

ESTANDARIZACION Y EVALUACION DE UN ENZIMOINMUNOENSAYO PARA DIAGNOSTICO Y SEROEPIDEMIOLOGIA DE TRIQUINOSIS HUMANA

Emilio COLTORTI (1), Eduardo FERNÁNDEZ (2) & Graciela SANTILLAN (3)

RESUMEN

Se estandarizó un enzimoimmunoensayo (EIE) en fase sólida en el que se empleó un antígeno soluble total de *T. spiralis* y una dilución única de suero, y se evaluó la capacidad del sistema para detectar anticuerpos totales antitriquina con fines diagnósticos y seroepidemiológicos.

Las curvas dosis respuesta mostraron que trabajando con una dilución de suero de 1:100 se obtenía una buena diferenciación entre sueros de individuos no infectados y pacientes de triquinosis con baja concentración de anticuerpos circulantes y la respuesta fue lineal entre valores de 0.15 y 0.64 unidades de densidad óptica (DO). El estudio de 720 sueros de población general no infectada reveló una $\bar{X} = 0.07$ y una $S = 0.03$ unidades de DO. El 98,61% de esta población presentó valores de $DO < \bar{X} + 3S$; el 1,25% valores de DO entre $\geq \bar{X} + 3S$ y $< \bar{X} + 4S$; y el 0,14% restante valores entre $\geq \bar{X} + 4S$ y $< \bar{X} + 5S$.

Se empleó un valor de $DO = \bar{X} + 5S$ como nivel diagnóstico para estudiar 4 brotes de triquinosis humana, 80 sueros de pacientes de triquinosis con diferentes títulos en inmunofluorescencia indirecta (IFI) y 20 sueros de pacientes de hidatidosis. El EIE propuesto permitió diferenciar en forma confiable y eficiente población infectada de no infectada y tuvo una buena correlación con la IFI. Todos los sueros de pacientes hidatídicos presentaron valores de $DO < \bar{X} + 4S$.

UNITERMOS: Triquinosis, Inmunodiagnóstico, Enzimoimmunoensayo.

INTRODUCCION

En triquinosis humana, la investigación de anticuerpos específicos contra los antígenos de *T. spiralis* con fines diagnósticos comienza con el empleo de la fijación de complemento por STROBEL en 1911¹¹. Desde entonces se han ensayado y evaluado la casi totalidad de procedimientos inmunológicos descritos con la finalidad de contribuir al diagnóstico de la infección durante la fase aguda, confirmar la enfermedad retrospectivamente y realizar estudios seroepidemiológicos.

Desde el advenimiento de los métodos inmunoenzimáticos heterólogos, se ha resaltado la conveniencia de su aplicación al inmunodiagnóstico de las enfermedades parasitarias enfatizando su alta sensibilidad para detectar antígenos o anticuerpos, el empleo de microtécnicas con considerable ahorro de antígenos de difícil obtención y la posibilidad de automatización del proceso.

El enzimoimmunoensayo (EIE) fue aplicado por vez primera al diagnóstico de la tri-

(1) Centro Panamericano de Zoonosis, Programa de Salud Pública Veterinaria, Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud, Casilla de Correo 3092, Correo Central, 1000 Buenos Aires, Argentina.
(2) Laboratorio de Control de Patología Prevalentes. Subsecretaría de Salud. Trelew, Chubut, Argentina.
(3) División de Inmunoparasitología, Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán". Buenos Aires Argentina.

quinosis humana en 1975^{4,10} y desde entonces varias han sido las variantes metodológicas y los antígenos empleados para la detección de las diferentes clases de inmunoglobulinas específicas^{1,5,7,12,14}.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad de detección de anticuerpos totales anti-triquina con fines diagnósticos y seroepidemiológicos, mediante un EIE en fase sólida trabajando con dilución única y empleando un antígeno soluble total de *T. spiralis*.

