

PREPARACION DE ANTISUEROS PARA IDENTIFICAR
LA FUENTE DE LOS ALIMENTOS SANGUINEOS
DE ANOPHELES ALBIMANUS

To
UVG
Bisquit
A. J. J.
1987
C2

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Química

PREPARACION DE ANTISUEROS PARA IDENTIFICAR
LA FUENTE DE LOS ALIMENTOS SANGUINEOS
DE ANOPHELES ALBIMANUS

CLARA MARIA ALARCON RIVERA

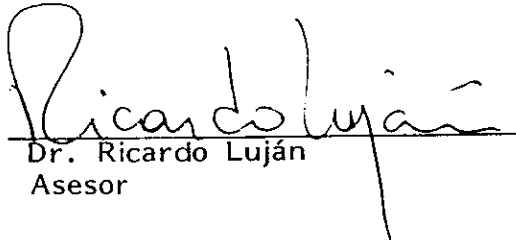
Trabajo de investigación presentado
para optar el grado acedémico de

Licenciatura en Bioquímica

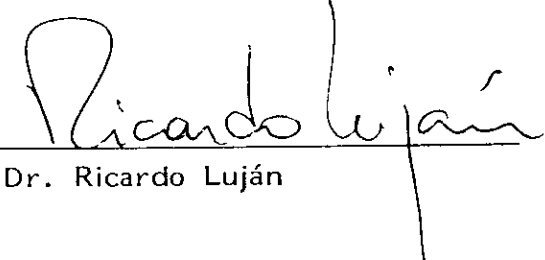
Guatemala

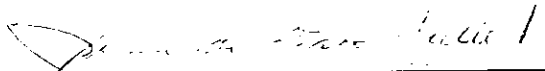
1987

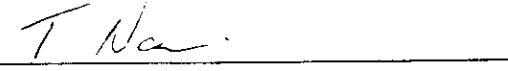
Vo.Bo.:

(f) 
Dr. Ricardo Luján
Asesor

Tribunal:

(f) 
Dr. Ricardo Luján

(f) 
Dr. Juan de Dios Calle

(f) 
Dr. Thomas A. Navin

Fecha de aprobación: 17 de Agosto de 1987.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a todo el personal de la Unidad de Entomología Médica de la Universidad del Valle (MERTU-G) por su valiosa colaboración y apoyo en la realización de este trabajo. Así como también por el hecho de haberme prestado sus instalaciones y equipo.

Deseo extender este agradecimiento de una forma muy especial a la señorita Eduviges Molina, quien siempre me brindó su ayuda con una dedicación sincera y desinteresada, y de quien aprendí mucho de las técnicas utilizadas en este trabajo.

De igual forma deseo hacerlo extensivo al Doctor Ricardo Luján, por su guía y esmerada supervisión.

A mi madre, Gloria Rivera de Alarcón por su ayuda y constante preocupación.

A Enrique Keilhauer, por su ayuda y apoyo.

C O N T E N I D O

	Página
I. INTRODUCCION	1
A. Objetivos	2
B. Justificación	3
II. REVISION DE LITERATURA	5
A. Epidemiología de enfermedades transmitidas por artrópodos	5
B. Vector de la malaria	5
C. El índice de sangre humana de vectores de malaria en relación epidemiológica.	6
D. Capacidad vectorial	7
E. Índice de sangre humana	8
F. Técnicas serológicas utilizadas para identificar hospederos.	12
G. Pruebas de precipitación en gel	12
H. Pruebas del ensayo inmunoabsorbente de la enzima conjugada (ELISA)	14
I. Producción de antisuero	17
III. MATERIALES Y METODOS	19
A. Preparación de antígeno	19
B. Preparación de antisueros	19
C. Sangrado de los conejos	20
D. Técnica de inmunodifusión en Gel	21
E. Determinación del título de los antisueros utilizados	24
F. Identificación de las ingestas de sangre de <u>Anopheles albimanus</u>	24

	G. Purificación de la fracción IgG de la gama- globulina	26
	H. Determinación de la concentración de proteína	28
	I. Técnica de ELISA	30
IV.	RESULTADOS	35
	A. Determinación del título de los antisueros	35
	B. Determinación del volúmen de elución de las impregnaciones en papel filtro	35
	C. Determinación de la concentración de proteína de los sueros utilizados	36
	D. Determinación de la concentración de anticuerpo de captura, conjugado y volúmen de elución.	36
	E. Reproducibilidad de la técnica de ELISA	39
	F. Resultados del volúmen de elución y el de ingestas de sangre.	39
V.	DISCUSION	45
VI.	CONCLUSIONES	52
VII.	BIBLIOGRAFIA	100

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Resultados positivos de pruebas de precipitación con alimentos sanguíneos de artrópodos después de períodos variables de digestión	54
2	Reacciones serológicas entre suero de conejo anti-albúmina bovina y albúminas heterólogas	55
3	Fechas de sangrados e inmunizaciones de los conejos	56
4	Valores de densidad óptica a 280 nm de los antisueros pasados a través de columna de cromatografía	57
5	Determinación del título de los sueros de conejo inmunizado con albúmina humana	58
6	Determinación del título de los sueros de conejo inmunizado con albúmina bovina	59
7	Determinación del volumen de elución de las impregnaciones en papeles filtro	60
8	Determinación de proteína: Lecturas espectrofotométricas de la curva de calibración y valores promedios en densidad óptica (Primer ensayo)	61
9	Determinación de proteína: Lecturas espectrofotométricas de la curva de calibración y valores promedios en densidad óptica (Segundo ensayo)	61
10	Lecturas espectrofotométricas de concentración de proteína de los antisueros utilizados	62

Cuadro		Página
11	Concentraciones de los anticuerpos de captura y conjugados para la técnica de ELISA	63
12	Análisis de varianza anidado de sueros: anti-IgG humana, anti-albúmina humana producida, anti-albúmina humana comercial	64
13	Análisis de varianza anidado de sueros anti-IgG bovino, anti-albúmina bovina producida, anti-albúmina bovina comercial	65
14	Volumen de elución para la técnica de ELISA para diferentes tiempos de digestión para la identificación de antígeno bovino	66
15	Volumen de elución para la técnica de inmunodifusión para tiempos diferentes de digestión para la identificación de antígeno bovino	67
16	Volumen de elución para la técnica de inmunodifusión para tiempos de digestión de antígeno humano (Primer Ensayo)	68
17	Volumen de elución para la técnica de inmunodifusión para tiempos de digestión de antígeno humano (Segundo Ensayo)	69
18	Resultados de los tiempos de digestión en la técnica de ELISA para antígeno humano	70
19	Resultados de los tiempos de digestión en la técnica de ELISA para antígeno bovino	71
20	Resultados de los tiempos de digestión en la técnica de inmunodifusión para antígeno humano	72
21	Resultados de los tiempos de digestión en la técnica de inmunodifusión para antígeno bovino	73

Cuadro		Página
22	Porcentaje de mosquitos identifi- cados con antígeno humano	74
23	Porcentaje de mosquitos identifi- cados con antígeno bovino	75
24	Porcentaje de mosquitos del cam- po identificados con antígeno bo- vino y/o humano	76

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Método de ELISA indirecto	77
2	Método de ELISA indirecto de captura	78
3	Patrón de placa de inmunodifusión	79
4	Determinación del volumen de elución y concentración de antisuero	80
5	Determinación de concentraciones óptimas de anticuerpo de captura, conjugado y volumen de elución	81
6	Reproducibilidad de la técnica de ELISA	82
7	Ensayo de tiempos de digestión	83

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica		Página
1	De terminación de la concentración de proteína de referencia (Primer Ensayo)	84
2	Determinación de la concentración de proteína de referencia (Segundo Ensayo)	85
3	Determinación de concentraciones óptimas de anticuerpo de captura y conjugado para:	
3.1	Anti IgG humana en concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 ug/pocillo	86
3.2	Anti IgG humana en concentraciones de 0.5 y 1 ug/pocillo	87
4.1	Anti albúmina humana producida en concentraciones de 0.1, 1 y 10 ug/ pocillo	88
4.2	Anti albúmina humana producida en concentraciones de 1, 2.5 y 5 ug/ pocillo	89
4.3	Anti albúmina humana producida en concentraciones de 1, 2 y 3 ug/pocillo	90
5.1	Anti albúmina humana comercial en concentraciones de 1, 5 y 10 ug/pocillo	91
6.1	Anti IgG bovina en concentraciones de 1, 2.5 y 5 ug/pocillo	92
6.2	Anti IgG bovina en concentraciones de 0.25, 0.5 y 1 ug/pocillo	93
7.1	Anti albúmina bovina producida en concentraciones de 0.1, 1 y 10 ug/pocillo	94
7.2	Anti albúmina bovina producida en concentraciones de 1, 3 y 5 ug/pocillo	95
8.1	Anti albúmina bovina comercial en concentraciones de 0.1, 1 y 10 ug/pocillo	96

Gráfica		Página
8.2	Anti Albúmina bovina comercial en concentraciones de 1, 3 y 5 ug/pocillo	97
9	Porcentaje de mosquitos identificados con antígeno humano	98
10	Porcentaje de mosquitos identificados con antígeno bovino	99

I. INTRODUCCION

La identificación de los hospederos de artrópodos hematófagos, a partir de las ingestas sanguíneas, es necesaria para comprender la epidemiología de enfermedades transmitidas por artrópodos. La identificación del hospedero puede hacerse por medio de técnicas suficientemente sensibles para detectar sangre parcialmente digerida y específicas para identificar los varios hospederos posibles.

Los métodos actualmente más utilizados para identificar la fuente del alimento sanguíneo son las pruebas serológicas, como las de precipitación y el ensayo inmunoabsorbente de la enzima conjugada (ELISA). Estas pruebas serológicas utilizan antisueros específicos a los antígenos sanguíneos del hospedero.

El vector principal de la malaria en América Central es Anopheles albimanus (8). A pesar de que los programas de erradicación de la malaria en América Central han tenido problemas técnicos y financieros, aun ahora el principal objetivo continúa siendo el establecer un programa exitoso de control de la malaria. Sin embargo, un programa de esta naturaleza requiere del conocimiento de la epidemiología local de la malaria y de la capacidad de transmisión de la misma.

La capacidad vectorial (CV) es una medida entomológica del potencial de transmisión de malaria en un área geográfica determinada, pero su determinación es relativamente compleja. Entre las variables que se deben determinar se encuentra el índice de sangre humana (ISH), que representa la proporción de mosquitos anófeles de una población que se alimentó con sangre humana; por lo tanto, este índice establece la relación entre el vector de la malaria y su potencial de transmisión

al humano.

