA-LIMA

9.131

792

El trabajo monográfico ha sido realizado en base a las informaciones obtenidas de las investigaciones realizadas en el Departamento de Virología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) de Madrid (España), por los Dres. Ordás y Sánchez-Vizcaíno y colaboradores, así como por propia recolección de reportes técnicos de bibliografía actualizada, hecha con el propósito de actualizar conocimientos técnicos para los profesionales que realizan su actividad en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Veterinario (LIDIIV), dependiente del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Paraguay, como parte del Convenio CE/ES02-01-83 entre el Ministerio de Asuntos Exteriores de España, Dirección General de Cooperación Técnica Internacional y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

Agradezco la colaboración de la Oficina del IICA en el Paraguay para la elaboración de esta monografía, en especial a su Director, Ing. Agr. Sergio González Espoz y a la Sra. Hortensia Villasboa, por su ayuda mecanográfica en la preparación de este trabajo. Finalmente, al Dr. Germán Gómez por su estímulo y entusiasta apoyo para la compilación de la monografía.



## INDICE

	Pág.
PROLOGO	
1. INTRODUCCION	1
2. FUNDAMENTO Y TIPOS	2
3. MATERIALES Y REACTIVOS	7
4. DESCRIPCION ELISA PARA DETECTAR ANTICUERPOS DE PESTE PORCINA AFRICANA	16
5. COMPARACION DE ELISA CON OTRAS TECNICAS SEROLOGICAS	22
6. APLICACIONES DE ELISA EN PATOLOGIA ANIMAL	25
7. RESUMEN - GUIA PRACTICA DE PROBLEMAS	27
8. BIBLIOGRAFIA	29



## PROLOGO

Entre el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) se ha venido perfeccionando un convenio de trabajo en el área de Salud Animal que comprende el apoyo a las acciones que la Dirección de Normas y Control Agropecuario y Forestal ejecuta para prevenir y controlar las enfermedades animales de prioritario combate.

En el transcurso de la ejecución de estas actividades se ha avanzado en la consolidación de acciones del IICA contra la Peste Porcina Clásica (PPC), Anemia Infecciosa Equina (AIE), Newcastle, Garrapatas y otras, así como para prevenir la introducción de enfermedades exóticas, en especial la Peste Porcina Africana (PPA). A tal efecto, los esfuerzos se han orientado a ampliar la capacidad institucional del MAG mediante el apoyo al mejoramiento de la programación, ampliación de las acciones en el país, utilización del método epidemiológico para mejorar la vigilancia sanitaria, capacitación de los recursos humanos en estas áreas específicas y un esfuerzo continuado para mejorar la capacidad del Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Veterinario (LIDIAV) del MAG del Paraguay.

Dentro del marco del Convenio existente entre el Ministerio de Asuntos Exteriores de España, Dirección General de Cooperación Técnica Internacional y el IICA, el Dr. Ricardo Alastrué ha sido asignado para colaborar en el Paraguay con las acciones que realiza el LIDIAV, para lo cual se ha previsto un plan de acción que comprende su participación en aquellas áreas que el laboratorio ha determinado como prioritarias, las cuales corresponden, fundamentalmente, a PPC, AIE y otras virosis animales. En este sentido, coopera para mejorar los diagnósticos de estas enfermedades mediante el apoyo a la instrumentación de técnicas adecuadas y novedosas que puedan



ser aplicadas para identificar los agentes ~~causales~~ de las mismas, previniéndose que el laboratorio eventualmente utilizará estas técnicas modernas para lograr identificar la etiología de la enfermedad.

Una de estas técnicas es la Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) cuya utilización actual ha mejorado profunda y rápidamente la metodología para diagnosticar las enfermedades, por lo cual se hace necesario conocer ampliamente sus características y los procedimientos para su implementación. Por tales motivos se consideró adecuado recopilar en un trabajo monográfico informaciones relevantes referidas a sus aplicaciones para identificar la PPA, lo cual originó un documento que se presenta a los lectores de una forma condensada y sencilla a fin de lograr una mayor difusión entre todos los técnicos que realizan su labor en un laboratorio de diagnóstico veterinario.

Este trabajo de Alastrué esperamos que sea el inicio de otros que puedan en un futuro servir de apoyo en forma sencilla para el mejoramiento y utilización de las técnicas inmunoenzimáticas en el diagnóstico de enfermedades animales sobre todo teniendo en consideración que su uso permite apoyar a la vigilancia sanitaria porque se pueden realizar análisis en forma masiva para la detección de focos y su discernimiento por métodos de screening, lo cual facilita el diagnóstico en grupos de animales de acuerdo al programa de lucha generados por los equipos epidemiológicos. Además, debe tenerse en cuenta que ELISA es un método sencillo, barato, sensible y específico, características que se buscan en toda técnica de diagnóstico y que permite ampliar su uso adecuado a los recursos de los países aún con dificultades económicas.

Germán Gómez Gutiérrez  
Especialista en Salud  
Animal del IICA



## 1. INTRODUCCION

La lucha contra las enfermedades animales que afectan directamente a la salud y economía de todos los países del mundo implica la existencia de técnicas precisas para el diagnóstico y erradicación de las enfermedades. Las técnicas inmunoenzimáticas "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA), presentan las características de su alta sensibilidad, especificidad, rapidez y economía. En la mayoría de sus aplicaciones son compatibles y normalmente superiores en estos aspectos a numerosas técnicas de diagnóstico y a muchas de las técnicas serológicas convencionales más sensibles: inmunofluorescencia, inmunoelectroforesis, radioinmunoensayo. Si a esto le añadimos su gran versatilidad, como lo indica el hecho de su aplicación en el campo de la Parasitología, Bacteriología, Micología, Virología, Inmunopatología, Endocrinología y Toxicología, entre otros, es fácil concluir la gran importancia de las técnicas inmunoenzimáticas y sus enormes posibilidades de aplicación en Patología Humana, Animal y Vegetal.

Los antecedentes históricos se remontan a los trabajos de AVRAMEAS y URIEL (1966) que concibieron la idea de marcar antígenos y anticuerpos con enzimas para ser usados en técnicas convencionales como la inmunodifusión doble. NAKANE y PIERCE (1966) y WINCKER y AVRAMEAS (1969), procedieron al marcado de anticuerpos mediante enzimas con la finalidad de localizar antígenos virales en cortes de tejidos animales.

Fueron ENGVALL y PERLMANN (1971-1972) quienes, utilizando los métodos anteriormente señalados, describieron el denominado método ELISA, para titular inmunoglobulinas utilizando como inmunoabsorbente tubos de poliestireno e indicaron que la sensibilidad del método, era comparable a los radioinmunoensayos.