MATERIALES Y METODOS

Sueros humanos:

Se emplearon 199 sueros humanos obtenidos de 4 brotes (B1, B2, B3 y B4) que se originaron por la ingestión de carne de cerdos infectados con *T. spiralis*. Se obtuvieron muestras de suero de 36, 26, 12 y 17 pacientes en los brotes B1, B2, B3 y B4 respectivamente. De los pacientes afectados en los brotes B1, B2 y B3 se obtuvieron 2 muestras de sangre: en el B1 a los 25 y 40 días de la ingestión infectante, en el B2 a los 19 y 32 días en el B3 a los 19 y 26 días post-ingesta. De los pacientes del B4 se obtuvieron muestras a los 20 días, 2 meses y 12 meses. Se emplearon también 80 sueros de pacientes afectados de triquinosis que al ser estudiados por inmunofluorescencia indirecta para triquinosis presentaron títulos diversos (20 sueros 1.64; 20 sueros 1:128; 20 sueros 1:256; 20 sueros > 1:256). Se seleccionó un grupo de 720 sueros obtenidos de población general (PG) residente en áreas rurales donde no se informaron brotes de triquinosis en los últimos 2 años. Se examinaron 20 sueros de pacientes con hidatidosis que presentaban niveles altos de anticuerpos antihidatídicos en EIE (más de 6 desvíos estándar sobre la media de la región de la cual se obtuvieron los sueros) y anticuerpos anti-antígeno 5 en DD5³. Todos los sueros eran de habitantes del sur de la República Argentina.

Sueros controles:

Como sueros controles (SC) en EIE se emplearon tres pools de sueros humanos. El SC 1 es un pool de 6 sueros humanos normales que en inmunofluorescencia indirecta (IFI) dieron valores menores a 1:64; el SC 2 es un

pool de 5 sueros humanos de pacientes de triquinosis que en IFI dieron valores de 1:128; el SC 3 es un pool de 3 sueros humanos de pacientes de triquinosis que en IFI dieron títulos de 1:512.

Cada uno de estos pools se diluyeron 1:10 en PBS pH 7,2, se distribuyeron en viales en volúmenes de 0.1 ml, se liofilizaron y conservaron a 4° C. El liofilizado se reconstituyó en 10 veces el volumen original con PBS pH 7,2 Tween 0,5% y a esa dilución final de 1:100 se empleó en EIE. Los controles una vez rehidratados se usaron en el día y luego se descartaron.

El SC2 se usó para realizar las correcciones de DO placa a placa (dentro del día) y día a día con la finalidad de hacer comparables entre sí la totalidad de los resultados obtenidos.

Conjugados antiinmunoglobulinas humanas

En EIE e IFI se emplearon conjugados preparados con suero de conejo polivalente antiinmunoglobulinas humanas G, A y M (H + L) marcados con peroxidasa de rábanos e isotiocianato de fluoresceína respectivamente (Dako Co.).

Antígeno

Las larvas se mantuvieron por pasaje en ratas Wistar. Ratas de 150 a 200 g de peso se infectaron por vía oral con 3000 larvas de *T. spiralis*. Las larvas infectantes (L₁) se recuperaron digiriendo músculos de ratas infectadas en una solución de pepsina 1% (Difco 1:3000) y ácido clorhídrico 0.5% en agua destilada, durante 18 horas a 37°C, con agitación. Las larvas se separaron por decantación, se lavaron con PBS, se resuspendieron en sacarosa 0,25 M y se rompieron en un homogeneizador. El homogeneizado se centrifugó a 15.000 rpm, se descartó el precipitado, el sobrenadante se dializó contra PBS durante 18 hs a 4°C y luego se centrifugó a 35.000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante de esta última centrifugación constituye el antígeno soluble empleado en EIE.

Se controló la composición cuali-cuantitativa del antígeno mediante la determinación de proteínas y el análisis inmunoelectroforético frente a un pool de sueros de conejos hi-

perinfectados. Los valores de proteína para cinco lotes de antígenos preparados en la forma descripta oscilaron entre 20-25 mg/ml. El análisis inmunolectroforético frente a un pool de sueros de conejos hiperinfectados mostró entre 7 y 9 bandas de precipitación y la presencia, ubicación y morfología de las bandas se repitió en los 5 lotes estudiados.

Prueba de inmunofluorescencia indirecta

Se realizó siguiendo un procedimiento que ya fuera descrito². Larvas libres de *T. spiralis* (L₁) se incluyeron en OCT (Tissue-Tek, Ames Co.) y se prepararon cortes de criostato de 4 μ de espesor los cuales se montaron sobre portaobjetos y se conservaron a -20°C. Previamente al empleo en la prueba de IFI, se eliminó el OCT y los cortes se fijaron en acetona. Se usó un conjugado polivalente anti-inmunoglobulinas humanas G, A y M, (H + L) marcado con fluoresceína (Dako Co.) y el criterio de positividad se basó en la localización de fluoresceína sobre la cutícula del parásito. En estudios anteriores se observó que empleando esta prueba de IFI el 4,2% de personas aparentemente no afectadas de triquinosis presentaban títulos de 1.64 y que títulos iguales o superiores a 1:128 eran compatibles con una infección por *T. spiralis*².