En la determinación del ISH existen dificultades para obtener una muestra representativa, ya que la disponibilidad y el tipo de hospederos en el sitio de recolección puede sesgar los resultados. Por ejemplo, si la muestra se toma en el interior de viviendas o en establos existe un sesgo en favor del hospedero dominante en el sitio de recolección, por lo que se debe hacer un muestreo regular y cuidadoso en diferentes sitios, tomando en cuenta la relación aproximada de humanos a otros hospederos en el área de muestreo. En la práctica, se obtiene un mejor estimado del ISH aplicando la media sin peso de las muestras de viviendas humanas y de los otros tipos de sitios de recolección (12).

En el caso de mosquitos Anopheles albimanus es útil determinar si existe un bajo ISH, especialmente si la infectividad con parásitos de malaria también es baja y cuando la densidad de la población de mosquitos es alta, ya que la capacidad de transmisión no está relacionada directamente con la densidad del vector, sino que con la eliminación o reducción de su contacto con el humano (7, 12).

A. Objetivos:

- 1) Establecer las técnicas serológicas de inmunodifusión en gel y ELISA para identificar la fuente del alimento sanguíneo de Anopheles albimanus.
- 2) Producir antisueros específicos contra albúmina humana y bovina en conejos.
- 3) Comparar la sensibilidad y especificidad de los antisueros pro

ducidos en el laboratorio con antisueros adquiridos de fuen
te comercial.

- 4) Comparar la sensibilidad de las dos técnicas serológicas.
- 5) Determinar qué antígeno es más conveniente detectar, si albúmina o IgG sanguínea.
- 6) Determinar por ambas técnicas serológicas hasta que tiempo de digestión es posible identificar los antígenos sanguíneos en mosquitos del género Anopheles.

B. Justificación:

La determinación del índice de sangre humana en muestras del contenido abdominal de Anopheles albimanus es una variable útil para determinar la capacidad vectorial del mosquito. Asimismo, la identificación de hospederos se utiliza para estudios epidemiológicos de enfermedades transmitidas por vectores (7, 12, 14).

Los antisueros comerciales son relativamente caros, mientras que los producidos en el laboratorio pueden ser más económicos, obtenerse en grandes cantidades, y si son almacenados adecuadamente, pueden utilizarse durante mucho tiempo. Si no se encuentran diferencias entre los sueros producidos en el laboratorio y los comerciales, se tendrá una mejor rentabilidad para trabajos posteriores que requieran del uso de antisueros a albúmina humana y bovina. Además, ya establecida una técnica de inmunización efectiva, puede extenderse para la producción de antisueros en otros trabajos futuros.

Si se tienen estandarizadas las técnicas de inmunodifusión en gel y ELISA para la identificación de hospederos en los que Anopheles al-

bimanus se ha alimentado, estas técnicas pueden extrapolarse a aplicar se a otros artrópodos vectores de enfermedades: por ejemplo, a flebótomos o simúlidos y conocer así aspectos de la epidemiología de enfermedades transmitidas por otros vectores.

II. REVISION DE LITERATURA

A. Epidemiología de enfermedades transmitidas por artrópodos.

Epidemiología se define como el estudio de la distribución de una enfermedad o una condición fisiológica en poblaciones de humanos, y los factores que influyen su distribución. Esencialmente, el patrón epidemiológico de enfermedades infecciosas depende de los factores que influyen la probabilidad del contacto entre el agente infeccioso y la persona susceptible, conocido como el hospedero (43).

Es esencial para médicos, entomólogos y epidemiólogos, conocer la fuente de alimentación de artrópodos vectores de enfermedades al humano y animales domésticos, para comprender mejor las relaciones vector-hospedero y los papeles que éstos juegan respectivamente en el ciclo de transmisión-enfermedad.

B. Vector de la Malaria.

La hembra del género Anopheles actúa tanto como vector y hospedero del parásito de la malaria; para que ocurra la transmisión la hembra debe, por lo menos, ingerir sangre dos veces del humano y vivir el tiempo suficiente (8-25 días), dependiendo de la especie de Plasmodium a una temperatura apropiada y una humedad relativa para que el parásito de la malaria pueda completar su ciclo de desarrollo dentro de ella (44). Los mosquitos anofelinos son insectos del orden Díptera, sub-orden Nematocera, y género Anopheles. Existen aproximadamente 400 especies de Anopheles descritas, pero de estas aproximadamente 60 son vectores principales de la malaria (44).

Investigadores en malaria se concentran en definir el comportamiento de varias especies de anofelinos en la transmisión de la malaria,

y han enfocado sus esfuerzos en establecer el índice antropofílico, ahora llamado "índice de sangre humana" (ISH), para un vector particular de la malaria (4).

C. El índice de sangre humana de vectores de malaria en relación epidemiológica.

Malaria es uno de los problemas de salud mas serios en América Central. El vector principal es Anopheles albimanus y se extiende desde el valle del Río Grande en Baja California hasta Venezuela y el norte de Perú, incluyendo varias islas del Caribe (34).

Los programas nacionales de erradicación de la malaria en América Central se establecieron a finales de los años cincuenta. Estos programas se basaban en el rociamiento periódico de insecticidas residuales efectivos, contra el vector local, en las casas de las áreas maláricas esperando así interrumpir la transmisión de la malaria. Inicialmente se obtuvo un gran éxito a principios de los años sesenta, pero muchos de estos programas, en América Central tuvieron problemas de resurgimiento de malaria, principalmente, en la costa sur del Pacífico debido al uso intensivo de insecticidas para fines agronómicos. Así, el Anopheles albimanus evolucionó y seleccionó mecanismos de resistencia, incluyendo tolerancia fisiológica a un rango amplio de insecticidas (8,19). Los programas de erradicación de malaria respondieron a este problema utilizando insecticidas más tóxicos y costosos; pero la incidencia malárica continuaba y aumentaba en las regiones tratadas con insecticidas. Estos problemas técnicos, aunados con los problemas financieros que se tienen en los países centroamericanos, conlleva a la necesidad de un cambio en las estrategias de los programas de erradicación de la mala-

ria, siendo ahora el mayor objetivo tener un programa de control de malaria. Un programa exitoso para el control de la malaria requiere de un conocimiento detallado de la epidemiología local de la malaria, de la dinámica de transmisión y del control tecnológico que se tenga a disposición.

Idéalmente los programas de control de la malaria deben basarse en una combinación de datos epidemiológicos y entomológicos, y es errróneo evaluar separadamente datos entomológicos de los epidemiológicos, ya que uno es parte del otro (12). Para el estudio de la epidemiología de una enfermedad debe tenerse información precisa sobre los hábitos de alimentación de los insectos vectores, así como de sus preferencias para alimentarse en diferentes hospederos (4, 6, 7).

D. Capacidad Vectorial.

Desde el punto de vista entomológico, la capacidad vectorial (CV) es una medida del potencial que tiene una población de mosquitos de transmitir la malaria; esta medida es un factor importante para comprender la dinámica de transmisión de la malaria y evaluar el potencial malarilogénico de un área. Estimados de la capacidad vectorial de una población de mosquitos se basan en la determinación de la expectativa de vida del vector (E); el índice antropofílico (P); la razón de picadura al humano (ma); el tiempo intrínseco de incubación (n); el tiempo entre alimentaciones (F); dando lugar a la fórmula $CV = \frac{maPe^{-n}E}{F}$

El resultado de la ecuación de la capacidad vectorial es el número esperado de nuevas infecciones de malaria producidas por caso infeccioso de malaria por día (14, 16).

El índice antropofílico o de sangre humana es uno de los factores que determina la capacidad vectorial; este está relacionado con la transmisión de la malaria, ya que representa el grado de contacto entre el mosquito y el humano. Por lo tanto, su determinación tiene gran importancia en las estrategias de los programas de control de malaria.

E. Índice de Sangre Humana.

Entre los sinónimos del índice de sangre humana se encuentran el índice antropofílico, o el término, razón de sangre humana. Este representa la proporción de una población de anófeles alimentados con sangre humana.

La muestra de mosquitos recolectados debe ser representativa de una sola especie en un área y período determinado (12). La totalidad de especímenes de una especie que viven en los alrededores de una localidad designada, tal como una aldea, a un tiempo dado constituyen una "población" de esa especie (12). Por lo tanto, el índice de sangre humana es importante para establecer la relación entre los vectores conocidos de malaria y su potencial de transmisión al humano.

Además de determinar el índice de sangre humana, también es importante identificar el índice de alimentación con otros hospederos, ya que estudios anteriores (6, 7) han demostrado que mosquitos del género Anopheles tienen un rango de alimentación amplio entre otros animales, lo que ayuda a la transmisión de malaria por ejemplo, entre humanos y simios, como también a la transmisión de otras enfermedades como filariasis y de arbovirus (35).

1. Alimentaciones Múltiples.

Actualmente se le ha dado atención a la posible importancia

epidemiológica de las alimentaciones interrumpidas de mosquitos, que resultan de dos o más partes diferentes de alimentos sanguíneos (6). Como no se ha desarrollado una terminología precisa, se han propuesto las siguientes definiciones para describir estas comidas sanguíneas tomadas de más de un hospedero (7):

Comida simple: Comida resultante de una sola alimentación o una comida múltiple eclipsada (compuesta de dos partes, pero una no es detectable en el laboratorio).

Comida múltiple: Cualquier comida resultante de dos o más alimentaciones, donde la última se tomó antes de que la primera se digiriera lo suficiente como para ya no poder ser identificada.

Cualquier grado significativo de comidas múltiples aumenta la probabilidad de que un insecto vector adquiriera y transmita un patógeno (7).

Las alimentaciones múltiples pueden darse cuando el mosquito es interrumpido durante su alimentación (esto puede deberse al comportamiento del hospedero) (36) pero completa su comida e ingesta sanguínea en otro hospedero después de un corto tiempo (7).

2. Muestreo de vectores para la identificación de alimentos sanguíneos.

No se pueden tener datos confiables del índice de sangre hu-

mana si no se tiene cuidado al recolectar los mosquitos, ya que la muestra de mosquitos en la localidad tomada puede estar sesgada. En primer lugar, los mosquitos alimentados tienen una tendencia variable de redistribuirse durante el intérvalo de la alimentación y el amanecer. En algunos casos, estos permanecen en el sitio de alimentación, pero por otra parte, se traslada de un sitio de alimentación a otro pudiendo producir una distribución al azar. Lo que en realidad sucede es algo intermedio, una redistribución parcial usualmente no ponderable (12). Se ha demostrado que recolecciones intradomiciliares, por cualquier método, presentan un índice de sangre humana del 15.8% al 97.5%, mientras que muestras de la misma población extradomiciliares presentan un índice de sangre humana de 0.2% a 35% (8, 12).

