



REGISTRO DE LA
PROPIEDAD INDUSTRIAL

ESPAÑA

⑪ N.º de publicación: ES 2 018 921

⑫ Número de solicitud: 8903143

⑤① Int. Cl.⁵: G01N 33/543

C07K 15/08

C12N 9/50

⑫

PATENTE DE INVENCION

A6

⑫② Fecha de presentación: **15.09.89**

⑫⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.91**

⑫⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.05.91

⑦③ Titular/es: **Universidad de Oviedo,
Vicerrectorado de Investigación.
C/ San Francisco, N° 3
Oviedo, ES**

⑦② Inventor/es:
**Parra Fernández, José Francisco y
Prieto Martín, José Miguel**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Método de inmunodiagnóstico de la hipodermosis bovina basado en la utilización de hipodermina C purificada.**

⑤⑦ Resumen:

Método de inmunodiagnóstico de la hipodermosis bovina basado en la utilización de Hipodermina C purificada. Se describe un ELISA indirecto para el inmunodiagnóstico de la hipodermosis bovina que comprende las siguientes etapas: 1) purificación de la hipodermina C a partir de la larva I de *Hypoderma lineatum* por cromatografía (HPLC) en fase reversa, 2) adsorción de la hipodermina C purificada a placas de microtítulo, 3) bloqueo de los pocillos utilizando un tampón conteniendo ovoalbúmina y tween 20, 4) adición de los sueros de bovino, 5) lavar cada pocillo 5 veces, 6) añadir un suero anti-IgG de bovino conjugado con peroxidasa, 7) lavar 5 veces cada pocillo, 8) añadir el sustrato de la peroxidasa, 9) detener la reacción con ácido sulfúrico 3N, 10) medir el color desarrollado en cada pocillo determinando la absorbancia a 450 nm.

DESCRIPCION

La presente invención se refiere a la purificación de la hipodermina C de extractos de larva I de *Hypoderma lineatum* y su utilización como antígeno en ensayos inmunoenzimáticos que permiten la detección de los animales parasitados por las larvas de este insecto.

Esta parasitosis del ganado vacuno denominada hipodermosis ocasiona grandes pérdidas económicas y es objeto de campañas de erradicación por parte de la Administración. Dada su extensión irregular y el desconocimiento de su incidencia en ganaderías de producción láctea la investigación de la presencia de anticuerpos contra este parásito del ganado vacuno permitiría un considerable ahorro de tiempo y dinero ya que posibilitaría la aplicación del tratamiento antiparasitario más selectiva y eficazmente.

El inmunodiagnóstico de la hipodermosis bovina viene siendo objeto de investigación desde aproximadamente 1970, utilizándose técnicas de hemaglutinación pasiva, inmunodifusión e inmunoelectroforesis, que poseen suficiente especificidad pero escasa sensibilidad. En 1983 se describe por vez primera un diagnóstico por ELISA (Sinclair y Wassall, 1983, Res in Vet. Sci.34,251-252) utilizando como antígeno un extracto crudo de larvas de *Hypoderma* que necesita al menos una etapa intermedia de amplificación, sin la cual el método no resulta útil, según describen los propios autores. Una revisión sobre la incidencia económica el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad puede encontrarse en los trabajos de C. Boulard, G. Argente y E. Hillion (1988) Le Point Vétérinaire Vol. 20, n° 111 pp 17-30 y n° 112 pp 17-27.

En cualquier caso, a pesar de la relevancia de esta parasitosis no se dispone de ningún método inmunoenzimático simple y fiable que pueda ser utilizado en estudios epidemiológicos.