Enzimoimmunoensayo indirecto (EIE)

El procedimiento general se basó en los micrométodos descritos^{3,9}. La optimización y normalización se llevó a cabo mediante una serie de experiencias en las cuales se realizaron las curvas dosis-respuesta para determinar el rango de linealidad del sistema, la concentración de antígeno necesaria para sensibilizar las placas, la dilución de uso del conjugado y la dilución de trabajo de los sueros problemas. Para ello se emplearon los sueros controles 1, 2 y 3; 5 sueros de pacientes de triquinosis con diferentes concentraciones de anticuerpos circulantes y 2 sueros de personas no infectadas con *T. spiralis*. Se usaron diluciones dobles de los sueros desde 1:25 a 1:6400. El antígeno se ensayó a concentraciones de 5, 10, 20 y 40 μ g/ml y el conjugado se estudió a diluciones de 1:250, 1:500, 1:1000 y 1:2000. A continuación se describe el procedimiento optimizado y normalizado, en base a los resultados de estas experiencias, los cuales se detallan en la sección correspondiente.

Se emplearon placas de 96 microcubetas de fondo plano (Immunolon I, Dynatech). Las placas se sensibilizaron colocando en cada microcubeta 50 μ l de una solución de antígeno en buffer carbonato 0.1 M pH 9.6 (20 μ g de proteína/ml), durante 18 horas a 4°C en cámara húmeda. El exceso de antígeno se eliminó invirtiendo las placas y haciendo 3 lavados sucesivos de 5 minutos cada uno con 200 μ l de PBS pH 7,2 con 0.5% Tween 20 (PBS/T 0,5). A continuación se colocó 50 μ l de una dilución 1:100 en PBS/T 0.5 de los sueros en estudio y controles. Las microcubetas correspondientes al blanco de reactivos se cargaron en esta etapa con 50 μ l de PBS/T 0.5. Las placas se incubaron en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos. Se eliminó luego el contenido y se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS/T 0.5. A continuación se cargaron las microcubetas con 50 μ l de conjugado polivalente anti Igs humanas G, A y M (H + L) diluido a la concentración de trabajo elegida (1:1000) con PBS/T 0.5. Las placas se incubaron nuevamente en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos, se eliminó luego el contenido y se realizaron nuevamente los 3 lavados con 200 μ l de PBS/T 0.5 cada uno. A continuación se distribuyó en cada microcubeta 100 μ l de reactivo sustrato-indicador (24 ml de ácido cítrico 0,05 M pH 3,5 + 100 μ l H₂O₂ 0.5 M + 100 μ l ABTS 40 mM) (ABTS: 2,2 azino-di (3 etil bencil tiazolin sulfónico) y se incubaron durante exactamente 10 min., a 37°C en cámara húmeda. Concluido el tiempo, la reacción se detuvo agregando 100 μ l de ácido fluorhídrico 0.1 M pH 3.3 a cada microcubeta. Las placas se leyeron a 410 nm en un fotocolorímetro vertical para lecturas de microplacas (MR-600 Dynatech), el cual descuenta automáticamente el valor del blanco de reactivos en cada una de las mediciones. Las mediciones se realizaron por duplicado. Las diferencias de placa a placa (dentro del día) y día a día se corrigieron tomando como referencia al SC 2 con un valor constante de DO = 0.25. La DO se corrigió dividiendo el valor obtenido por el valor de DO obtenido para el SC 2 en la misma placa y luego multiplicando por 0.25. Los controles 1 y 3 permitieron evaluar la reproducibilidad en las zonas de bajas y altas DO respectivamente. Los valores de DO obtenidos en el EIE constituyen un dato intralaboratorial que no permite una fácil correlación con la condición

clínica que está tratando de investigarse; debido a ello se prefirió expresar el resultado del EIE en términos del número de desvíos estándar (S) respecto de la media (\bar{X}) de la OD observada en la población general no infectada mediante la ecuación ($\bar{X} + nS$).