En segundo lugar, debe considerarse también que una proporción de las hembras alimentadas pueden morir antes de que se haga la captura; esto puede deberse a que varias de las hembras alimentadas están expuestas a un mayor riesgo de morir que otras, por lo que la población en reposo no es del todo representativa de la población alimentada. Esto es precisamente lo que ocurre en áreas donde existen insecticidas residuales, causando una mayor mortalidad entre los mosquitos alimentados intradomiciliarmente (12).

Otro factor que debe considerarse es la razón o proporción entre humanos y animales domésticos, y la distribución de los animales en relación a las viviendas a las horas en que se ha

ce el muestreo. La disponibilidad del hospedero obviamente es un factor que puede sesgar los resultados (7). Para evitar estos problemas debe tenerse un control de los hospederos presentes en los sitios de recolección y hacer recolectas simultáneas en los diferentes tipos de sitios de reposo, durante un tiempo determinado, y durante la noche para no tener tanto problema de redistribución o de mortalidad (12). Usualmente se escogen como sitios de muestreo las viviendas y los alrededores de una aldea determinada.

Para el muestreo de mosquitos se ha recomendado el uso de trampas de luz (11, 37). Estas pueden colocarse tanto en sitios intradomiciliares como extradomiciliares, atrayendo mosquitos alimentados o sin alimentar, mientras que las capturas en las que un individuo sirve como cebo, en su mayoría, atraen mosquitos que aún no se han alimentado o probablemente los residuos en el tracto digestivo ya no sean identificables (6, 8, 13).

Las trampas de luz atraen otros insectos ya que la alta intensidad de iluminación de la trampa, en comparación con la de los alrededores, interfiere con la orientación de vuelo de los insectos dando como resultado el acercamiento de éstos a la trampa. Cualquier fenómeno que reduzca este contraste de iluminación reducirá el tamaño de la muestra que se pueda atrapar (11, 37). Una vez hecha la captura se selecciona la especie de vector a analizar, en este caso Anopheles albimanus, y se hacen impregnaciones de los contenidos abdominales

en papel filtro, para luego ser analizadas por cualquiera de las técnicas inmunológicas mencionadas a continuación y así determinar el índice de sangre humana.

F. Técnicas serológicas utilizadas para identificar hospederos.

En vista que se ha demostrado que varias especies de artrópodos son vectores primarios de enfermedades, especialmente aquellas causadas por virus, actualmente existe un nuevo ímpetu en establecer las relaciones entre hospedero-vector, especialmente en enfermedades parasitarias. Para establecer los rangos de hospederos de artrópodos vectores se han utilizado cuatro métodos como la observación visual, la atracción a cebos humanos o animales, las características citológicas de la sangre y la serología. Actualmente, sin embargo se acepta que las técnicas serológicas son las que representan datos más confiables por su sensibilidad y especificidad (45).

Las técnicas serológicas utilizadas en la identificación del alimento sanguíneo de artrópodos son, básicamente, la prueba de precipitación (5), la técnica de fluorescencia (46), el método de cristalización de hemoglobina (47) y la técnica de inhibición pasiva de hemaglutinación (48). A pesar de la adaptación de estos métodos serológicos para la identificación de alimentos sanguíneos, la prueba de precipitación es la técnica más utilizada.

G. Prueba de precipitación en gel.

Se han utilizado cuatro métodos de precipitación que son las pruebas de "anillo" (45), en tubo capilar (49), de difusión en agar (50) y en microplaca (51).

La prueba de anillo y de tubo capilar son muy similares; en estas

pruebas la suspensión del alimento sanguíneo se coloca sobre un antisuero y sólo difieren en el tamaño del tubo que se utiliza para la reacción. En la prueba de anillo se utiliza un tubo de ensayo pequeño, mientras que en el método capilar se utiliza un tubo de hematocrito. En ambos sistemas una reacción positiva da lugar a la formación de un precipitado en la interfase de los dos reactivos. En la prueba de anillo se forma claramente un anillo, y en la capilar, una nebulosidad. La desventaja de estas pruebas es que requieren cantidades significativas de ambos reactivos, más tiempo y cuidado para la colocación manual de los mismos.

La prueba de precipitación en gel actualmente es la más utilizada para la identificación de alimentos sanguíneos de artrópodos hematófagos (7, 10, 20). Como se requiere un alto grado de sensibilidad de la prueba serológica, ya que en la mayoría de los casos el insecto contiene una proporción muy pequeña de las proteínas identificables además de un volumen limitado de sangre ingerido por el insecto y una velocidad alta de digestión de las proteínas identificables, es necesario aplicar pruebas serológicas con un alto grado de sensibilidad. La velocidad de digestión varía considerablemente entre insectos (Cuadro 1) (4). En promedio, según trabajos realizados por Weitz (5), la captura de mosquitos debe hacerse entre las 24 horas subsiguientes a la alimentación del insecto para tener resultados confiables y poder identificar al hospedero en el que se alimentó el vector.

Una reacción positiva en la prueba de precipitación en gel se indica por la formación de una banda de precipitación. La sensibilidad de la prueba serológica también es un requisito necesario para poder identi

tificar varios hospederos de un extracto sanguíneo. Además de la sensibilidad, la prueba serológica debe tener especificidad que es necesaria para identificar las diferentes fuentes de alimentación sanguínea, o sea los diferentes hospederos posibles. La identificación es relativamente simple en los casos en que los posibles hospederos no están relacionados zoológicamente. Los antígenos, como las proteínas séricas de diferentes especies, son serológicamente distinguibles. En general, sin embargo, entre más cercanas se encuentren dos especies de hospederos en el árbol filogenético, lo más cercanamente están relacionados sus constituyentes antigénicos (Cuadro 2) (2).

Una de las desventajas que tiene la prueba de precipitación en gel es que se requiere de mucho tiempo para la preparación de las placas con agar; pero por otra parte, sí permite almacenar en forma permanente los resultados ya que una vez terminada la prueba, las placas se secan y se tiñen, preservándose así indefinidamente los resultados. Se ha encontrado, sin embargo, que éste método es menos sensible que el de precipitación de tubo capilar (52).

H. Prueba del ensayo inmunoabsorbente de la enzima conjugada (ELISA).

La necesidad de un método tanto específico como lo suficientemente sensible para la identificación de alimentos sanguíneos y diferenciar varios hospederos, ha llevado a los investigadores a adoptar el "ensayo inmunoabsorbente de la enzima conjugada (ELISA)", para este tipo de prueba (27). Este método se basa en el uso de anticuerpos y antígenos que están unidos a una superficie acarreadora insoluble. Esta superficie sensibilizada se usa para la "captura" del antígeno o anticuer

po relevante en la solución a analizar, y el complejo es detectado por una enzima conjugada al anticuerpo o al antígeno. La degradación del substrato de la enzima se mide fotométricamente y es proporcional a la concentración del anticuerpo o antígeno desconocido en la solución analizada (26).

1. Métodos de ELISA.

a. ELISA indirecto. En términos generales consiste en la adhesión de las muestras en estudio a una fase sólida, como la placa de poliestireno, por medio de una solución tamponada, por ejemplo, de carbonatos; si en la muestra existe el antígeno, éste se adhiere a la pared de los pocillos de las placas de poliestireno. Luego se adiciona un suero que contiene el anticuerpo al antígeno en prueba, el cual se une al antígeno preadsorbido; se lavan los componentes en exceso del suero y luego se adiciona la antiglobulina marcada con la enzima (conjugado). El conjugado se une al complejo antígeno-anticuerpo adsorbido a la superficie acarreadora y la cantidad de conjugado unido se mide por la cantidad de substrato degradado (Figura 1).

b. ELISA indirecto de captura. En esta variación del método se utilizan inmunoglobulinas específicas al antígeno para sensibilizar la superficie acarreadora o las placas de poliestireno. Luego se incuba la solución que contiene el antígeno en la superficie sensibilizada y el exceso de solución se lava. A continuación se adiciona el conjugado que consiste del anticuerpo dirigido al antígeno en prueba, marcado con la enzima; éste se une al antígeno ya "capturado" por la placa sensibilizada. El exceso de conjugado

se lava después del tiempo de incubación y la cantidad unida se mide por la cantidad de substrato degradado (Figura 2).

2. Parámetros de la Prueba de ELISA.

Los tiempos y temperaturas óptimas de incubación para cada sistema son fáciles de determinar en base a prueba y error. Pero por conveniencia, las placas son sensibilizadas usualmente toda la noche a 4°C y la muestra y conjugado se incuban a temperatura ambiente durante dos horas cada uno. El procedimiento de lavado es crítico y es importante asegurar que todos los pocillos o tubos se traten de la misma manera (26).

3. Conjugados.

Algunos investigadores se inclinan por utilizar la fosfatasa alcalina como la enzima marcadora ya que tiene alta actividad específica, el substrato no es tóxico y es más barato. Así mismo, la peroxidasa de rábano de caballo también es una enzima adecuada para formar el conjugado; tiene una alta actividad y es más barata que la fosfatasa alcalina, aunque tiene el riesgo de ser relativamente carcinogénica (26). Sin embargo, la enzima que se utilice es de elección personal.

4. Resultados.

Los resultados pueden interpretarse de una forma visual, siendo positivos los pocillos donde aparezca la coloración debida a la degradación del substrato. Si se hacen lecturas fotométricas se toma como positivo todo valor superior al valor que da la media de los controles negativos más tres veces la desviación estándar.

1. Producción de Antisuero.

En cualquiera de las técnicas anteriormente mencionadas se requiere de la preparación de un antisuero específico al antígeno a detectarse. Sin embargo, entre los problemas más importantes de la inmunología se encuentra la producción de antisueros, el del manejo de animales experimentales y la selección de una especie animal para la inmunización. Generalmente, los conejos se utilizan para la producción de anticuerpos precipitables; es importante saber que ciertas especies o razas de conejos son mejores productoras de anticuerpos que otras. Por ejemplo las razas "Nueva Zelandia" y "Dutch" son superiores a las razas pequeñas o criollas utilizadas comercialmente como fuentes de alimento (1). Además, es muy difícil establecer una dosis única y óptima capaz de inducir la mejor respuesta inmune, pues ésta dependerá del antígeno y de la especie de animal utilizada para producir el antisuero. Se ha observado que las dosis pequeñas y las muy elevadas de antígeno no producen títulos apreciables de anticuerpos, sino que más bien inducen un estado llamado tolerancia inmunológica o falta de respuesta.