La presente invención se refiere al desarrollo de un método inmunoenzimático (ELISA indirecto) para el diagnóstico específico de la hipodermosis bovina utilizando un antígeno purificado que evite los problemas que presenta el uso de extractos crudos del parásito. Para la obtención de este antígeno puro (hipodermina C o collagenasa) se recogen larvas I de *Hypoderma lineatum* en los esófagos de animales parasitados con las que se obtiene un extracto celular. En este homogenado pueden detectarse por inmunoelectroforesis siete antígenos mayoritarios, siendo la hipodermina C el que presenta la mayor movilidad anódica. Esta proteína se aísla de los demás antígenos de la mezcla por cromatografía en fase reversa de alta eficacia (HPLC). La collagenasa purificada se fija a placas de microtítulo en una cantidad adecuada, realizándose a continuación un ELISA indirecto utilizando sueros bovinos positivos y negativos contrastados previamente, no siendo necesario la utilización de etapas potenciadoras para la visualización de unos resultados diferenciales claros entre las muestras positivas y negativas. Las ventajas de este procedimiento respecto a otras técnicas descritas son su mejor discernimiento visual positivo-negativo, el ahorro de pasos potenciadores intermedios, el menor tiempo de reali-

zación del ensayo y el abaratamiento de costes.

En la Tabla 1 se muestran los resultados comparativos obtenidos al analizar nueve sueros bovinos mediante el ELISA indirecto objeto de esta invención y otro ELISA en que el antígeno utilizado es un extracto crudo de larva I. Puede observarse que la diferencia positivo-negativo obtenida con el ELISA objeto de esta invención ($0,83 \pm 0,04$) es mucho más clara que la obtenida con el otro método ($0,36 \pm 0,06$). El procedimiento basado en la utilización de la hipodermina C posee pues una clara ventaja al evitar la asignación de falsos positivos.

El método de ELISA indirecto objeto de esta invención es también útil para el estudio de la evolución

Tabla 1

A	B	C	
		D	E
6	H.lineatum	1.03 ± 0.06	0.99 ± 0.08
3	—	0.67 ± 0.05	0.16 ± 0.04

Siendo:

A : número de animales

B : parasitosis

C : $A (450 \text{ nm}) \pm \text{SE}$

D : extracto de HL1

E : hipodermina C

de los niveles de anticuerpos contra este antígeno en los animales infestados, lo que permite decidir el momento más adecuado para la aplicación de tratamientos antiparasitarios y hacer luego un seguimiento de la efectividad de los mismos. En la Figura 1 se ilustran los niveles de anticuerpos contra la hipodermina C en muestras de suero de vacas de raza Asturiana a lo largo de un ciclo natural de infestación, así como el efecto de un tratamiento antiparasitario con Ivomec (Merck) sobre la evolución de los mismos. Puede observarse que a lo largo del ciclo de infestación natural (círculos) pueden detectarse unos niveles altos de anticuerpos que descienden hasta los valores propios de los animales no infestados (triángulos) al final del ciclo de vida del parásito. Del gráfico de la Figura 1 se puede deducir también que el tratamiento de los animales con ivomec (momento señalado con la flecha) hace descender rápidamente la cantidad de anticuerpos contra la hipodermina C (cuadrados), siendo ésta una estimación muy valiosa de la eficacia del antiparasitario.

El ejemplo siguiente ilustra un modo de ejecución de la invención en lo que se refiere a la purificación del antígeno hipodermina C, pero pueden contemplarse diversas variantes a la hora de realizar el ELISA indirecto, sobre todo en lo referente al tipo de muestras problema a ensayar.

Ejemplo 1:

Partiendo de 100 larvas I de *Hypoderma lineatum* recogidas en el esófago de vacas parasitadas, se efectúa un homogenado en tampón Tris/MCl $0,05\text{M}$ pH 7,6. Este extracto se centrifuga durante 90 minutos a 12000 g y se recoge el sobrenadante para posterior uso. La purificación de la hipodermina C se realiza aplicando el sobrenadante del extracto de larva a una columna de HPLC

Beckman Ultrapore RPSC, equilibrada con agua conteniendo acetonitrilo al 25% y ácido trifluoroacético al 0,1 %. La elución de las proteínas retenidas en la columna se consigue haciendo pasar a su través un gradiente lineal del 25 al 50 % de acetonitrilo con un flujo constante de 0,7 mililitros por minuto. La presencia de proteínas en el eluyente de la columna se determina midiendo de manera continua la absorbancia a 280 nm mediante un detector de luz ultravioleta. La Hipodermina C se obtiene en las fracciones eluidas con un 45% de acetonitrilo. Su grado de pureza se determina por inmunoelectroforesis, observándose la presencia de una sola proteína, que se corresponde con la de mayor movilidad anódica del extracto original. Todos los procedimientos descritos hasta aquí se realizan a temperatura ambiente.