RESULTADOS

El análisis de las 160 curvas dosis-respuesta obtenidas al estudiar los 10 sueros seleccionados frente a 4 concentraciones de antígeno y 4 diluciones de conjugado permitió fijar las condiciones de trabajo del sistema. Se observó que era necesario una concentración de antígeno de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y que la dilución óptima para el lote de conjugado empleado era de 1:1000. Las Figuras 1 y 2 muestran el tipo de curvas que se obtuvieron cuando se titularon el antígeno y el conjugado respectivamente. Se observó que para diluciones 1:100 de los sueros estudiados, las respuestas de DO obtenidas permitían una buena separación entre sueros de personas no infectadas y pacientes de triquinosis con bajas concentraciones de anticuerpos circulantes. La Figura 3 muestra algunas de estas curvas. Las curvas permitieron

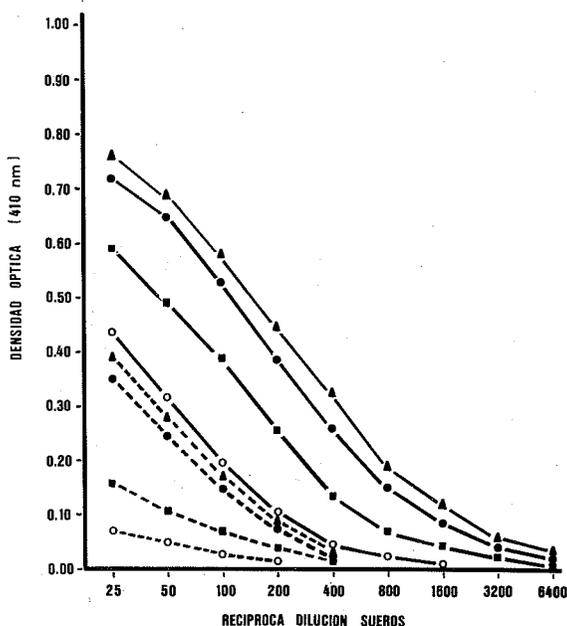


Fig. 1 — Determinación de concentración óptima de antígeno. Curvas dosis-respuesta producidas por el suero control 1 (---) y el suero control 3 (—). El antígeno se ensayó a 5 (○), 10 (■), 20 (●) y 40 (▲) $\mu\text{g}/\text{ml}$. El conjugado se usó a dilución 1:1000.

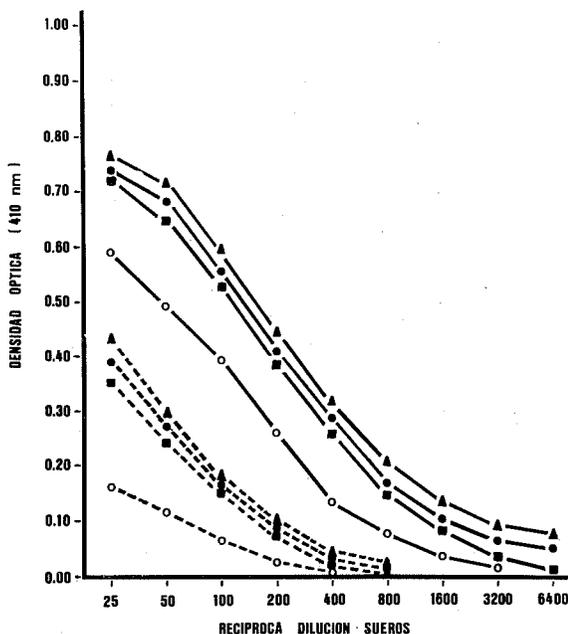


Fig. 2 — Determinación de dilución óptima de conjugado. Curvas dosis-respuesta producidas por el suero control 1 (---) y el suero control 3 (—). El conjugado se ensayó a diluciones 1:250 (▲), 1:500 (●), 1:1000 (■) y 1:2000 (○). El antígeno se usó a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

también verificar que el sistema tiene una respuesta lineal entre 0.15 — 0.65 unidades de DO y que en ese segmento las pendientes de las curvas producidas por sueros con diferentes concentraciones de anticuerpos son semejantes (Fig. 3). El EIE normalizado y optimizado en base a estos resultados fue el empleado para estudiar los 1019 sueros cuyos resultados se presentan a continuación.

Los valores de DO obtenidos cuando se procesaron los 720 sueros de población normal mediante el EIE propuesto, presentaron una \bar{X} y S de 0.07 y 0.03 unidades de DO respectivamente. La distribución de frecuencia de la DO expresado como $\bar{X} + nS$ se presenta en la Tabla 1.