Las vías de inoculación del antígeno en conejos permiten indicar que la cantidad de anticuerpos producidos será mayor si la administración es por las vías subcutánea é intramuscular, intermedia si es por las vías intraperitoneal y del cojinete plantar y menos efectiva si es intradérmica e intravenosa (1). A pesar de lo anterior, hay antígenos que inyectados intravenosamente inducen una buena respuesta de anticuerpos, por ejemplo, los neumococos y en general las bacterias y otros antígenos insolubles debido a su estado físico particular.

Cuando a un animal se le inyecta un antígeno por primera vez de-

be tenerse en cuenta que los anticuerpos no aparecen de inmediato sino que su formación va precedida de un cierto tiempo de latencia, variable según la especie animal utilizada, la vía de administración y de la sensibilidad de la técnica utilizada para la detección de los anticuerpos. En cualquiera de los casos, esta respuesta primaria es muy pequeña. Si pasado cierto tiempo se administra una segunda inyección de antígeno se obtendrá una respuesta secundaria caracterizada por un tiempo de latencia menor y una concentración de anticuerpos mayor y más persistente. Si se hacen inoculaciones a intervalos regulares se observará al principio una rápida caída de la concentración de los anticuerpos circulantes, debida a la combinación inmediata de los mismos con el antígeno inyectado. Posteriormente, se obtiene una elevación en la concentración total de los anticuerpos (1).

La edad del animal es un factor importante en la respuesta. Se ha visto que en animales de laboratorio la capacidad de inducir una respuesta inmune aparece de 8 a 15 días después del nacimiento (1). La capacidad de sintetizar anticuerpos está relacionada con el estado de madurez o inmadurez del aparato inmunológico. Si se inyecta un antígeno durante el período embrionario o inmediatamente después del nacimiento, se produce el fenómeno conocido como tolerancia inmunológica (que también se puede producir en el adulto, variando la dosis de antígeno).

III. MATERIALES Y METODOS

A. Preparación de antígeno.

Los antígenos se obtuvieron de fuentes comerciales (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO. E.E.U.U.). Antígeno A = albúmina humana fracción V (SIGMA No. A-1653 Lot. 35F-9432) y Antígeno B = Albúmina bovina fracción V (SIGMA No. A-8022 Lot. 109C-0400).

B. Preparación de antisueros.

Se prepararon sueros de conejo anti-albúmina humana y anti-albúmina bovina en conejos blancos "Nueva Zelandia" de aproximadamente un año de edad y con un peso promedio del conejo #1 = 2260 gramos (hembra), y el peso del conejo #2 = 2218 gramos (macho). El conejo #1 se inmunizó con una solución de 600 ug/mL de albúmina humana diluída en solución salina 0.15 M; el conejo #2 se inmunizó con una solución de 600 ug/mL de albúmina humana diluída en solución salina 0.15M.

Antes de que los conejos fueran inmunizados se tomó aproximadamente un mililitro de sangre de ambos conejos como suero preinmune control.

1. Primera inmunización. Se tomó 1 mL de la solución de albúmina y 1 mL de adyuvante de Freund completo (SIGMA, No. F5881). Se preparó una emulsión y se inyectaron los conejos con 0.3 mL por vía subcutánea a nivel de ambas escápulas y con 0.7 mL por vía intramuscular en las caras posteriores de los muslos. A los 42 días después se les administró el primer re fuerzo.

2. Primer refuerzo. Se tomó 1 mL de la solución de albúmina y 1 mL de adyuvante de Freund incompleto (SIGMA, No.F 5506). Se preparó una emulsión y se inyectó de igual forma que en la primera inmunización. A los 28 días después se les administró el segundo refuerzo.

3. Segundo refuerzo. Se tomó 1 mL de la solución de albúmina y 1 mL de adyuvante de Freund incompleto, se preparó una emulsión y se inyectaron los conejos con 0.5 mL por vía subcutánea a nivel de ambas escápulas y 0.5 mL por vía intramuscular en las caras posteriores de los muslos. A los 41 días después se les administró el tercer refuerzo.

4. Tercer refuerzo. Se repitió exactamente lo mismo que en el segundo refuerzo. Antes de cada inmunización se sangraron los conejos y se determinó el título del antisuero obtenido. (En el Cuadro 3 se presentan las fechas de inmunizaciones y sangrados de los conejos).

C. Sangrado de los conejos.

El día que los conejos eran sangrados se les retiró la comida por lo menos dos horas antes del sangrado. Los conejos se sangraron cortando la vena periférica de la oreja y se obtenían aproximadamente 10 mL de sangre. Cuando se obtuvo un título de 1:8, los sangrados subsiguientes se hicieron por punción cardíaca 15 días después del último refuerzo.

Para separar el suero de la sangre se siguió la siguiente metodología:

La sangre se recolectó en tubos de vidrio cónicos (30 mL) para e-

uitar hemólisis; la sangre recolectada se dejó coagular a temperatura ambiente durante 2 horas, luego con una varilla de madera se separó el coágulo de las paredes y se dejó reposar durante la noche a 4 °C. Luego se centrifugó la sangre durante 20 minutos a 2000 rpm por medio de una centrífuga clínica y el suero sobrenadante se transfirió por medio de una pipeta Pasteur a frascos de tapón de rosca debidamente rotulados y se almacenaron a -20 °C.

Al final, se preparó una mezcla de la combinación de todos los sueros obtenidos y se almacenó en alícuotas de 5 mL; y a cada alícuota se le añadió 2 uL de una solución (1g/mL) de timerosal (SIGMA, No. T-5135).

El título de los sueros se determinó por la técnica de inmunodifusión en gel por el método de Ouchterlony.

D. Técnica de inmunodifusión en gel.

1. Preparación de placas con agar. Se utilizaron portaobjetos de 7.6 cm x 5.0 cm y se cubrieron con una capa muy delgada de agar de precubrimiento (0.2% de agarosa en solución tamponada de barbitaral sódico 0.1 M, pH 8.6). Una vez seco el agar se colocaron 5 mL de agar de difusión (0.9% agarosa en solución tamponada de barbitaral sódico 0.1 M, pH 8.6) en el centro de la placa tratando que el agar quedara uniformemente distribuido y dejando aproximadamente un grosor de 3 mm. Se esperó que gelificara el agar y luego se guardaron las placas dentro de cámaras de humedad (cajas plásticas con tapadera y con esponjas humedecidas con agua destilada) en refrigeración hasta que fueron usadas; no se almacenaron por más de 5 días.

a) Preparación del agar de precubrimiento. Se pesaron 0.2 g de agarosa (Bio-Rad Laboratories, Rockville Centre, N.Y. E.E. U.U. cat. 162-0100) y 0.0001 g de timerosal (SIGMA, No. T-5125) y se colocaron en un erlenmeyer de 125 mL. Luego se añadieron 50 mL de una solución tamponada de barbital sódico 0.1 M, pH 8.6 y 49.8 mL de agua destilada. Esta solución se dejó ebullir con agitación continúa. Una vez ebullida la solución se distribuyó en tubos de ensayo con tapón de rosca y de 16 x 125 mm. Cuando estos se enfriaron se almacenaron a 4 °C.

b) Preparación del agar de difusión. Se pesaron 0.9 g. de agarosa y 0.0001 g de timerosal; se colocaron en un erlenmeyer de 125 mL y se añadieron 99.1 mL de una solución tamponada de barbital 0.1 M, pH 8.6. Esta solución se llevó a ebullición con agitación continúa. Luego se distribuyeron aproximadamente 12 mL de agar de difusión en cada tubo de ensayo, del mismo tipo utilizados para almacenar el agar de precubrimiento. Una vez fríos se almacenaron a 4 °C.

Cada vez que se necesitaban placas para inmunodifusión, se licuaban ambos tipos de agar en baño de agua a 100 °C y luego se disminuía la temperatura a 50 °C antes de usar el agar.

c) Preparación de la solución tamponada de barbital 0.1 M, pH 8.6. Se pesaron 1.38 g. de 5,5' - dietilbarbitúrico (SIGMA, No. B-0375), 7.7 g de sal sódica de barbital (SIGMA, No. B-0500), y 0.0005 g. de timerosal (SIGMA, No. T-5125). Se agregó agua destilada y se aforó a 500 mL; se midió el pH y se ajustó a 8.6 cuando fue necesario.

d) Perforación de pocillos. Se instaló un Kitasato como trampa conectado a la llave de vacío y al perforador. El perforador utilizado fue el "Gel Punch Set" (Bio-Rad, catálogo #170-4030) con diámetro externo de 2.0 mm. Se utilizó un patrón plástico con un pocillo en el centro y seis alrededor con los siguientes diámetros: 2.5 mm de cada pocillo y una distancia de 6 mm entre el centro del pocillo del centro al centro de cualquiera de los pocillos del alrededor. Por placa se perforaron cuatro patrones (Figura 3). En cada pocillo se depositaron 7 uL de líquido.

2. Coloración de láminas. Una vez se tienen los resultados pueden hacerse más obvios si se colorea la lámina con el colorante para proteínas Amido Black. Las láminas se colocaron en una bandeja y se cubrieron con solución salina 0.15 M por 24 horas en refrigeración. Luego se colocaron las placas en otra bandeja y se cubrieron con agua destilada durante 2 horas. Se sacaron las placas de la bandeja y cada placa se cubrió con papel filtro Whatman #1 y se dejaron secar en un horno a 37 °C. Totalmente secas las láminas se removió el papel filtro y se lavaron con agua destilada a manera de quitar cualquier resíduo de papel. Las láminas se colocaron en una bandeja y se cubrieron con el colorante (Amido Black). La bandeja se colocó sobre un agitador a agitación rotacional lenta durante 20 minutos. Cumplido el tiempo, se sacaron las placas del colorante y se lavaron con agua destilada. Si la coloración era muy intensa, debe usarse la solución decolorante. Se dejaron secar las láminas y se hizo la segunda lectura de las bandas de precipitado.

a) Preparación del colorante (Amido Black). Se pesaron 0.2 g de Naftalina Negra. A esto se le agregó 100 mL de alcohol metílico, 20 mL de ácido acético glacial y 100 mL de agua destilada. Se agitó bien y se guardó en un frasco obscuro.

b) Solución decolorante. Se mezclaron 500 mL de alcohol metílico, 100 mL de ácido acético glacial y 500 mL de agua destilada. La solución se almacenó en un frasco obscuro a temperatura ambiente.