VOLLER et al. (1974) pusieron a punto el método en microplaca de poliestireno y sugirieron su uso para detectar anticuerpos, anti-toxoplasma y leishmania. El mismo autor descubrió anticuerpos anti-rubeola y anti-citomegalovirus.

En el año 1975 apareció el primer trabajo de ELISA aplicado a Patología Animal, concretamente a la detección de anticuerpos anti-Trichinella spiralis (RUITENBERG, STEERENBERG y BROSI).

Desde el año 1977 hasta la actualidad, se observa un gran auge en la aplicación de estas técnicas para el diagnóstico de enfermedades animales. A ello se está uniendo la nueva tecnología de los Anticuerpos Monoclonales que están sustituyendo a los anticuerpos policlonales convencionales utilizados en las diferentes técnicas inmunológicas de diagnóstico, aportando especificidad, uniformidad y disponibilidad ilimitada, pero su estudio nos llevaría otra monografía exclusiva a ello.

## 2. FUNDAMENTO Y TIPOS

Las técnicas inmunoenzimáticas forman parte de aquellas reacciones serológicas que utilizan conjugados. El ensayo inmunoenzimático (ELISA) se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que el conjugado resultante tenga actividad, tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y por tanto podrá fácilmente ser revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro.

Los tipos de ELISA más utilizados en Patología Animal se pueden resumir en:



2.1. ELISA indirecto.

2.2. ELISA sandwich.

2.3. ELISA competición.

2.1. ELISA indirecto: para la detección de anticuerpos.

Consta de las siguientes etapas:

- a) Fijación del antígeno específico al soporte sólido.
- b) Lavado para eliminar aquellos antígenos no fijados o fijados deficientemente.
- c) Adición del suero problema. Si tiene inmunoglobulinas específicas reaccionarán con el antígeno fijado, quedando inmovilizado.
- d) Lavado para arrastrar las inmunoglobulinas que no hayan reaccionado.
- e) Adición del suero anti-inmunoglobulinas conjugadas con una enzima.
- f) Lavado para eliminar el conjugado que no ha reaccionado.
- g) Adición del substrato específico para la enzima.
- h) Lectura de los resultados.

2.2. ELISA sandwich-DAS (doble anticuerpo): para la detección de antígeno.

Consta de las siguientes etapas:



- a) Adsorción al soporte sólido de una inmunoglobulina purificada y específica frente al antígeno a estudiar.
- b) Lavado para arrastrar las inmunoglobulinas no fijadas.
- c) Adición de la muestra objeto de estudio. Si contiene antígeno reaccionará específicamente con las inmunoglobulinas fijadas a la fase sólida.
- d) Lavado para eliminar las partes no reaccionantes.
- e) Adición de inmunoglobulinas anti-antígeno marcada con la enzima. Se unirá sólo en el caso de que en la reacción exista antígeno.

Si este conjugado anti-antígeno es obtenido en otra especie distinta a la obtenida en el suero de la etapa a), se llama ELISA sandwich-HADAS y suele dar mejores resultados.

- f) Lavado para eliminar el conjugado que no ha reaccionado.
- g) Adición del sustrato.
- h) Lectura de los resultados.

### 2.3. ELISA competición: para detectar antígeno.

Consta de las siguientes etapas:

- a) Adsorción a la placa de una inmunoglobulina anti-antígeno.
- b) Lavado para eliminar lo no fijado.
- c) Adición de una mezcla de antígenos homólogos del antisuero de a) marcados con una enzima y los antígenos



1. Fijación antígeno a fase sólida



2. Lavado

3. Incubación con muestra con anticuerpos



4. Lavado

5. Incubación con conjugado (enzima-antiglobulina)



6. Lavado

7. Incubación con sustrato (o) y medida del resultado (●)



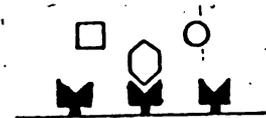
ELISA indirecto

1. Fijación anticuerpo a fase sólida



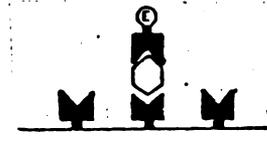
2. Lavado

3. Incubación con muestra con antígeno



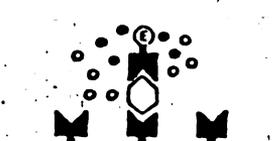
4. Lavado

5. Incubación con conjugado (enzima-anticuerpo)



6. Lavado

7. Incubación con sustrato (o) y medida del resultado (●)



ELISA sandwich

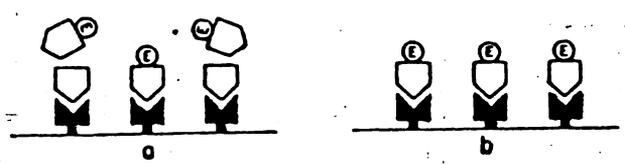


1. Fijación de anticuerpos a la fase sólida



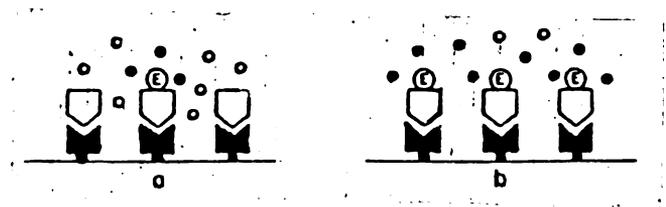
2. Lavado

3. Incubación con antígeno-enzima en presencia (a) o ausencia (b) de antígeno conocido standard



4. Lavado

5. Incubación con sustrato (o) y medida del resultado (●)



ELISA competición



(muestra problema) objeto de estudio. Paralelamente se añade sólomente antígenos homólogos del antisuero marcados con la enzima.

- d) Lavado para eliminar los antígenos que no han reaccionado.
- e) Adición del substrato.
- f) Lectura de los resultados. La diferencia en la densidad óptica de ambas pruebas es proporcional a la concentración del antígeno problema.

### 3. MATERIALES Y REACTIVOS

La técnica ELISA se realiza simplemente mediante la adición secuencial de una serie de reactivos, separados de etapas de lavado. Cada una de las operaciones de esta técnica puede ser realizada manualmente con micropipetas y botellas de lavado. Sin embargo, hoy día se puede encontrar un amplio equipo para la automatización de todas y cada una de las etapas del ELISA, incluyendo la lectura colorimétrica de los resultados. Un simple espectrofotómetro manual es perfectamente adecuado para la lectura de decenas e incluso de cientos de ensayos diarios.

#### 3.1. Fase sólida

La fase sólida debe ser de un tipo que permita un fácil manejo, sobre todo en el proceso de lavado, así como la reproductibilidad de la unión del antígeno o anticuerpo sobre una superficie. Pueden ser geles de poliacrilamida, sefarosa, celulosa, tubos, bolas, microplacas.... Las microplacas de poliestireno polivinilo o polipropileno disponen de 96 pocillos y son muy prácticos y ventajosos para procesar lotes con gran número de muestras.