Los sueros controles 1, 2 y 3 presentaron valores de DO de 0.15, 0.25 y 0.53 respectivamente que corresponden aproximadamente a los valores de la media aritmética de la población normal más 3, 6 y 16 desvíos estándar respectivamente.

La Tabla 1 muestra también los resultados obtenidos en el EIE cuando se estudiaron

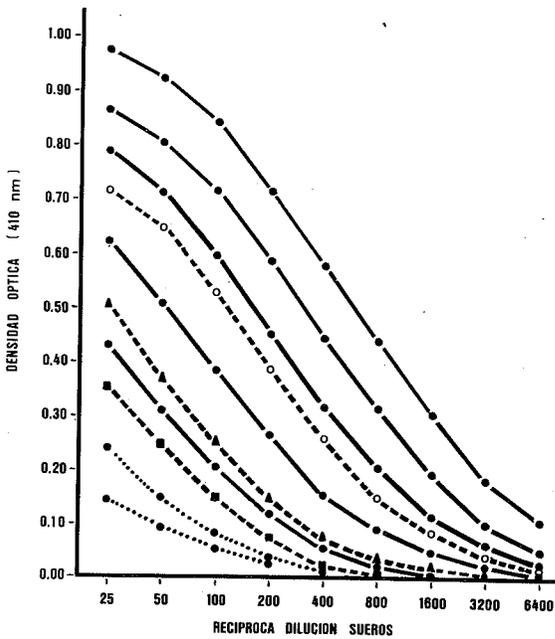


Fig. 3 — Curvas dosis-respuesta producidas por los sueros controles 1 (■—■), 2 (▲—▲) y 3 (○—○); 5 sueros de pacientes de triquinosis (●—●) y 2 personas sanas (●.....●). El antígeno se usó a 20 µg/ml y el conjugado a una dilución 1:1000.

los sueros correspondientes a los 4 brotes, el grupo de sueros con diferentes títulos en inmunofluorescencia indirecta para triquinosis y el grupo de sueros de pacientes hidatídicos. En todos los casos los valores de DO obtenidos se expresan como $\bar{X} + nS$; siendo \bar{X} y S las calculadas en base a los valores de DO del grupo de población general.

DISCUSION

El estudio de los 720 sueros de población general libre de triquinosis mediante el EIE propuesto permitió conocer los valores de DO que pueden presentar los sueros de personas aparentemente no afectadas de triquinosis. La distribución de frecuencia de la Tabla 1 muestra que el 98,61% de esta población presentó valores de DO inferiores a $\bar{X} + 3S$; el 1,25% valores de DO entre $\geq \bar{X} + 3S$ y $< \bar{X} + 4S$ y el 0,14% restante valores de DO entre $\geq \bar{X} + 4S$ y $< \bar{X} + 5S$.

En base a estos resultados puede considerarse que valores de DO iguales o superiores a $\bar{X} + 5S$ serían indicativos de una probable infección por *T. spiralis* y esta probabilidad

T A B L A 1

Resultados obtenidos mediante enzimoimmunoensayo para triquinosis en sueros de población general, sueros de 4 brotes de triquinosis, sueros de enfermos de triquinosis con diferente reactividad en inmunofluorescencia indirecta para triquinosis y sueros de pacientes hidatídicos.

Distribución de frecuencia de los valores de densidad óptica (DO) expresados como $\bar{X} + nS$.

Grupos O	N.º sueros	Tiempo () infección	Valores de n*															
			≥ 1 < 2	≥ 2 < 3	≥ 3 < 4	≥ 4 < 5	≥ 5 < 6	≥ 6 < 8	≥ 8 < 10	≥ 10 < 12	≥ 12 < 14	≥ 14 < 16	≥ 16 < 18	≥ 18 < 20	≥ 20 <			
PG	720	—	632	55	23	9	1											
B1	36	25	15	6	2	1	1	2	3	2	1		1	2				
B1	36	40	5	2	1	1	2	2	3	2	2	2	4	1	3	6		
B2	26	19	9	2	1	2	3	1	1	1	1	3	1	1	1	1		
B2	26	32	2				1			1	1		2	1	17			
B3	12	19				1				2	1	3	2	1	2			
B3	12	26											1	1	11			
B4	17	20	5	1	1	1	1	2	1	1		1	1	1	1			
E4	17	60											1	2	3	2	9	
B4	17	360		1	1	3	1	1	4	1	2	1	1	1				
IFI 64	20	—	9	5	4	1	1											
IFI 128	20	—				1	1	2	7	6	2	1						
IFI 256	20	—								3	5	6	3	3				
IFI > 256	20	—											2	4	3	11		
HID	20	—	9	7	3	1												

+ \bar{X} y S corresponden a los valores obtenidos para el grupo de población general (PG), 0,07 y 0,03 unidades de DO respectivamente.