E. Determinación del título de los antisueros utilizados.

En cada pocillo de las placas de inmunodifusión se colocaron 7 uL de una solución de 600 ug/mL diluída 1:2 de los antígenos (albúmina bovina, albúmina humana) en el pocillo del centro. En los pocillos del alrededor se colocaron diluciones seriadas 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64 de los antisueros. Como antígeno también se utilizó suero humano y suero bovino fetal diluídos 1:16. Las diluciones se hicieron en solución salina 0.15 M.

F. Identificación de las ingestas de sangre de Anopheles albimanus.

Las hembras del género Anopheles albimanus procedentes de un insectario fueron alimentadas a saciedad tanto en bovinos como en humanos.

1. Impregnaciones de contenidos abdominales. Aproximadamente 100 hembras se sacrificaban cada 12 horas, después de haber ingerido una alimentación de sangre, colocándolas en el congelador a -20 °C. Después se extrajo el contenido abdominal presando al mosquito entre dos partes de un papel filtro Whatman #1, quedando dos impregnaciones en el papel por mosquito. De esta

manera se prepararon lotes de 10 mosquitos cada uno, que fueron alimentados y procesados a las 0, 12, 24, 36, 48 y 60 horas de digestión, que es el tiempo posterior a la ingesta inicial de sangre. Una vez hechas las impregnaciones se dejaban secar los papeles filtro por una noche a temperatura ambiente y luego eran almacenados en bolsas plásticas con cloruro de calcio (CaCl_2), en botes de cartón y en el congelador a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Los resultados en este estudio se basaron en una impregnación por mosquito, excepto en donde se indique lo contrario.

2. Extracción de las impregnaciones y concentración de antisue-

ro. La extracción del contenido abdominal del papel fil--tro se hizo de la siguiente manera, tomando una impregnación por mosquito: Las impregnaciones en el papel filtro fueron cortadas con un perforador para papel con círculos de un diámetro aproximado de 5mm y colocadas dentro de los pocillos de cajas de microdilución. Luego se añadió un volumen determinado de una solución tamponada de fosfatos 0.01M, pH 7.2 a cada pocillo. Los papeles filtros se eluyeron a temperatura ambiente por 1 hora.

El volumen de elución y la concentración del antisuero a utilizar se determinó de acuerdo al siguiente procedimiento:

Se procesaron placas de inmunodifusión con el suero diluido 1:2 y 1:4 con solución salina vrs. impregnaciones en papel filtro de mosquitos alimentados y procesados inmediatamente y eluidos en 50, 100, 250 y 500 μL de solución salina 0.15 M. Como controles negativos se utilizaron mosquitos no alimentados pero procesados de igual forma como ya se describió anteriormente, mosquitos

BIBLIOTECA

DE LA

UNIVERSIDAD NACIONAL

alimentados en cobayo y mosquitos alimentados en bovino o humano, dependiendo de qué antisuero se estuviera analizando. Se eluyeron los contenidos de 20 mosquitos en pocillos de una placa de microdilución. De las muestras y antisueros se colocaron 7 uL en los pocillos de la placa de inmunodifusión (Figura 4) utilizando una pipeta digital Eppendorff de 2-10 uL.

G. Purificación de la fracción IgG de la gama-globulina.

A 1 mL de suero de conejo anti-albúmina (humana o bovina) se le añadió 4 mL de agua destilada. Luego se agregó lentamente 7 mL de una solución saturada de sulfato de amonio. Se dejó una hora a temperatura ambiente y con agitación continua. Se centrifugó 10 minutos a 3500 rpm por medio de una centrífuga clínica. El precipitado se disolvió en 1 mL de 1/2 X PBS (solución tamponada de fosfatos 0.01 M, pH 7.2) y se introdujo en una membrana de diálisis, que previamente se había tratado con agua destilada llevada a ebullición. Se dializó 3 veces en 500 mL de 1/2 X PBS, cada diálisis de 4 horas y a temperatura ambiente con agitación constante. El contenido de la membrana de diálisis se pasó a través de una columna de cromatografía de intercambio iónico DEAE-Sephacel (SIGMA, No. 1-6505 Lot. 101F-0616) tratada de la siguiente manera: del DEAE disuelto en etanol al 28% se midieron 10 mL, se colocaron en un vaso de precipitar de vidrio y se lavaron con agua destilada, agitándolo suavemente en espiral con 20 mL de agua. Luego se decantó y se descartó la parte líquida. Este procedimiento se repitió unas diez veces con agua destilada y unas cinco con 1/2 X PBS. Al terminar el lavado, se llenó la columna con el DEAE y se equilibró con 1/2 X PBS, esto quiere decir, que se dejó correr 1/2 X PBS por la co-

lumna hasta que el eluido que se obtuvo de la columna tuvo el mismo pH que 1/2 X PBS.

Antes de introducir el dializado se llevó el menisco del líquido al borde del DEAE, suavemente se colocó el dializado en la columna y nuevamente se llevó el menisco del líquido al borde del DEAE y el eluido que se obtuvo se desechó.

Cuidadosamente se llenó la columna con PBS, y se recolectaron 20 fracciones de 1 mL cada una de eluidos de la columna en tubos separados. Se tomó la lectura espectrofotométrica en densidad óptica (DO) a 280 nm de cada tubo. La lectura se hizo con el espectrofotómetro Spectronic 21 (Bausch and Lomb modelo 21). Se procesaron dos columnas para anti-albúmina humana y dos para anti-albúmina bovina (Cuadro 4). Para concentrar la fracción de gama-globulina eluida de la columna, se liofilizaron los contenidos de los tubos 4 al 17 del antisuero humano (columna 1); del 3 al 20 del humano (columna 2); del 4 al 15 del bovino (columna 1); y del 4 al 20 bovino (columna 2).

Se combinaron los diferentes liofilizados tanto para los antisueros humanos como para los de bovino. Luego se prepararon las siguientes soluciones: Se pesaron 0.11564 g del liofilizado anti-albúmina humana y se diluyó en 2 mL de PBS. Se pesaron 0.10340 g del liofilizado anti-albúmina bovina y se diluyó en 2 mL de PBS.

Para estandarizar las cantidades de proteínas que se iban a utilizar en la técnica de ELISA se determinó la concentración de proteína tanto de los antisueros producidos anti-albúmina humana, anti-albúmina bovina como de los siguientes antisueros comerciales: Antisuero en conejo anti-albúmina humana (Cappel, Cat. No.0101-0342 Lot. No.26003),

antisuero en cabra anti-albúmina humana conjugada con peroxidasa (Cappel, Cat. No. 3201-0341 Lot. No. 25839), antisuero en conejo fracción IgG anti-albúmina bovina con peroxidasa (Cappel, Cat. No. 3202-0342 Lot. No. 24289), antisuero en cabra fracción IgG anti-IgG humana (TAGO, Cat. No. 4100 Lot. No. 00-42-02), antisuero en cabra fracción IgG anti-IgG humana conjugada con peroxidasa (SIGMA, Lot. No. 65F-8870), antisuero en conejo anti-IgG bovina (Cappel, Cat. No. 0102-0082 Lot. No. 23545), antisuero en conejo fracción IgG anti-IgG bovina conjugada con peroxidasa (Cappel, Cat. No. 3202-0082 Lot. No. 27903) todos por el método de "Bio-Rad" que se base en el procedimiento de Bradford.

H. Determinación de la concentración de Proteína.

Se preparó una curva de calibración de 5 a 50 ug/mL a partir de una solución de referencia de 1.4 mg/mL de gama-globulinas bovinas. Se tomó 200 uL de la solución de referencia y se le añadió 5.4 mL de PBS y se preparó la siguiente curva:

CURVA DE CALIBRACION PARA PROTEINAS

Tubo #	PBS (uL)	Sol. δ -Globulina (uL)	Concentración Final (μ g/mL)
1	1,000	0	0
2	900	100	5
3	800	200	10
4	700	300	15
5	600	400	20
6	500	500	25
7	400	600	30
8	300	700	35
9	200	800	40
10	100	900	45
11	0	1,000	50

Las muestras se prepararon de la siguiente forma:

Se tomaron 2 uL de los antisueros y se diluyeron en 998 mL de PBS. De estas nuevas soluciones se colocaron 100 uL en triplicado en pocillos de cajas de microdilución de 96 pocillos y se les añadió 200 uL del colorante (Coomasie azul) para ensayo de proteína "Bio-Rad" (cat.500-0006) diluído 1:5 con agua destilada. Este mismo procedimiento se siguió para la curva de calibración. Después de 10 minutos de haber agregado el colorante se leyó la densidad óptica a 595 nm. Para las

lecturas se utilizó el "Minireader II" (Dynatech, Alexandria, VA, E.E.U.U., Cat No. 011-030-0125).

1. Técnica de ELISA.

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Immulon 2, Dynatech, Alexandria, VA, E.E.U.U.). Primero se colocó el anticuerpo de captura en un volumen de 50 uL/pocillo (los diferentes antisueros utilizados: anti-albúmina humana producida y comercial, anti-albúmina bovina producida y comercial, anti-IgG humana y anti-IgG bovina) diluidos en solución tamponada de carbonatos 0.05 M. pH 9.6. Las concentraciones utilizadas para los antisueros se determinaron, según se explica más adelante. Se incubaron las placas durante una noche a temperatura ambiente y en cámara de humedad. Luego, se lavó 2 veces con PBS 0.01 M/Tween 20 0.05% (v/v) (PBS/T20) utilizando aproximadamente 250 uL por pocillo. Se bloqueó con una solución PBS/TW 20 y 3% gelatina líquida ultra pura (Norland, No.1569 Lot. 8753), utilizando 200 uL por pocillo; se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Luego se agregó 50 uL/pocillo del antígeno (impregnaciones sanguíneas eluidas con PBS/TW 20 y 1% de gelatina). Más adelante se explica como se determinó el volumen de elución. Luego se dejó incubar 2 horas a temperatura ambiente y se lavó 2 veces con PBS/TW 20 como la vez anterior. Se agregó 50 uL/pocillo del conjugado diluido en PBS/TW 20 y 1% de gelatina. Posteriormente se explica como se determinaron las concentraciones de los distintos conjugados. Luego se dejó incubar una hora a temperatura ambiente y se lavó 4 veces como las veces anteriores. Se añadieron 200 uL/pocillo de solución de trabajo de substrato de orto-fenilenediamina (OPD) (SIGMA,

P29029), se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente y se leyó la densidad óptica a 490 nm en una lectora "Minireader II" a los 30 y 60 minutos, después de haber añadido el sustrato. La reacción puede detenerse si se desea con la adición de 25 uL/pocillo de H_2SO_4 2 N. Se utilizaron pipetas digitales Eppendorff de 10 a 100 uL y de 100 a 1000 uL.