Para la realización del ELISA indirecto objeto de esta invención se utilizan placas de microtítulo (Fastbinder-Costar) a las que se añaden 20 μg /pocillo de hipodermina C purificada disuelta en tampón carbonato 0,1M pH 9,6. Las placas antigenadas se incuban durante la noche a 4°C. Tras la adsorción del antígeno se elimina el contenido de los pocillos y se bloquean durante al menos una hora con 200 μl de tampón fosfato salino conteniendo ovoalbúmina al 0,5% y tween 20 al 0,05%. A continuación se añaden los sueros problema de bovino (100 μl /pocillo)

diluidos 60 veces en tampón fosfato salino y se incuban a 37°C durante una hora. Una vez eliminado el contenido de los pocillos de la placa de microtítulo éstos se lavan hasta cinco veces con 100 μl de tampón fosfato salino conteniendo 0,05% de tween 20. Las inmunoglobulinas adsorbidas a la placa de ELISA se detectan añadiendo 100 μl /pocillo de un suero anti-IgG de bovino conjugado con peroxidasa Diluido 3000 veces, incubando posteriormente la placa a 37°C durante una hora. Una vez lavados los pocillos al menos 5 veces como se describe anteriormente, se añaden 100 μl /pocillo de la solución que contiene el sustrato de la peroxidasa (o-fenilendiamina al 0,1% ; agua oxigenada 40 μl /100 ml tampón citrato fosfato pH 5). La reacción con el sustrato se realiza en oscuridad a 37°C hasta que se desarrolle el color, deteniéndose por adición de 100 μl /pocillo de ácido sulfúrico 3N. La cantidad de inmunoglobulinas antihipodermina C se valora en función del color desarrollado medido a 450 nm.

En estas condiciones los sueros fuertemente positivos dan lugar a absorbancias a 450 nm de alrededor de 0,99 mientras que los negativos no sobrepasan valores de 0,2 (TABLA 1). A lo largo de un ciclo de infestación, los valores de anticuerpos medidos en estas condiciones oscilan entre 0,9 y 0,25, considerándose como negativas las muestras con valores de absorbancia a 450 nm iguales o inferiores a 0,2 (FIGURA 1).

REIVINDICACIONES

1. Método de inmunodiagnóstico de la hipodermosis bovina basado en lautilización de hipodermina C purificada. Procedimiento de inmunodiagnóstico serológico (ELISA indirecto) de la hipodermosis bovina en el que el antígeno consiste en hipodermina C purificada, a partir de larvas I de *Hypoderma lineatum*.

2. Procedimiento de purificación de la hipodermina C, según la reivindicación 1, en que se utiliza un cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC) y una columna de fase reversa (C3) para analizar un extracto de larva I de *Hypoderma lineatum*.

3. Procedimiento de purificación de la hipodermina c, según reivindicaciones 1 y 2, en que se utiliza un gradiente lineal de acetonitrilo desde el

25 al 50% en presencia de 0,1% de ácido trifluoroacético, a un flujo constante de 0,7 ml/min.

4. Método de inmunodiagnóstico (ELISA indirecto) de la hipodermosis bovina, según reivindicación 1, en el que el antígeno (hipodermina C purificada según reivindicaciones 1, 2 y 3) se une a las placas de ELISA disuelto en tampón carbonato 0,1M pH 9,6 a 4°C durante la noche.

5. Método de inmunodiagnóstico de la hipodermosis bovina, según reivindicaciones 1 y 4, en que el bloqueo de las placas antigenadas con hipodermina C se realiza con ovoalbúmina al 0,5% y tween 20 al 0,05% en tampón fosfato salino y en el que el revelado de los anticuerpos se lleva a cabo con un suero antibovino conjugado con peroxidasa, sin ningún paso intermedio de amplificación.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