* El intervalo de valores de DO corresponde a aplicar el valor de n indicado a ($\bar{X} + nS$)

() Tiempo en días transcurrido entre la ingesta y la toma de la muestra de sangre.

∗ Valores de DO $< \bar{X} + 1S$

○ PG: población general; B: brote; IFI: sueros de pacientes que en inmunofluorescencia indirecta presentaron títulos de 1:64, 1:128, 1:256 y $> 1:256$ respectivamente; HID: pacientes hidatídicos.

aumentaría a medida que estos valores se alejen de la media. Valores de DO inferiores a $\bar{X} + 5S$ no permitirían diferenciar entre población infectada y no infectada.

Los estudios de infecciones experimentales en animales, han demostrado una estrecha relación entre el número de larvas ingeridas, el grado de infección resultante y la precocidad de aparición y concentración de anticuerpos circulantes y se ha observado que existe un umbral mínimo de infección por debajo del cual la estimulación antigénica no sería suficiente como para reflejarse en la aparición de anticuerpos en niveles detectables^{6,13,18}. Estas experiencias han hecho posible estimar la sensibilidad de las pruebas inmunodiagnósticas para triquinosis animal en términos de mínima infección detectable y precocidad de detección, y expresar la sensibilidad diagnóstica de estos procedimientos en larvas por gramo y tiempo mínimo de infección. En triquinosis humana, se estima que la relación estimulación-respuesta es similar, pero se carece de datos concretos respecto a la mínima infección capaz de producir niveles de anticuerpos detectables y su tiempo de aparición. En general tampoco es posible cuantificar el grado de infección (larvas por gramo) mediante biopsia muscular debido a la frecuente negativa de los pacientes y a que su baja sensibilidad no permite detectar las infecciones leves. Ante esta situación el grado de infección puede estimarse en base a la intensidad del cuadro clínico y con un criterio similar es posible estimar la intensidad de un brote epidémico (leve, moderado, grave) en base a la intensidad del cuadro clínico de los afectados. La aplicación de este criterio para estimar la intensidad de los brotes permitió clasificar a B1 como leve; a B2 y B4 como moderados y a B3 como grave. El estudio de población afectada en estos brotes de diferente intensidad permitió estimar la sensibilidad del método para diferenciar población infectada de no infectada y comparar el tiempo de aparición de anticuerpos detectables y su evolución. Tomando un valor de $DO = \bar{X} + 5S$ como nivel diagnóstico, el 30% de los pacientes del B1 era serológicamente positivo a los 25 días de la ingestión de carne infectada y el 69% a los 40 días. En el B2 el 46% de los involucrados eran positivos a los 19 días y el 82% a los 32 días; en el B3 el

92% de los pacientes eran positivos a los 19 días y el 100% lo era a los 26 días. En el B4 el 47% de los pacientes fue positivo a los 20 días; el 100% lo era a los 60 días y luego de 1 año el 65% de los pacientes continuaba con valores de DO superiores a $\bar{X} + 5S$.

El análisis en base a los niveles diagnósticos establecidos para IFI (título $\geq 1:128$) y EIE ($DO \geq \bar{X} + 5S$) de los resultados obtenidos en los 80 sueros de pacientes de triquinosis muestra concordancia en 78 casos. Los 20 sueros con título 1:64 en IFI presentaron valores de $DO < \bar{X} + 5S$ en EIE y 58 de los 60 sueros con títulos de 1:128 en IFI presentaron valores de $DO > \bar{X} + 5S$. Los dos sueros discordantes presentaban un título de 1:128 en IFI y una $DO < \bar{X} + 5S$ en EIE; en consecuencia serían considerados positivos en IFI y negativos por EIE.