1. Preparación de solución de trabajo de sustrato OPD.

Se disolvieron 100 mg de o-fenilenediamina (OPD) (SIGMA, P29029) en 10 mL de metanol. Esta solución se prepara siempre en fresco 10 minutos antes de ser utilizada. Se adicionó 1 mL de la solución de OPD a 99 mL de acetato de sodio-ácido acético 0.05 M, pH 4.5 y 10 uL de H_2O_2 al 30%; esta es la solución de trabajo del sustrato.

2. Preparación de solución tamponada de carbonatos 0.5 M, pH 9.6.

Solución A: 0.2 M $Na_2 CO_3$ anhidro (21.2 g/L).

Solución B: 0.2 M $NaHCO_3$ anhidro (16.8 g/L).

Se mezclan 32 mL de la solución A + 68 mL de la solución B y se ajusta el pH a 9.6 si es necesario.

3. Concentración de anticuerpo de captura, conjugado y volumen de elución.

Para establecer las concentraciones de anticuerpo de captura, conjugado y volumen de elución del antígeno se procesaron placas en las que se variaba simultáneamente cada uno de estos valores.

Por ejemplo, se procesaron placas donde la concentración del anticuerpo de captura era 100 ng/pocillo, 1 ug/pocillo y 10 ug/po

pocillo. Se utilizaron volúmenes de elución para el antígeno de 10, 250, 500, y 1000 uL. Las concentraciones de conjugado fueron de 100 ng, 1 ug y 10 ug (ver distribución de la placa en la Figura 5). De esta manera se procesaron diferentes placas combinando los rangos de concentración, hasta encontrar la que diera la mayor discriminación entre los controles positivos y negativos (Cuadro 11).

Como controles positivos se utilizaron los mosquitos alimentados en humano o bovino, con 0 horas de digestión. Como controles negativos, mosquitos sin ingesta de sangre y mosquitos alimentados en humano o bovino, dependiendo del anticuerpo de captura que se estuviera analizando. Los controles fueron eluidos en 250 uL de PBS/TW 20 + 1% de gelatina, como control negativo también se utilizó PBS.

4. Reproducibilidad de la técnica de ELISA.

Para determinar si existe reproducibilidad entre placas se procesaron tres placas de ELISA por cada uno de los antisueros en estudio a las concentraciones óptimas establecidas (Cuadro 11). Como antígeno se utilizó mosquitos alimentados en humanos o bovinos, procesados inmediatamente después de la alimentación. Como controles negativos se utilizaron mosquitos no alimentados pero procesados de igual forma que los alimentados, mosquitos alimentados en humano o bovino dependiendo del antisuero que se estuviera analizando (estos mosquitos también se procesaban inmediatamente después de ser alimentados) y PBS. Todos los mosquitos utilizados fueron eluidos en 1000 uL de PBS. Por placa se utili-

zaron lotes de 10 mosquitos y 4 réplicas de cada uno (ver Figura 6 para distribución de placa).

5. Tiempos de Digestión.

Los tiempos de digestión analizados fueron 0, 12, 24, 36, 48 y 60 horas después de la ingesta de sangre. Esto significa que los mosquitos fueron alimentados y procesados después de los diferentes tiempos mencionados. Por placa se procesaron lotes de 10 mosquitos para cada tiempo (Figura 6). Pero un mismo mosquito era analizado el mismo día tanto por el método de ELISA como por el de inmunodifusión, y dentro de cada método se analizaba con los antisueros a IgG, albúmina producida y albúmina comercial, ya fuera para bovino o humano, dependiendo en qué hospedero había sido alimentado el mosquito.

Para la técnica de inmunodifusión las impregnaciones de los mosquitos fueron eluidas en 50 uL y para la técnica de ELISA las impregnaciones de los mosquitos fueron eluidas en 250 uL.

6. Mosquitos recolectados del campo.

Se procesaron mosquitos de las localidades Los Angeles, Los Chatos y La Empalizada, que pertenecen al municipio de la Gomera, Escuintla, Guatemala. La captura de los mosquitos de las tres localidades se hizo extra domiciliar con trampa de luz durante las horas del día.

Las características de las localidades son las siguientes:

Los Angeles: Es una zona ganadera, con varias parcelas y muy pocas casas, alrededor de 5 casas, en una extensión amplia de terreno donde hay mucho ganado bovino.

Los Chatos: Es una zona ganadera. Por ser una aldea tiene la cualidad de que todas las casas están concentradas en un sólo lugar. Los corrales de ganado no se encuentran cerca de la aldea sino que a los alrededores. Por otro lado, se ha observado que los criaderos de los mosquitos se encuentran en la periferia de la aldea.

La Empalizada: No es una zona ganadera. Esto quiere decir que si hay ganado presente, no se encuentra en las cantidades que puede darse en las otras regiones ganaderas.

De cada localidad se analizaron 63 mosquitos. Como anticuerpo de captura se utilizó anti-IgG humano y anti-IgG bovino. De estos mismos mosquitos se tienen también los resultados obtenidos por inmunodifusión, utilizando antisuero humano y antisuero bovino.

IV. RESULTADOS

A. Determinación del título de los antisueros.

El título es la dilución máxima del antisuero para la cual se llega a obtener una reacción positiva. Se determinó el título de los antisueros obtenidos de los conejos inmunizados con albúmina humana y bovina y de los antisueros comerciales anti-suero humano y anti-suero bovino, contra albúmina humana, suero humano, albúmina bovina y suero bovino fetal (Cuadros 5 y 6). El título obtenido por el método de Ouchterlony en antisueros producidos con albúmina humana y bovina fue de 1:8 mientras que los títulos de los sueros comerciales fueron de 1:2 y 1:4, respectivamente.

B. Determinación del volumen de elución de las impregnaciones en papel filtro.

Para el método de inmunodifusión se observaron bandas muy claras cuando el volumen de elución fue de 250 uL, tanto para mosquitos alimentados en bovino como humano. Pero en ambos casos las bandas fueron más densas para la dilución de antisuero 1:2. En las placas 1-4 (Cuadro 7) las reacciones fueron positivas, pero en lugar de observarse bandas se observaron halos anchos.

En el caso de los sueros comerciales sólo se tienen resultados claros para los volúmenes de elución de 50 y 100 uL mientras que en el de 250 uL los resultados de precipitación son menos densos. Por lo tanto, para los sueros comerciales se eluyó la impregnación del mosquito en 50 uL y se evaluó con el antisuero diluido 1:2 y para los antisueros producidos se utilizaron las impregnaciones eluidas en 250 uL

con el antisuero a la misma concentración (1:2).

C. Determinación de la concentración de proteína de los sueros utilizados.

En los Cuadros 8 y 9 se observan las lecturas espectrofotométricas en densidad óptica promedio de las dos curvas de calibración para proteína (Gráficas 1 y 2 para las rectas de regresión).

Con la Curva de la Gráfica 1 se obtuvo la concentración de proteína de los antisueros anti-albúmina humana comercial, anti-IgG humano con peroxidasa y anti-IgG bovino. Con la Curva de la Gráfica 2 se obtuvo la concentración de proteína de los antisueros anti-albúmina humana producida, anti-albúmina humana conjugada con peroxidasa, anti-IgG humano, anti-albúmina bovina producida, anti-albúmina bovina comercial, anti-albumina bovina conjugada con peroxidasa y anti-IgG bovino conjugada con peroxidasa. Los resultados de concentración de proteína (mg/mL) de los antisueros se ilustran en el Cuadro 10, demostrando una amplia variación en las concentraciones de los antisueros examinados (1.4-332.1 mg/mL).

D. Determinación de la concentración de anticuerpo de captura, conjugado y volumen de elución.

Para determinar estos factores para los distintos antisueros analizados se hicieron gráficas en donde se contrastaron unidades de absorbancia o densidad óptica versus concentración de conjugado (ug/pocillo) para cada concentración de anticuerpo de captura. No se graficaron los diferentes volúmenes de elución, ya que las variaciones en éstos nunca fueron mayores de 0.05 unidades de densidad óptica, y ésta variación no es comparable con las variaciones que se dan con el

anticuerpo de captura y conjugado, que llegan a ser de 0.3 unidades de densidad óptica.

La concentración de anticuerpo de captura y conjugado óptimas son aquellas en que la diferencia de las densidades ópticas de un punto en la curva de los controles positivos con el punto correspondiente en la curva de los controles negativos da un valor máximo, considerando también el ahorro de reactivos.

- En la Gráfica 3.1 (página 86) podemos observar los resultados para IgG humana con anticuerpo de captura a 0.1, 0.5 y 1 ug/pocillo y conjugado a 0.1, 0.5 y 1 ug/pocillo.
- En la Gráfica 3.2 (página 87) podemos observar los resultados para IgG humana con anticuerpo de captura a 0.5 y 1 ug/pocillo y conjugado a 2, 3, 4 y 5 ug/pocillo.
- En la Gráfica 4.1 (página 88) podemos observar los resultados para albúmina humana producida con anticuerpo de captura a 0.1, 1 y 10 ug/pocillo y conjugado a 0.1, 1 y 10 ug/pocillo.
- En la Gráfica 4.2 (página 89) podemos observar los resultados para albúmina humana producida con anticuerpo de captura a 1, 2.5 y 5 ug/pocillo y conjugado a 1, 2.5 y 5 ug/pocillo.
- En la Gráfica 4.3 (página 90) podemos observar los resultados para albúmina humana producida con anticuerpo de captura a 1, 2 y 3 ug/pocillo y conjugado a 1, 2 y 3 ug/pocillo.
- En la Gráfica 5.1 (página 91) podemos observar los resultados para albúmina humana comercial con anticuerpo de captura a 1.5 y 10 ug/pocillo y conjugado a 1, 5 y 10 ug/pocillo.
- En la Gráfica 6.1 (página 92) podemos observar los resultados para

IgG bovina con anticuerpo de captura a 1, 2.5 y 5 ug/pocillo y conjugado a 1, 2.5 y 5 ug/pocillo.