Una vez la fase sólida cubierta con el antígeno o anticuerpo, lo cual se hace generalmente por adsorción pasiva, el material inmovilizado permanecerá reactivo durante años siempre que se mantenga seco.

### 3.2. Antígeno

Es indudable que existen numerosos métodos de preparación y purificación de antígeno, dependiendo de cada enfermedad. Existen unos parámetros a tener en cuenta: adsorción, concentración, conservación, controles.

3.2.1. Adsorción del antígeno e inmunoglobulinas: dos son los métodos empleados para la adsorción al plástico:

- a) Con carbonato buffer pH 9,6. Incubar toda la noche a 4°C o a 37°C durante 3 horas.
- b) Con fosfato buffer salina pH 7,2, incubando a 40-45°C durante 4 horas.

3.2.2. Concentración del antígeno: hay que conocer la cantidad de proteína mínima necesaria para la realización del método. Para ello se hace una titulación en bloque, utilizando diferentes diluciones del antígeno frente a diferentes diluciones de los sueros positivos y negativos de referencia. Se escoge la dilución máxima de antígeno en la que exista mayor diferencia entre el suero control positivo y negativo. Así por ejemplo en la siguiente placa de titulación: (Los valores se expresan en números enteros de absorbancia):



		Antígeno												
		1/100			1/400			1/800			1/1600			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
		-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	
DILUCION SUEROS	A	1/4	0	9	9	0	9	9	0	8	8	0	5	5
	B	1/8	0	9	9	0	9	9	0	8	8	0	4	4
	C	1/16	0	9	9	0	8	8	0	7	7	0	3	3
	D	1/32	0	9	9	0	8	8	0	6	6	0	2	2
	E	1/64	0	8	8	0	7	7	0	5	5	1	2	2
	F	1/128	0	8	8	0	7	7	0	2	2	1	2	2
	G	1/256	0	8	8	0	6	6	0	2	2	2	1	1
	H	1/512	0	8	8	0	6	6	0	1	1	2	1	1

La concentración a utilizar sería 1/400. Cuando el antígeno está muy diluido los sueros negativos pueden dar falso color, debido a la falta de proteínas antigénicas y a fijaciones inespecíficas de las inmunoglobulinas, ya que al no estar la placa ocupada totalmente por proteínas antigénicas dejan paso libre a la posible adsorción del suero, obteniendo en definitiva falsos positivos.



Este problema se puede resolver añadiendo tras la adsorción del antígeno, seroalbúmina bovina (BSA), N-acetilcisteína, etc. que ocuparían los espacios libres evitando las reacciones inespecíficas.

- 3.2.3. Conservación del antígeno: se debe conservar en estado de concentración, liofilizado, a -70°C o filtrado estéril y a -20°C, mezclado v/v con glicerol bidestilado estéril.
- 3.2.4. Controles del antígeno: para la detección de anticuerpos es conveniente contar con un control de antígeno negativo, debido a que la mayoría de los utilizados presentan gran cantidad de proteínas no específicas, por lo que la utilización de un antígeno negativo (células no infectadas) debe ser siempre una norma a seguir, al menos en los primeros pasos de la puesta a punto de esta técnica.

También se deben usar controles de muestras positivas y negativas hechas en un pool de positivos y negativos lo más amplio posible. Con estos controles comprobaremos si la adsorción y, en general, la realización del método ha funcionado satisfactoriamente.

Otro control importante es el de conjugado. Cuando se encuentra en dilución de trabajo sólo debe mantenerse a + 4°C un máximo de 5 días y siempre debe ser comprobado antes de su uso, testándolo mediante contacto con el substrato en un tubo, comprobando si reacciona o no antes de su utilización en la placa.



### 3.3. Conjugado

La enzima escogida como marcador debe ser tal que se una fácilmente a las proteínas (antígeno o inmunoglobulinas) y que pueda encontrarse en estado puro a precio razonable. Las enzimas más utilizadas son la fosfatasa alcalina de la mucosa intestinal del ternero y la peroxidasa del rábano picante.

Los métodos de conjugación dependen en gran medida del "Agente puente" que debe tener al menos dos grupos activos, uno para unirse a la enzima y otro para la proteína que deseamos conjugar. Los métodos se pueden resumir en dos según el tipo de Agente puente que se utilicen:

- a) Utilización del glutaraldehído
- b) Mediante m-periodato.

Una vez obtenido el conjugado es necesario conocer la dilución óptima de empleo para lo cual se hace una titulación. Para ELISA indirecto y sandwich HADAS, que se utiliza anti-inmunoglobulinas conjugadas, el método ideal es probar diferentes diluciones del conjugado frente a sucesivas diluciones de antisuero en placas tapizadas con antígeno a su concentración idónea, como indica el ejemplo siguiente: (los valores se expresan en números enteros de absorbancia):



		DILUCION CONJUGADO											
		<u>1/200</u>			<u>1/400</u>			<u>1/800</u>			<u>1/1600</u>		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
A	1/4	9	9	4	9	9	1	6	6	0	4	4	0
B	1/8	9	9	4	9	9	1	6	6	0	4	4	0
C	1/16	9	9	4	9	9	1	5	5	0	3	3	0
D	1/32	8	8	4	8	8	0	5	5	0	3	3	0
E	1/64	8	8	3	8	8	0	5	5	0	2	2	0
F	1/128	7	7	3	7	7	0	4	4	0	2	2	0
G	1/256	7	7	3	7	7	0	4	4	0	1	1	0
H	1/512	7	7	3	7	7	0	4	4	0	1	1	0

La dilución óptima de utilización del conjugado sería 1/400, 1/500 en que existe mayor diferencia entre los positivos y negativos. Con el conjugado muy concentrado (1/200) se produce reacción inespecífica (color de fondo). Para ELISA sandwich DAS habrá que tomar también como variable la dosis de tapizado.

Hoy día se está utilizando la proteína A marcada con peroxidasa en sustitución del conjugado antiespecie para la detección



de inmunoglobulinas G (Ig G), utilizándose ya de rutina en la detección de anticuerpos de Peste Porcina Africana (PPA). La proteína A está unida a los peptidoglicanos de la pared celular del *Staphylococcus aureus*, si bien hay una cepa mutante que no la incorpora a la pared celular y así se puede obtener en el so brenadante del cultivo de dichas cepas.

Su principal actividad biológica es la capacidad de interacción con determinadas clases de Ig G (se une a la fracción Fc) tales como humano, conejo, cobaya, ratón, cabra, cerdo..... La interacción de la proteína A con Ig G no afecta a la parte fijadora de antígenos, por lo que es posible formar complejos terciarios con un antígeno, Ig G (anticuerpo) y proteína A.