La comparación individual de los títulos de IFI y los valores de DO del EIE para cada uno de los 80 sueros de pacientes con triquinosis muestra que para un mismo título de IFI hay una considerable dispersión de los valores de DO. Este hecho era previsible ya que en la IFI se consideran solamente los anticuerpos dirigidos contra los antígenos de la cutícula mientras que en el EIE se miden anticuerpos contra el antígeno soluble total que contiene antígenos citoplasmáticos y antígenos solubilizados de membranas entre los cuales es probable que se incluyan antígenos de localización cuticular.

Los 20 sueros con título 1:64 en IFI corresponden a muestras tempranas de pacientes con triquinosis que posteriormente presentaron títulos más elevados. En este grupo el EIE presentó valores siempre inferiores a $\bar{X} + 5S$ y 14 de los 20 sueros presentaron valores inferiores a $\bar{X} + 2S$ (Tabla 1). Comparando estos resultados con los niveles diagnósticos establecidos para la IFI (títulos $\geq 1:128$) el EIE ($DO \geq \bar{X} + 5S$) es posible concluir que este EIE no presenta ventajas frente a la IFI respecto a la detección temprana de la infección.

En Argentina, algunas de las zonas de mayor frecuencia de ocurrencia de brotes de triquinosis se superponen con las áreas endémicas de hidatidosis, ello motivó el estudio

de sueros de pacientes de hidatidosis con altos niveles de anticuerpos antihidatídicos por medio del EIE propuesto para triquinosis. La Tabla 1 muestra que todos estos sueros presentaron valores de DO inferiores a $\bar{X} + 4S$ y 16 de ellos inferiores a $\bar{X} + 2S$ lo cual indica que están por debajo del nivel diagnóstico para triquinosis y que la hidatidosis no sería responsable de reacciones falsas positivas.

Las curvas dosis respuesta mostraron un segmento lineal entre valores de DO de 0.15 y 0.65 o, expresado en desviaciones respecto de la media aritmética entre $\bar{X} + 2,7S$ y $\bar{X} + 19S$; lo cual constituye un rango de trabajo lo suficientemente amplio. El nivel diagnóstico que diferencia población infectada de no infectada y los tres sueros controles empleados se ubican dentro del segmento lineal. La desviación de la linealidad por debajo de valores de DO de $\bar{X} + 2,7S$ no tendría significación diagnóstica ya que por debajo de ese nivel no es posible diferenciar población normal de presuntos infectados y los valores superiores a $\bar{X} + 19S$ sólo se observan en enfermos de triquinosis. El EIE propuesto permite diferenciar en forma confiable y eficiente población infectada de población no infectada y tiene una buena correlación con la IFI en el diagnóstico individual de personas afectadas por triquinosis. Su simplicidad en cuanto a la preparación del antígeno, ejecución y lectura permiten considerarlo como un método de elección para el estudio de brotes epidémicos y seroepidemiología de triquinosis humana.

NOTA: Las marcas de fábrica se mencionan sólo con fines de identificación, sin que ello constituya recomendación por parte de la Organización Panamericana de la Salud.

SUMMARY

Standardization and evaluation of an enzyme immunoassay for diagnosis and seroepidemiology of human trichinosis.

An enzyme immunoassay (EIA) in solid phase in which a whole soluble *Trichinella spiralis* antigen and a single serum dilution were used was standardized and its capacity for detecting total anti-trichinella antibodies for diagnostic and seroepidemiological purpose

was evaluated. Dose response curves showed that a working dilution of 1:100 permitted an adequate differentiation between trichinosis patients with low circulating antibodies concentration and non infected individuals; the response was linear between OD values of 0.15 and 0.64. A group of 720 sera from trichinosis free general population showed an arithmetic mean of OD values of 0.07 and a standard deviation of 0.03. OD values were $< \bar{X} + 3S$ in 98,1% of those sera; between $\geq \bar{X} + 3S$ and $< \bar{X} + 4S$ in 1,25% and between $\geq \bar{X} + 4S$ and $< \bar{X} + 5S$ in the remaining 0,14%.

An OD value = $\bar{X} + 5S$ was used as a diagnostic criterion to study sera from four human trichinosis outbreaks; 80 sera from trichinosis patients with different immunofluorescence assay (IFA) titers, and 20 sera from hydatid patients. The proposed EIA differentiates sera from infected and non infected populations both efficiently and reliably. It also showed a good correlation with the IFA results. All sera from hydatid patients showed OD values $< \bar{X} + 4S$.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Roberto O. García por su esmerada colaboración técnica.