- En la Gráfica 6.2 (página 93) podemos observar los resultados para IgG bovina con anticuerpo de captura a 0.25, 0.5 y 1 ug/pocillo y conjugado a 0.25, 0.5 y 1 ug/pocillo.
- En la Gráfica 7.1 (página 94) podemos observar los resultados para albúmina bovina producida con anticuerpo de captura a 0.1, 1 y 10 ug/pocillo y conjugado a 0.1, 1 y 10 ug/pocillo.
- En la Gráfica 7.2 (página 95) podemos observar los resultados para albúmina bovina producida con anticuerpo de captura a 1, 3 y 5 ug/pocillo y conjugado a 1, 3 y 5 ug/pocillo.
- En la Gráfica 8.1 (página 96) podemos observar los resultados para albúmina bovina comercial con anticuerpo de captura a 0.1, 1 y 10 ug/pocillo y conjugado a 0.1, 1 y 10 ug/pocillo.
- En la Gráfica 8.2 (página 97) podemos observar los resultados para albúmina bovina comercial con anticuerpo de captura a 1, 3 y 5 ug/pocillo y conjugado a 1, 3 y 5 ug/pocillo.

Las concentraciones óptimas escogidas de anticuerpos de captura y conjugados en ug/pocillo se muestran en el Cuadro 11 (página 63) (se presentan en orden de combinación de parejas) así como también los volúmenes que se tomaban de los sueros y el volumen en que eran diluïdos, para que 50 uL de las diluciones dieran las concentraciones óptimas establecidas. Las concentraciones óptimas establecidas se muestran en el Cuadro 11, oscilando los valores entre 0.25-5 ug/pocillo de acuerdo al tipo de antisuero utilizado.

E. Reproducibilidad de la técnica de ELISA.

Para esta determinación se tomaron tres placas de ELISA por antisuero. Como para cada placa se analizaron 10 mosquitos independientes, escogidos al azar de una población con 4 réplicas de cada mosquito, se aplicó un análisis de varianza anidado por cada antisuero; con esto se estableció si existía variación entre placas y dentro de una misma placa entre individuos. Sólo se presentan los cuadros del análisis de varianza para los antisueros a IgG humana, albúmina humana producida y albúmina humana comercial (Cuadro 12, página 64); y para IgG bovina, albúmina bovina producida y albúmina bovina comercial (Cuadro 13, página 65).

Según los resultados del análisis de varianza (Cuadros 12 y 13) se obtiene que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre placas y también existe diferencia entre mosquitos en una misma placa, para todos los antisueros analizados.

F. Resultados del volumen de elución y el tiempo de digestión de ingestas de sangre.

Primero se hizo una prueba de volumen de elución. Un mismo mosquito (la mitad de cada impregnación) fue eluido en 250 y 1000 uL y analizado con los antisueros de IgG bovino, albúmina bovina producida y comercial (Cuadro 14, página 66). No se hizo análisis estadístico para mosquitos alimentados en humanos y evaluados con la prueba de ELISA.

Se hizo un análisis de t de "Student" a los resultados del Cuadro 14 para determinar si existía una diferencia entre el volumen de elución que se utilizara (250 o 1000 uL).

<u>Volumen 250 uL</u>		<u>Volumen 1000 uL</u>	
Casos =	18	Casos =	18
Media =	73.33%	Media =	57.78%
Desviación estándar =	39.41	Desviación estándar =	45.83
t (1,0.05) =	1.092	t (1,0.05) =	6.31

Según esta prueba estadística la diferencia entre las medias no es significativa ($p > 0.05$).

Este análisis se hizo para volúmenes de elución para el método de inmunodifusión; los valores brutos se muestran en los Cuadros 15-17 (páginas 67-69). Para este método los volúmenes de elución utilizados fueron 50 y 250 uL y se analizó tanto para humano como bovino.

HUMANO

<u>Volumen 50 uL</u>		<u>Volumen 250 uL</u>	
Casos =	48	Casos =	48
Media =	50.00	Media =	36.88
Desviación estándar =	43.61	Desviación estándar =	44.73
t (1, 0.05) =	1.46	t (1,0.05) =	6.31

BOVINO

<u>Volumen 50 uL</u>		<u>Volumen 250 uL</u>	
Casos =	24	Casos =	24
Media =	42.92	Media =	24.17
Desviación estándar =	41.23	Desviación estándar =	29.48
t (1, 0.05) =	1.82	t (1,0.05) =	6.31

Como puede observarse de nuevo, la diferencia de las medias no es significativa. Aunque el resultado de la prueba estadística indica de que no hay diferencia ($p > 0.05$) entre los volúmenes de elución que se utilizaron, para el método de inmunodifusión, los mosquitos se eluyeron con 50 uL y para el método de ELISA con 250 uL; esto se escogió así porque visualmente los valores positivos que se obtienen a 48 y 60 horas de digestión a partir de los volúmenes menores de elución son más obvios que a los volúmenes mayores. Además, algunos de los mosquitos controles negativos presentan valores positivos, ésto se puede ver en los datos brutos (Cuadros 14-17, páginas 66-69). Como para fines prácticos sólo interesa identificar el antígeno sanguíneo, los datos de inmunodifusión se expresaron sólo como positivos o negativos, y para comparación todos los valores numéricos de densidad óptica de las placas de ELISA se tradujeron a positivos o negativos, tomando como positivo todo valor superior del valor que da la media de los controles negativos más tres veces su desviación estándar. Los datos brutos para la prueba de tiempo de digestión para inmunodifusión, se observan en los Cuadros 18 y 19 (páginas 70-71), 20 y 21 (páginas 72-73) para ELISA.

En base a estos resultados se desea establecer si existe alguna diferencia en la sensibilidad de los métodos y dentro de cada método y si hay una diferencia en qué antígeno sanguíneo se está detectando (IgG o albúmina). Así mismo, se desea establecer si hay diferencia entre los datos obtenidos para las albúminas producidas y las comerciales. Para esto se hizo un análisis de varianza de dos vías y luego se aplicó el método de Duncan de comparaciones múltiples. Los resul

tados brutos de esta prueba se resumen en los Cuadros donde se presenta el porcentaje total de mosquitos identificados con antígeno sanguíneo humano para cada método y antígeno utilizado (Cuadro 22, página 74, para antígeno humano y Cuadro 23, página 75, para antígeno bovino).

Del análisis de las comparaciones múltiples se obtuvieron los siguientes resultados:

1. COMPARACION DE ANTIGENO HUMANO DENTRO DE UN MISMO METODO:

<u>TODO:</u>	<u>Valor Obtenido</u>	<u>Valor Crítico</u>
<u>1.A ELISA:</u>		
IgG humana vrs albúmina humana producida	11.3	17.8
IgG humana vrs albúmina humana comercial	20.0*	18.7
Albúmina humana producida vrs. albúmina humana comercial	8.7	17.8
<u>1.B INMUNODIFUSION:</u>		
IgG humana vrs. albúmina humana producida	29.3*	17.8
IgG humana vrs. albúmina humana comercial	29.7*	18.7
Albúmina humana producida vrs albúmina humana comercial	0.4	17.8
<u>2. COMPARACION DEL ANTIGENO HUMANO POR METODO:</u>		
IgG humana por ELISA vrs IgG humana por inmunodifusión	66.0*	20.1
Albúmina humana producida por ELISA vrs albúmina producida por inmunodifusión	25.4*	19.3
Albúmina humana comercial por ELISA vrs. albumina humana comercial por inmunodifusión	16.3	17.8

* Diferencia significativa.

3. COMPARACION DE ANTIGENO BOVINO DENTRO DE UN MISMO

METODO:

3.1 ELISA:

IgG bovino vrs albúmina bovina producida	12.0	22.05
IgG bovino vrs. albúmina bovina comercial	13.0	23.22
Albúmina bovina producida vrs. albúmina bovina comercial	1	22.05

3.2 INMUNODIFUSION:

IgG bovino vrs. albúmina bovina producida	3.0	22.05
IgG bovino vrs. albúmina bovina comercial	3.0	23.22
Albúmina bovina producida vrs. albúmina bovina comercial	0.0	22.05

4. COMPARACION DEL ANTIGENO BOVINO POR METODO:

IgG bovino por ELISA vrs. IgG bovino por inmunodifusion	25.0*	24.00
Albúmina bovina producida por ELISA vrs. albúmina bovina producida por inmunodifusión	16.0	23.22
Albúmina bovina comercial por ELISA vrs. albúmina bovina comercial por inmunodifusión	1.0	22.05

*Diferencia significativa.

5. EVALUACION DE ANTIGENO Y METODOS PARA MOSQUITOS DEL CAMPO:

(Para los mosquitos del campo sólo se usó como anticuerpo de captura IgG bovino e IgG humano (Cuadro 24, página 76).

5.1 COMPARACION DE LOCALIDADES POR METODO, ANTIGENO HU-
MANO:

ELISA vrs. INMUNODIFUSION

a) Los Angeles	3.14	6.53
b) Los Chatos	6.29*	6.02
c) La Empalizada	0.00	6.02

5.2 COMPARACION DE LOCALIDADES POR METODO, ANTIGENO
BOVINO:

ELISA vrs. INMUNODIFUSION

a) Los Angeles	20.29*	16.48
b) Los Chatos	14.14	15.62
c) La Empalizada	47.86*	16.12

* Diferencia significativa.

(Todos los resultados obtenidos por el método de ELISA son los de las lecturas a 60 minutos).

V. DISCUSION

En estudios previos para determinar el índice de alimentación de artrópodos hematófagos han sido aplicados varios métodos serológicos como el de precipitación en tubo capilar (49), en gel (50), inmunofluorescencia (46), y recientemente, por el método inmunoenzimático de ELISA (27). La identificación del hospedero en el cual el artrópodo se alimentó se ha basado en la detección de proteínas séricas del hospedero contenidas en la ingesta de sangre del artrópodo, por ejemplo, determinando proteínas plasmáticas totales (10), albúmina sérica (4), inmunoglobulinas séricas como IgG (11). Sin embargo, aun está por establecerse cuáles son las condiciones óptimas para la recolecta de mosquitos que reflejen en forma objetiva el índice de alimentación sanguínea y los aspectos metodológicos mismos de la identificación de la ingesta de sangre. La mayoría de los estudios usualmente no han analizado las condiciones y volúmenes máximos necesarios para eluir la muestra de sangre del artrópodo y aun así obtener resultados confiables, como también la sensibilidad y especificidad de los métodos serológicos y la naturaleza de los reactivos a utilizarse.

En el presente estudio se demostró que el método de inmunodifusión no es lo suficientemente sensible para identificar la fuente de alimentación de la mayoría de los mosquitos, especialmente después de 24-36 horas de alimentación, que son las condiciones en las que se encuentran los mosquitos del campo al recolectarse para el análisis del índice de alimentación. Para mosquitos alimentados con sangre humana se identificaron del 0-42%, por el contrario, por el método de ELISA

fue del 84-98% de los mosquitos alimentados hasta las 36 horas, haciendo este método el de elección para este tipo de determinaciones. Además, el procedimiento utilizado en este estudio mostró una superioridad a los descritos en la literatura, donde identificaron mosquitos alimentados con sangre humana únicamente hasta las 24 horas después de la ingesta (28, 31).