En el cerdo, la proteína A tiene afinidad por las subclases Ig G<sub>1</sub> y Ig G<sub>2</sub>. En las infecciones por el virus de la PPA se inducen principalmente estas subclases y además, en ningún caso positivo de PPA no se ha comprobado la presencia de estas Ig G, lo que hace que la utilización de la proteína A unida a la peroxidasa como conjugado sea ideal para ELISA indirecto en PPA. La proteína A en comparación con el suero antiespecie reduce notablemente el color producido por los sueros negativos facilitando la lectura visual. Otra ventaja de su utilización es que mantiene de forma más estable la actividad tanto inmunológica como enzimática, así como, al ser una molécula purificada presenta menos variación entre lotes distintos que el conjugado antiespecie.

#### 3.4. Substrato

Permite cuantificar la reacción mediante la hidrólisis oxidativa que se produce. Para la fosfatasa alcalina el substrato más idóneo es el p-nitrofenilfosfato; para la peroxidasa la ortofenildiamina (OPD) como demostró Sánchez Vizcaíno et al. (1982)



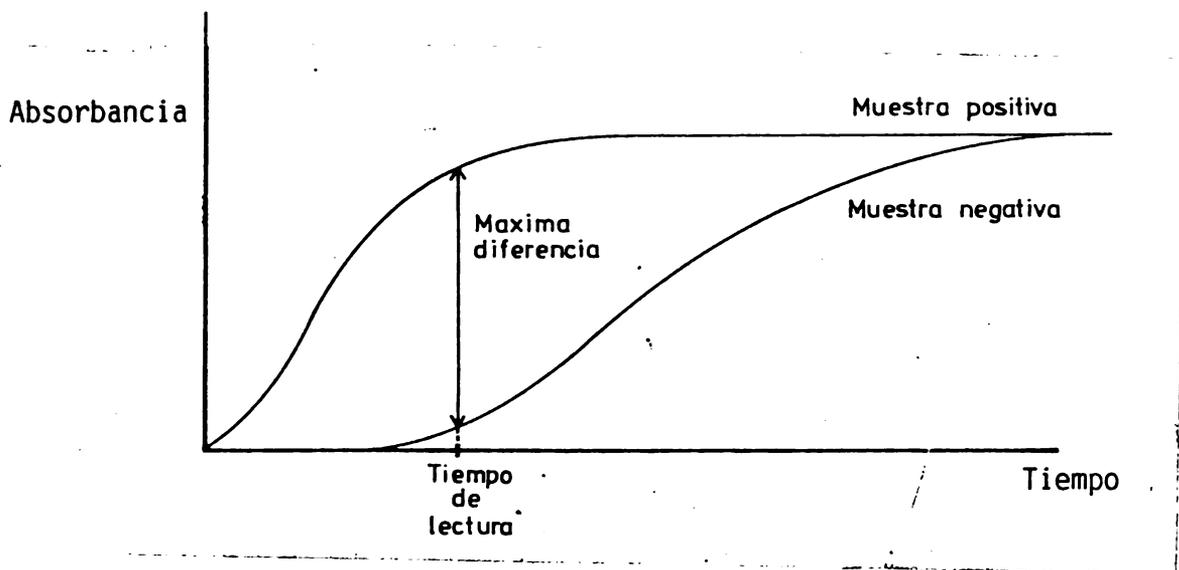
al comparar distintas diluciones de sueros positivos y negativos para PPA con los distintos substratos utilizados para la peroxidasa, analizando diversos parámetros como indica el Cuadro 1 y 2

Otros substratos que se utilizan son: clorhidrato de 3,3 dimetoxibencidina (3,3 DXDH), ácido 5-aminosalicílico (5-AS) y acimo 2,2 dietil bentiazoline del ácido sulfónico (ABTS).

Una vez elegido el substrato idóneo debemos estudiar el tiempo de incubación, realizando lecturas seriadas a diferentes tiempos hasta encontrar el óptimo de incubación que será cuando haya mayor diferencia de color entre positivos y negativos.

### 3.5. Frenado de la reacción

Las reacciones enzimáticas-colorimétricas siguen una curva semejante a la de la figura:





**ELISA: ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES SUBSTRATOS PARA  
PEROXIDASA EN PESTE PORCINA AFRICANA**

15.

**CUADRO 1**

**VALORES MEDIOS COLORIMETRICOS OBTENIDOS  
CON LOS DIFERENTES SUBSTRATOS EN TODOS LOS SUEROS  
POSITIVOS Y NEGATIVOS A DIFERENTES DILUCIONES DE PPA**

SUBSTRATOS	SUEROS-DILUCION	DENSIDAD OPTICA
3,3 DXDH	Positivo 1/8	280,22 ± 10,51
	Positivo 1/80	125,32 ± 5,34
	Positivo 1/800	52,41 ± 1,72
	Negativo 1/8	11,83 ± 6,52
	Negativo 1/80	000,00 ± 00,00
	Negativo 1/800	000,00 ± 00,00
OPD	Positivo 1/8	852,10 ± 12,64
	Positivo 1/80	311,32 ± 3,50
	Positivo 1/800	95,20 ± 1,75
	Negativo 1/8	000,00 ± 00,00
	Negativo 1/80	000,00 ± 00,00
	Negativo 1/800	000,00 ± 00,00
5-AS	Positivo 1/8	159,75 ± 18,51
	Positivo 1/80	89,27 ± 7,72
	Positivo 1/800	000,00 ± 00,00
	Negativo 1/8	5,35 ± 6,39
	Negativo 1/80	000,00 ± 00,00
	Negativo 1/800	000,00 ± 00,00
ABTS	Positivo 1/8	235,27 ± 10,75
	Positivo 1/80	102,34 ± 5,97
	Positivo 1/800	40,37 ± 1,92
	Negativo 1/8	000,00 ± 00,00
	Negativo 1/80	000,00 ± 00,00
	Negativo 1/800	000,00 ± 00,00

**CUADRO 2**

**VALORACION DE DIFERENTES PARAMETROS CON LOS CUATRO  
SUBSTRATOS ESTUDIADOS**

Substrato	Lectura visual	Lectura colorim.	Repetibilidad	Sensibilidad	Laboriosidad en preparación	Peligrosidad
3,3 DXDH	+++	+++ 492 nm	+++	+++	Ninguna	Oncogénico
OPD	++++	++++ 450 nm	++++	++++	Ninguna	Mutágeno
5-AS	+	++ 450 nm	+	+	Grande	Ninguna
ABTS	++	+++ 495 nm	++	+++	Regular	Alguna derivada del frenado



Se consigue un pico de color máximo con la mayor diferencia entre los sueros positivos y negativos. El color de ambos sueros sigue subiendo con el tiempo, pero esta subida es más patente en los negativos. Cuanto mayor sea la diferencia de tiempo entre el momento del pico de máximo color y la lectura, mayor será el error cometido. Para evitarlo:

- a) Utilizar lectores ultrarápidos.
- b) Estabilizar la reacción mediante frenado. Para cada sustrato existe una solución óptima:

5-AS .....	NaOH	0,09 N
3,3 DXDH .....	NaOH	5,N
OPD .....	H2So4	3 N
ABTS .....	EDTA, ácido hidrofúorhídrico y NaOH	1 N

### 3.6. Lectura e interpretación de los resultados.

La lectura de los resultados puede ser valorada tanto visual como colorimétricamente. Una de las grandes ventajas que ELISA aporta al diagnóstico es la objetividad de la lectura. Se puede decir que si bien la lectura visual es importante para un muestreo, la colorimétrica es altamente aconsejable. Esta lectura puede ser realizada desde con un simple colorimétrico hasta con los modernos colorimétricos automáticos, dependiendo del número de muestras que se vayan a analizar.

## 4. DESCRIPCION DE LA TECNICA ELISA PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS DE PPA

### 4.1. Fundamentos del método

El método inmunoenzimático indirecto se basa en la inmovilización a un soporte sólido (placa de poliestireno) del antígeno viral



(VP 73 , proteína estructural mayoritaria del virus de la PPA), donde al añadir el suero problema, si contiene inmunoglobulinas específicas del antígeno, se producirá la reacción antígeno-anticuerpo formando un inmunocomplejo de gran estabilidad. Si no existieran inmunoglobulinas específicas del antígeno PPA, los componentes del suero serían eliminados por lavado. La visualización y cuantificación de las inmunoglobulinas específicas unidas al antígeno, se realiza mediante la unión de la proteína A marcada con peroxidasa (la proteína A se obtiene de la pared celular de *Staphylococcus aureus*) a la fracción cristalizable (Fc) de las Ig G inmovilizadas. De no existir Ig G, la proteína A sería eliminada por lavado y al añadir el sustrato no se produciría color. Si se produce color es porque el sustrato ha reaccionado con la peroxidasa de la proteína A, siendo el color desarrollado proporcional a la cantidad de peroxidasa y por tanto a la Ig G específica.

#### 4.2. Reactivos

1. Placas de poliestireno de 96 pocillos, marca Dynatech Microelisa M129.B desechables, con el antígeno (VP 73) absorbido.
2. Sueros controles positivos y negativos.
3. Proteína A - Peroxidasa (conjugado).
4. Sustrato: ortofenildiamina (OPD).
5. Acido sulfúrico 3N
6. Tampón carbonato pH 9,6
 

CO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> .....	1,59 gr.
CO <sub>3</sub> HNa .....	2,93 gr.
H <sub>2</sub> O dest. ....	1000 ml.

Conservar a 4°C  
Revisar el pH antes de ser usado.



## 7. Solución Salina 0,85% de lavado:

CINa .....	85 gr.
Tween 20 .....	5 ml.
H2O dest. ....	10 l.

## 8. Tampón OPD pH 5 ; conservar a 4°C

Ac. cítrico .....	2,14 gr.
PO4HNa. 2H2O .....	3,54 gr.
H2O dest. ....	400 ml.

## 9. Tampón Fosfato Salino (PBS)-Tween 20 pH 7,4; a 4°C

C1Na .....	8 gr.
PO4H2K .....	0,2 gr.
PO4HNa2.12H2O .....	2,9 gr.
C1K .....	0,2 gr.
Tween 20 .....	0,5 ml.
H2O dest. ....	1000 ml.

## 4 bis - Substrato: según la proporción

15	:	25	:	10
mg		ml		lambdas
OPD tamp.				H2O2 (30%)

Dado el peligro potencial que representa esta sustancia, se recomienda la utilización de guantes y mascarilla durante la manipulación del producto en polvo. Preparar antes de su utilización en frasco opaco.



## 5 bis - Acido sulfúrico 3N, solución de frenado

Acido sulfúrico (+) .....	16,1 ml.
H2O dest. ....	200 ml

(+) S04H2 densidad 1,84; pureza 99%

## 4.3. Realización de la técnica

## 1. Sensibilización de las placas con el antígeno (VP 73)

Como soporte sólido se utilizan placas de 96 pocillos de poliestireno. El antígeno se emplea a la dilución óptima en tampón Carbonato-Bicarbonato pH 9,6 y se añade en cantidad de 100 microlitros (lambdas) por pocillo a la placa, la cual una vez cubierta se incuba durante 18 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo de incubación se lava 4 veces en solución salina con Tween 20 y a continuación se utiliza o bien, se puede conservar durante cinco meses a 4°C sin pérdida de título del antígeno. Si la placa a utilizar ha estado conservada a 4°C se debe lavar al menos una vez en solución de lavado antes de colocar los sueros.

## 2. Adición de sueros control y problema

Se utilizan a la dilución óptima de "screening" de 1/30 en PBS pH 7,2 con Tween 20. Se depositan 100 microlitros de cada dilución de los sueros por duplicado en todos los pocillos de la placa sensibilizada con el antígeno. Una vez cubierta la placa se incuba durante 1 hora a 37°C.

Cuando existan varios sueros a testar es recomendable realizar diluciones de los sueros en una placa separada, añadiendo 200



microlitros de PBS por pocillo, 10 microlitros de cada suero y otros 100 microlitros de PBS. Con estos últimos se homogeneizarán varias veces transfiriéndose su contenido a la placa sensibilizada con el antígeno.

3. Lavado

Transcurrido el tiempo de incubación se realizan cuatro lavados en solución salina de Tween 20.

4. Adición del conjugado (Proteína A-Peroxidasa)

La proteína A se diluye a la concentración de 25 ngr/100 microlitros en PBS pH 7,2 con Tween 20 y se añade en cantidad de 100 microlitros por pocillo de la placa. Una vez cubierta, se incuba durante 1 hora a 37°C.

5. Lavado

Se repite el punto 3.

6. Adición del substrato

La OPD se añade en cantidad de 100 microlitros por pocillo a partir de la dilución de trabajo descrita en el apartado de reactivos. La placa se incuba durante aproximadamente cinco minutos a temperatura ambiente vigilando constantemente los sueros control que son en definitiva los que indicarán el momento idóneo de frenado de la reacción. Tener siempre preparada la solución de frenado.



## 7. Frenado de la reacción

Cuando los controles positivos y negativos alcanzan la coloración adecuada, la reacción es frenada por la adición de 100 microlitros de ácido sulfúrico 3N. Incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente.