REFERENCIAS

1. AN, A. C. S.; KO, R. C.; SIMON, J. W. REDELL, M. J.; WONG, F. W. T. & TEMPLER, M. J. — Study of acute trichinosis in Gurkhas: specificity and sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assays for IgM and IgE antibodies to *Trichinella larval* antigens in diagnosis. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 72: 226-229, 1978.
2. COLTORTI, E. A. — Evaluación de la inmunofluorescencia indirecta en el diagnóstico y la seroepidemiología de la triquinosis humana. *Acta. Bioquim. clín. latinoamer.*, 15: 599-607, 1981.
3. COLTORTI, E. A. — Standardization and evaluation of an enzyme immunoassay as a screening test for the seroepidemiology of human hydatidosis. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 35: 1000-1005, 1986.
4. ENGVALL, A. & LJUNGSTROM, I. — Detection of human antibodies to *Trichinella spiralis* by enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. *Acta path. microbiol. scand. Sect. C*, 83: 231-237, 1975.
5. FAUBERT, G. M.; PECHERE, J. C.; DELISLE, R.; SMITH, H. C. & BRINDLE, Y. — An outbreak of

- trichinellosis in Canada: "The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and clinical findings". In: KIM, C. W.; RUITENBERG, E. J. & TEPPEMA, J. S., ed. — International Conference on Trichinellosis, 5., Noordwijk aan Zee, The Netherlands, 1980. *Proceedings*. Chertsey Surrey, Redbooks, 1981.
6. GAMBLE, H. R.; ANDERSON, W. R.; GRAHAM, C. E. & MURRELL, K. D. — Diagnosis of swine trichinosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using and excretory-secretory antigen. *Vet. Parasit.*, 13: 349-361, 1983.
7. KHAMBOONRUANG, C. & THAMASONTI, W. — Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in patients infected with *Trichinella spiralis*. In: KIM, C. W.; RUITENBERG, E. J. & TEPPEMA, J. S., ed. — International Conference on Trichinellosis, 5., Noordwijk aan Zee, The Netherlands, 1980. *Proceedings*. Chertsey, Surrey, Redbooks, 1981.
8. MURRELL, K. D.; ANDERSON, W. R.; SCHAD, G. A.; HANBURY, R. D.; KAZACOS, K. R.; GAMBLE, H. R. & BROWN, J. — Field evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for swine trichinosis: efficacy of the excretory-secretory antigen. *Amer. J. vet. Res.*, 47: 1046-1049, 1986.
9. MATSUDA, H.; TANAKA, H.; BLAS, B. L.; NOSENAS, J. S.; TOKAWA, T. & OHSAWA, S. — Evaluation of ELISA with AETS, 2-2' azino-di (3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid), as the substrate of peroxidase and its application to the diagnosis of schistosomiasis. *Jap. J. exp. Med.*, 54: 131-136, 1984.
10. RUITENBERG, E. J.; STEERENBERG, P. A. & BROSI, B. J. M. — Micro-system for the application of Elisa in the serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections. *Medikon Nederland*, 4: 30-31, 1975.
11. STROBEL, H. — Die Serodiagnostic der Trichinosis. *Münch. mtd. Wschr.*, 58: 672-674, 1911.
12. STUMPF, J.; UNDEUTSCH, K. & LAUDGRAF, H. — Results of the clinical and serological diagnosis of an endemic of *Trichinella spiralis*. In: KIM, C. W.; RUITENBERG, E. J. & TEPPEMA, J. S., ed. — International Conference on Trichinellosis, 5., Noordwijk aan Zee, The Netherlands, 1980. *Proceedings*. Chertsey, Surrey, Redbooks, 1981.
13. VAN KNAPEN, F.; FRANCHIMONT, J. H.; RUITENBERG, E. J.; BALDELLI, B.; PRADLEY, J.; GIBSON, T. E.; GOTTAL, C.; HENRIKSEN, S. A.; KOHLER, G.; SKOVGAARD, M.; SOULE, C. & TAYLOR, S. M. — Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with three other methods for the detection of *Trichinella spiralis* infections in pigs. *Vet. Parasit.*, 7: 109-121, 1980.
14. VAN KNAPEN F.; FRANCHIMONT, J. H.; VERDONK, A. R.; STUMPF, J. & UNDEUTSCH, K. — Detection of specific immunoglobulins (IgG, IgM, IgA, IgE) and total IgE levels in human Trichinosis by means of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 31: 973-976, 1982.

Recebido para publicação em 21/4/1987.