## 8. Interpretación de los resultados

Los resultados pueden ser obtenidos por lectura visual o colorimétrica:

### a. Lectura visual

En función del color desarrollado por los controles positivos y negativos. Se denominarán a los sueros problemas positivos en caso de presentar un color igual o mayor al control positivo. En cuanto a los sueros negativos serán aquellos que presenten igual o menor coloración que el suero negativo control.

### b. Lectura colorimétrica

La placa es leída en un colorimétrico a la longitud de onda de 450 nm. Los sueros positivos oscilan entre las 800 y las 1.200 D.O., mientras que los negativos van desde los 200 a las 400, manteniéndose por tanto una gran separación entre los sueros positivos de los negativos. Si la reacción fuera frenada antes de tiempo o la proteína A estuviera a una concentración inferior los resultados serían sensiblemente más bajos pero siempre se podrán diferenciar los positivos de los negativos aunque quizás las diferencias



# IICA



**INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA  
INTER - AMERICAN INSTITUTE FOR COOPERATION ON AGRICULTURE  
INSTITUT INTERAMERICAIN DE COOPERATION POUR L'AGRICULTURE  
INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACÃO PARA A AGRICULTURA**

Oficina en Paraguay  
Casilla 287  
Cable: IICA ASUNCION  
Asunción - Paraguay

AS/PY-1277  
23 de diciembre de 1985

Señor  
Dr. Dante Castagnino  
Especialista en Salud Animal  
IICA  
Bogotá, Colombia

De mi consideración:

Dentro del marco del Convenio de Cooperación MAG-IICA en Salud Animal, se ha venido apoyando a las instituciones nacionales del Paraguay mediante el continuo envío de información técnica relevante sobre aspectos de Salud Animal. Al mismo tiempo, a través del Convenio existente entre el IICA-Ministerio de Asuntos Exteriores de España, se cuenta con la participación de técnicos cooperantes en aquellas actividades específicas que los proyectos de Salud Animal del IICA conducen en los países, como ocurre en Paraguay, que recibe apoyo en este sentido.

A este respecto, el cooperante español, Ricardo Alastrué ha preparado una monografía actualizada sobre la técnica E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), la cual se ha constituido últimamente en un procedimiento avanzado para el diagnóstico de reacciones antígeno-anticuerpo en Patología Humana y Animal.

... Por estimar de interés para esa Institución de esta información, le estoy haciendo llegar el presente trabajo.

Hago propicia esta oportunidad para saludarle muy atentamente,

Augusto Donoso Echegoyen  
Director Encargado de la Oficina  
del IICA en el Paraguay



no fueran tan grandes como las comentadas. Por el contrario si la reacción no es frenada a tiempo o la proteína A está muy concentrada se producirá color muy rápidamente to mando los controles más color de lo normal.

#### 5. COMPARACION DE ELISA CON OTRAS TECNICAS SEROLOGICAS

En el Cuadro 3 se compara la técnica ELISA con alguna de las técnicas serológicas más utilizadas en patología como son: radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia (IF), inmunodifusión (ID) e inmunoelectromicroscopía (IEM).

Cuadro 3

#### COMPARACION DE ELISA CON OTRAS TECNICAS SEROLOGICAS DE DIAGNOSTICO

	ELISA	RIA	IF	ID	IEM
1. Sensibilidad	alta	alta	media-alta	baja	muy alta
2. Reproductibil.	buena	muy buena	buena	buena	buena
3. Prep. antfg.	complejidad	complejidad	fácil	fácil	fácil
4. Conjugados	comercial.	comercial.	comercial.	-	-
5. Lectura	objetiva	objetiva	subjetiva	subjetiva	subjetiva
6. Uso en condiciones de campo	posible	imposible	posible?	posible	imposible
7. Automatización	posible	posible	imposible act.	posible	imposible
8. Ejecuc. método	fácil	complic.	fácil	fácil	complic.
9. Coste por ensayo	bajo	alto	bajo	bajo	muy alto
10. Vida media reactivos	larga	corta	larga	larga	larga
11. Peligro personal	ninguno	presente	ninguno	ninguno	ninguno
12. Capacidad de procesar gran número de muestras	sí	sí	no	no	no



### 5.1. Sensibilidad de la ELISA

Es la mínima concentración de antígeno o de inmunoglobulinas que se puede detectar con seguridad. La sensibilidad del método se determina realizando sucesivas diluciones a partir de una solución madre de concentración conocida evaluada por un método sensible.

La sensibilidad de la técnica ELISA se encuentra en el rango de los picogramos. La sensibilidad relativa de otras reacciones serológicas es:

#### Mínimo de N de anticuerpo ( $\mu$ gr) detectable

##### Precipitación

- Inmunodifusión ..... 0,1 - 0,3
- Inmunoelectroforesis cruzada ..... 0,01 - 0,03

##### Aglutinación

- Hemaglutinación pasiva ..... 0,001
- Inhibición hemaglutinación ..... 0,001
- Test de Coombs ..... 0,01

Fijación de complemento ..... 0,05

### 5.2. Repetibilidad de la ELISA

Se analiza repitiendo el máximo de muestras posibles en el máximo de ocasiones diferentes. Un ejemplo del grado de repetibilidad conseguido con esta técnica en varios países europeos, ha sido puesto de manifiesto en la detección de anticuerpos de PPA resultando un 100 por 100 de repetibilidad.



### 5.3. Fiabilidad de la ELISA

No basta con probar que con el método se diagnostican correctamente todas las muestras positivas y negativas experimentales, sino que también es necesario ensayarlo en condiciones de campo y averiguar por medio de otras técnicas si los resultados obtenidos por ELISA concuerdan o no con la realidad.

Es importante al poner a punto una técnica el compararla con otras que deberán ser de mayor sensibilidad y especificidad. Para comparar dos técnicas se pueden utilizar las fórmulas que se indican a continuación:

#### VALORES COMPARATIVOS DE ELISA FRENTE A ENFERMEDAD U OTRA TECNICA

		Enfermedad u otra técnica	
		+	-
Resultado del diagnóstico por ELISA	+	A	C
	-	B	D

$A+B+C+D = N^{\circ}$  total de diagnósticos efectuados con ambas técnicas

$$\text{Sensibilidad comparada} = \frac{A}{A+B} \times 100$$

$$\text{Especificidad comparada} = \frac{D}{C+D} \times 100$$



Ejemplo : ELISA indirecto por PPA (antígeno VP73 ; conjugado Prot. A-PRP)

		IFI					IFI		
		+	-		+	-			
ELISA	+	90	1	91	IEOP	+	80	25	105
	-	0	84	84		-	10	60	70
				175					175
		Sensib.	100%			Sensib.	88%		
		Especif.	98%			Especif.	70%		

Fuente: Hortiguela O. y Sánchez-Vizcaíno J.M.  
(1984)

6. APLICACIONES DE ELISA EN PATOLOGIA ANIMAL

Las técnicas inmunoenzimáticas están teniendo mucha aplicación en el diagnóstico en Patología Animal. Muchas son las enfermedades que están siendo diagnosticadas mediante esta técnica, obteniéndose en todos los casos resultados favorables; otras se están poniendo a punto. Entre las enfermedades donde se aplica ELISA están:

Virosis

FMDV (Fiebre aftosa)  
Lengua Azul  
Rotavirus

BVD (Diarrea vírica bovina)  
PPC  
Influenza



Virosis

Newcastle	Bronquitis infec. aviar
Parainfluenza-3	PPA
Virus sincitial bovino	Adenovirus
Rabia	Parvovirus
Leucosis bovina	Rinotraqueitis infec. bovina
Leucosis aviar	Aujeszky
Maedi-visna	Mixoma
AIE	Arteritis vírica aviar
Gastroenteritis infec. cerdo	FOCMA (oncornavirus felino)
Peritonitis infec. felina	Necrosis pancreática infec. salmónidos

Enfermedades Bacterianas

Leptospira	Neisseria
Salmonella	Klebsiella
Mycobacterium tuberculosis	Toxina tetánica
Pseudomona aeruginosa	Escherichia coli (K88 y K99)
Haemophilus pleuroneumoniae	Enterotoxina Staphylococcus Grupo A
Brucella abortus, ovis	Bordetella bronchiseptica
Enterotoxina de Cl. perfringens	Pasterella haemolytica
Campilobacter fetus	

Enfermedades Parasitarias

Trichinella spiralis	Leishmaniosis
Toxoplasma gondii	Anaplasma marginali
Fasciola hepática	Oesophagostomum
Toxocara canis	Sarcocystis
Babesia	Dictyocaulus viviparus
Tripanosoma	



Otras Enfermedades Infecciosas

Rickettsias  
Mycoplasmas  
Clamydias

Otras Aplicaciones

- Hormonas: Insulina, estrógenos, progesterona, testosterona, cortisol, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, TSH.
- Enfermedades autoinmunes: Detección anticuerpos anti-tiroglobulina, anti-eritrocito, anti-DNA, complejos inmunes, factor reumatoide.
- Factores de coagulación:
- Drogas
- Inmunoglobulinas G, A, E, M.
- Ferritina

7. RESUMEN - GUIA PRACTICA DE PROBLEMAS

En la práctica rutinaria de la técnica ELISA, pueden surgir problemas que en la mayoría de los casos son muy simples y por ello se suele con frecuencia omitir su comentario. Los más frecuentes se pueden resumir en:



Problema

Placas con color indiscriminado.  
Poca diferencia entre controles  
positivos y negativos.

Placas sin coloración

Poca diferencia entre positivos  
y negativos.

Falta de repetibilidad

Posible causa

- Adsorción defectuosa
  - Conjugado muy concentrado
  - Lavado insuficiente
  - Controles negativos erróneos
  - 
  - Conjugado muy diluido
  - Substrato poco concentrado
  - Lavado excesivo
  - Tiempo de incubación corto
  - Ausencia de controles positivos
- 
- Reacciones cruzadas
  - Conjugado muy concentrado
  - Conjugado muy diluido
  - Substrato mal diluido
  - Poco tiempo de incubación del  
substrato
  - Lavado del conjugado defectuoso
  - Reactivos viejos.
- 
- Manipulación incorrecta
  - Controles equivocados
  - Inmunoabsorbente en mal estado
  - Frenado del substrato incorrecto
  - Lectura a longitud de onda no  
idónea.
  - Aparato de lectura averiado



8. BIBLIOGRAFIA

- Abu Elzein, Crowther J.r., 1987. Enzyme-labelled immunosorbent assay techniques in Footh and Mouth virus research. *J.Hyg Camb.* 80, 391-399.
- Atanasius et al, 1978. Detection of rabies antibodies by ELISA technique. *Medical Microbiol. Immunol.*, 166, 201
- Atanasius P., Perrin P., 1977-79. Microméthode immunoenzymatique de titrage des anticorps antirabiques: utilisation de la glycoprotéine rabique et de la protéine A conjuguées à la peroxydase. *Annals. Inst. Pasteur. Paris.* 180 A, 257-268.
- Avrameas S., 1969. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, 6, 43.
- Avrameas S., Ternynck T., 1971. Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry*, 8, 1175.
- Avrameas S., Ternynck T., Guesdon J.L., 1978. Coupling of enzymes to antibodies and antigens in quantitative enzyme immunoassay. Edited by Engvall and Pesce. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Bidwell D.E., et al, 1978. Comparisons os serological test for babesia in British cattle. *Vet. Rec.* 103, 446.
- Briaire J., Meloen R.H., Barteling S.J., 1979. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody against Aujeszky's disease virus in pig sera. *Zbl.Vet. Med. B.* 26, 76-81.
- Bunnells C., Wells P.W., Dawson A.M., 1978-79. The quantitative estimation of antibody to *Pasteurella haemolytica* in sheep sera using a microenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Vet. Microbiol.* 3, 291-301.
- Byrd J.W., Heck F.C., Hidalgo R.J., 1979. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Brucella abortus* antibodies. *Am.J.Vet. Res.* 40,6, 896-897.
- Carlsson H.E., Hurvell B., Lindberg A.A., 1976. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for titration of antibodies against *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica*. *Acta path.microbiol.scand.* 84C, 168-176.



- Carlsson H.E., Lindberg A.F., Hammarstrom S., 1972. Titration of antibodies to Salmonella O antigens by enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.* 6, 703 - 708.
- Crowther J.R., Abu Elzein E., 1979. Detection and quantification of FMDV (fièvre aphteuse) by enzyme-labelled immunosorbent assay techniques. *J.gen. Virol.*, 42, 597 - 602.
- Dees C., et al., 1982. An ELISA test to detect antibody to Bordetella bronchiseptica. *Vet. Immunol. Immunopathol* 3, 539-545.
- Ellens D.J. Van Balken J.A.M. de Leeuw P.W. 1978. Diagnosis of bovine coronavirus infections with haemadsorption - elution-Haemoagglutination assay (HEHA) and with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Proc. Int. Symp. Neonatal Diarrhea. University of Saskatchewan* 2, 321-330.
- Ellens D.J., et al., 1978. Comparison of five diagnostic methods for the detection of rotavirus antigens in calf faeces. *Med. Microbiol. Immunol.* 166, 157-163.
- Engvall E., Perlmann P., 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) - Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 871-874.
- Gielkens A.L.J., et al., 1981. Test protocol of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against bovine leukosis virus. *The Vet. Quarterly* 3, 34-37.
- Harmon M.W., Drake S., Kasel J.A., 1979. Detection of adenovirus by enzyme-linked immunosorbent assay. *J.Clin. Microbiol.* 3, 342-346.
- Hardy R.M., McIntosh K. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of respiratory syncytial virus infection: Development and description. *J.Clin.Microbiol.*, 16, 324-328.
- Herrmann H., 1978. Differenzierung von Influenza virus antigens mit dem enzymimmuns assay. *Arch. esp. Vet. Med.* 32, 489-494.
- Halley D.L., Allen S.D., Barnett B.B., 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibody to detect enterotoxigenic Escherichia coli K99 antigen in faeces of dairy calves. *Ann. J. Vet. Res.* Vol 45, 2613-2616.
- Horowitz S.A., Cassel G.H., 1978. Detection of antibodies to Mycoplasma pulmonis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Infec. Immun.* 22, 161-170.



- Honwers D.J., Gillkaus A.L.S., 1979. An ELISA for the detection of *Maedivisna* antibody. *Vet. Rec.* 104,26.
- Knape F. van, Framstad K., Ruitenberg E.J., 1976. Reability of ELISA as control method for the detection of *Trichinella spiralis*. *J. Parasit.* 62, 332.
- Kodama Y., Agata M., Shimizy Y., 1980. Detection of antibody against transmissible gastroenteritis virus of pigs by indirect immunoperoxidax antibody test. *Amm. J. Vet. Res.* 41, 133-135.
- Lewis V.J., Thacker W.L., Mitchell S.H. 1977. ELISA for Chlamydial antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 6, 5, 507-510.
- Log T., Chang K.S.S., 1979. Enzyme immunoassay for feline oncornavirus associated cell membrane antigen (FOCMA) and detection of FOCMA in all extract by enzyme immunoassay inhibition test. *J. Immun. Moth.* 26, 291-303.
- Mc Rill C.M., Kramer T.T. 1983. Application of ELISA to the detection of *Salmonellae* from infected animals. *World Assoc. Vet. Lab. Diagn. Proced. Third. Int. Syrup. Vol II*, 539 -543.
- Masihi K.N., Lange W., 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of influenza type - specific antibodies. *J. Immunol. Method.* 36, 173-179.
- Mesanza J.R., Sánchez-Vizcaino J.M., Barrera J., 1982. Adaptación del Enzimoimmunoensayo (ELISA) a la detección de anticuerpos Anti-Adeno 127 en aves. *Anales INIA. Serie Ganadera*, 17 111 - 121.
- Morris J.A., 1979. The application of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the detection of *Mycobacterium* antibodies. *Vet. Rec.* 104, 14.
- Moutou F., Toma B., Fortier B., 1978. Application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of Aujeszky's disease in swine. *Vet. Rec.* 103, 264.
- Nagy L.K., Pickard D., Bhogai B.S., 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of enteropathogenic *Escheridia coli* in the faeces of experimentally infected pigs. *World Assoc. Vet. Lab. Diag. Proced. Third Intern. Symp. Vol II*. 633-638.



- Nelson L.D., Kelling C.L., 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of transmissible gastroenteritis virus antibody in swine sera. *Am. J. Vet. Res.*, 45.
- Nicholson B.L., Caswell P., 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Clin. Microbiol.* 16, 469-472.
- Ressang A.A., et al., 1978. Studies on bovine leukosis VI. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine leukosis virus. *Ann. Rech. Vet.* 9, 663-666.
- Ressang A.A., et al., 1981. Studies on bovine leukosis VII. Further experience with an ELISA for the detection of antibodies to bovine leukosis virus. *Teh Vet. Quarterly* 3, 31 - 33.
- Reynolds D.J., et al., 1984. Evaluation of ELISA and electron microscopy for the detection of coronavirus and rotavirus in bovine faeces. *The Vet. Rec.* 114, 397 - 401.
- Ruitenbergh E.J., et al., 1976. Reliability of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of trichinella spiralis infections in conventionally raised pigs. *J. Immun. Meth.* 10, 67-83.
- Ruitenbergh E.J., Knapen F. van., 1977. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application to parasitic infections. *J. Infec. Dis* 136, 267.
- Sánchez-Vizcaíno J.M., Martín L., Ordas A., 1979. Adaptación y evaluación del enzimo inmunoensayo para la detección de anticuerpos anti peste porcina africana. *Laboratorio* 67, 311-315.
- Sánchez-Vizcaíno J.M., et al., 1980. Enzimo inmunoensayo: un nuevo método para la detección de la peste porcina africana. *ONE.*, 9, 18.
- Sánchez-Vizcaíno J.M., et al., 1982. Enzimo inmunoensayo: estudio comparativo de diferentes substratos para peroxidasa. *An INIA. Serie ganadera* 14.
- Sánchez-Vizcaíno J.M., et al., 1983. Comparative Studies of two for the Detection of ASF Antibodies. *African Swine Fever. CEC Eur.* 8466, 101-106.
- Saunders G.L., 1977. Development and evaluation of an enzyme-labelled antibody test for the rapid detection of Hog Cholera antibodies. *Am. J. Vet. Res.*, 88, 1, 21-25.



- Saunders G.L., et al., 1977. Application of the indirect enzyme labelled antibody microtest to the detection on surveillance of animal disease. *J. Infect. Dis.* 136,258-262.
- Sherrer R., Bernard S., 1977. Application of ELISA to the detection of calf Rotavirus and Rotavirus antibodies. *Ann.Microbiol (Inst. Pasteur)*. 128A, 47.
- Sippel J.E., et al., 1978. Outer membrane protein antigens in an ELISA for salmonella enteric fever. *J. Clin. Microbiol* 7, 372-378.
- Slaght S.S., et al., 1978. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting chicken anti-reovirus antibody at high sensitivity. *Avian Dis.* 22,4, 802-805.
- Soula A., Moreau Y., 1984. Antigen requirements and specificity of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting infectious bronchitis viral antibodies in chicken serum. *Arch.Virol.* 67, 283-285.
- Tomer B., Moutou F., Fortier B., 1977. Application of ELISA for diagnosis of Aujeszky's disease in swine. *Proc. 5th World IPVS, Zagreb, Abstract, 34.*
- Voller A., Bidwell E., 1977. ELISA use on the diagnosis of Newcastle disease. *Biochemical application of Immobilized enzymes and proteins.* Ed. Changy. T.Plorum Press, N° 119.
- Voller A., Bidwell E., Barlett A., 1979. *The Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA).* Dynatech Europe Borurrough House. England.
- Yolken F.H., Wyatt R.G., Kepikian A.Z., 1977. ELISA for rotavirus *Lancet* 8045, 819.
- Yolken R.H., et al., 1983. Enzyme Immuno assays for the Diagnosis of Viral Infections. *Annal N.Y. Ac. Sciences*, 5, 381-390.





IICA-CIDIA  
BIBLIOTECA  
Bogotá-Columbia