El volumen de elución del antígeno sanguíneo depende de la cantidad de sangre ingerida por el vector y del método serológico a utilizarse. En este estudio no se encontraron diferencias significativas en los volúmenes de elución entre 50 y 250 uL para inmunodifusión, y entre 50 y 1,000 uL para ELISA. Estos resultados reflejan la mayor sensibilidad del método de ELISA sobre el de inmunodifusión para detectar concentraciones menores de antígenos sanguíneos. Sin embargo, es necesario mencionar que en este estudio se encontraron diferencias en la proporción de mosquitos positivos después de varias horas de digestión de la ingesta de sangre, especialmente después de las 24-48 horas de digestión. Una posible explicación es que la variación que se observó sea debida al volumen inicial de sangre ingerida por el mosquito y que, por lo tanto, en aquellos en los que la ingesta inicial fue menor resultaron negativos posteriormente para el análisis de sangre en las horas indicadas. La cantidad de la ingesta de sangre está asociada al comportamiento del hospedero que en ocasiones puede interrumpir la ingesta, quedando algunos mosquitos con ingestas parciales. Además, el metabolismo de cada mosquito es diferente y unos pueden digerir el antígeno sanguíneo más rápido que otros.

El antígeno a detectarse en la ingesta de sangre depende de la

concentración inicial y final en el tiempo posterior a la digestión y en la naturaleza de los reactivos y el método serológico utilizado. La albúmina sérica está presente en mayores concentraciones que IgG (por ejemplo, 4,400 mg/dL vrs. 1,250 mg/dL en humanos) y posiblemente sea la última proteína sérica a digerirse en el estómago de los mosquitos (4). Por lo tanto, en este estudio se planteó la hipótesis que la identificación de la ingesta de sangre detectando albúmina sérica era más sensible que IgG. Sin embargo, los resultados obtenidos indicaron que una mayor proporción de mosquitos fueron identificados como positivos si el análisis de los antígenos sanguíneos se hacía detectando IgG que albúmina sérica. Los mosquitos alimentados con sangre humana o bovina pudieron identificarse en un 98-100% aun hasta 36 horas después de digestión cuando se determinó IgG en la muestra sanguínea; por el contrario, sólo un 74-86% de los mosquitos fueron positivos cuando se determinó albúmina sérica por el método de ELISA. Estos resultados son similares a los descritos por Service et al. (31) en los que identificaron a un mayor porcentaje de mosquitos con la detección de IgG y no albúmina sérica. En contraste, en el método de inmunodifusión para detectar antígeno humano resultó mejor determinar albúmina sérica, ya que un 96% de los mosquitos analizados eran positivos a las 24 horas después de la digestión, reduciendo el porcentaje de positividad a las 36 horas (42% positivos); para IgG estos porcentajes fueron de 16% a las 24 horas y 0% a las 36 horas. Sin embargo para antígeno bovino, el comportamiento fue diferente, para IgG un 76% de mosquitos fueron positivos a las 24 horas de digestión y un 32% a las 36 horas; para albúmina un 70% fue positivo a las 24 horas y 16% para las 36 ho-

ras. En este caso no resulta mejor detectar albúmina bovina. Esta variación puede deberse a que la concentración de proteína en los antisueros era de 1.4 mg/mL para el humano y de 130 mg/mL para el bovino.

La naturaleza de los reactivos a utilizarse en las técnicas de inmunodifusión y ELISA es de vital importancia. Usualmente estos procedimientos se aplican en laboratorios con facilidades adecuadas y, por lo general, los reactivos a utilizarse son adquiridos en casas comerciales distribuidoras de los mismos. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en la detección del antígeno sanguíneo con los antisueros a albúmina humana y bovina producidos y comerciales, se observó una variación en el método de ELISA, ya que el antisuero comercial a albúmina humana presentaba mucha coloración de fondo, inclusive cuando se utilizaba PBS como control negativo, lo que indica que ocurren ciertas reacciones no específicas. Esto puede deberse a un mal fraccionamiento de las gama-globulinas del antisuero. Sin embargo, en estudios posteriores puede recomendarse la aplicación de antisueros comerciales, pero habrá que tamizar varios lotes y de casas comerciales diferentes hasta encontrar el que de los resultados óptimos deseados. Asimismo, en este estudio se demostró que los métodos para identificación del índice de alimentación pueden llevarse a cabo en laboratorios sin mucha capacidad técnica, ya que los antisueros a utilizarse pueden prepararse con mucha facilidad y a un costo menor. Por lo tanto, para poder elegir un método y un antígeno dentro del mismo método debe considerarse varios factores como son los títulos de los antisueros, la preparación, fraccionamiento o purificación del antisuero y

la concentración de los posibles antígenos que se puedan detectar.

Si se observan los porcentajes de mosquitos identificados con alguno de los antígenos sanguíneos se obtiene consistentemente un mayor porcentaje de positivos por la técnica de ELISA. Más aun, si se analizara una muestra más grande de mosquitos esta diferencia se haría más significativa. De nuevo, lo que más interesa en términos prácticos es encontrar el método que pueda detectar más mosquitos con antígeno sanguíneo tanto humano como bovino, por lo que se decidió utilizar la detección de antígeno IgG. Este antígeno es bien específico y probablemente se obtengan menos reacciones cruzadas que si se utilizaran varias proteínas, como es el caso de albúmina sérica.

Analizando como se comporta la sensibilidad de las técnicas en muestras recolectadas del campo, para antígeno bovino se obtienen diferencias significativas para las localidades de Los Angeles y La Empalizada, pero para antígeno humano sólo se obtiene diferencia en la localidad de Los Chatos. Si se observan los resultados tanto para antígeno humano como para antígeno bovino se obtiene que el método de ELISA mostró una mejor sensibilidad en las tres localidades estudiadas. Para Los Angeles, se encontró un 99.8% de los mosquitos analizados como positivos con antígeno bovino. Los Angeles es una parcela que es zona ganadera, por lo que la proporción ganado a humano es mayor. El único mosquito que se encontró con antígeno humano era asociado, también tenía antígeno bovino. En Los Chatos se encontró un 98.43% de los mosquitos analizados como positivos con antígeno bovino. Los Chatos también es una zona ganadera y esto explica el alto porcentaje

de mosquitos con antígeno bovino. También se encontró un 11% de mosquitos positivos con antígeno humano, que puede explicarse por el hecho de que los criaderos quedan cerca de la aldea. El 11% representa 8 mosquitos de los 63 analizados con resultado positivo a antígeno humano, de esos 8 se encontró que todos eran ingestas mixtas por el método de ELISA, y por inmunodifusión sólo se detectaron 3 moscos con antígeno humano y 2 eran asociados. La Empalizada presentó 89% de mosquitos positivos con antígeno bovino y 0% con antígeno humano, por el método de ELISA. Comparando los resultados por localidades no se observa una diferencia cuando se emplea el método de ELISA, pero con el de inmunodifusión, La Empalizada difiere de las localidades de los Angeles y Los Chatos. La Empalizada no es una región ganadera, y el porcentaje de índice de alimentación determinado es menor, pero no significativo. Probablemente si se aumenta el tamaño de la muestra esta diferencia con las otras dos localidades sí sea significativa.

En estudios similares sobre el índice de alimentación de Anopheles albimanus en El Salvador, Breeland et al. (8) encontraron una diferencia significativa en el hospedero en el que se alimentaban los mosquitos de acuerdo al tipo de captura. Para mosquitos recolectados en las afueras de las casas (peridomiciliar) 87% fueron positivos para bovinos y 2% para humanos; en recolectas intradomiciliares se observó una relación inversa, en las que predominó la alimentación en humanos en un 44% de los mosquitos examinados, y sólo un 28% positivos para bovino. Sin embargo, los métodos utilizados (precipitación en tubo capilar) no son lo suficientemente sensibles y los autores no definieron las condiciones ecológicas (e.j, densidad de ganado bovino) de las localidades

en donde se hicieron las recolecciones de mosquitos. Por lo tanto, es peramos que con los resultados obtenidos de este estudio pueda determinarse con mayor confiabilidad el índice de alimentación humana de Anopheles albimanus en Guatemala, tomando en consideración el tipo de captura y las condiciones ecológicas de la comunidad. Esperamos que el método aquí desarrollado contribuya a las investigaciones futuras sobre el comportamiento del vector de la malaria en Guatemala y provea bases más sólidas, para estratificar las áreas maláricas del país y planificar intervenciones o controles más adecuados.

VI. CONCLUSIONES

- Se examinaron dos técnicas serológicas bien definidas para identificar hospederos de artrópodos vectores de enfermedades, mostrando que el método de ELISA es más sensible que el de inmunodifusión.
- Para elegir un antígeno adecuado se debe considerar la concentración del mismo en la muestra, qué tan específico sea, el título del suero, y tener una buena purificación de la fracción de IgG del antisuero.
- No se observaron diferencias entre los sueros producidos en el laboratorio y los adquiridos de fuente comercial. Con esto se obtiene un ahorro económico y por otra parte, una técnica establecida de inmunización para producir cualquier antisuero. Inclusive, es mejor preparar el antisuero en el laboratorio y así se tiene seguridad del fraccionamiento y purificación de la fracción IgG.
- No se puede establecer un tiempo de digestión máximo al cual se identifique el antígeno, pues éste no sólo depende del tiempo de digestión sino también de la cantidad de sangre que ingiere inicialmente el mosquito (que viene asociado al comportamiento del hospedero dependiendo si le permite alimentarse o no) y de la actividad que tenga cada mosquito después de la ingesta, pues de esto dependerá la velocidad de digestión del contenido abdominal.
- Existen diferencias en las proporciones de hospederos que puedan identificarse, dependiendo de cómo se haga la captura de mosqui-

tos (si es con cebo humano o trampa de luz) y de las cualidades serológicas que tenga la región de muestreo, como es la disponibilidad y proporción de hospederos diferentes.

CUADRO 2
REACCIONES SEROLOGICAS ENTRE SUERO DE CONEJO
ANTI-ALBUMINA BOVINA Y ALBUMINAS HETEROLOGAS

Albúmina Sérica de	Nitrogeno Precipitable del anticuerpo		Determinantes Albúmina bovina sérica			
	Microgramos	Por ciento	a	b	c	d
Res	2295	100	+	+	+	+
Oveja	1674	74	+	+	+	+
Cerdo	633	31	+	+	+	+
Gato	453	25				
Humano	323	14	+	+	-	-
Hamster	308	13	+	+	-	-
Rata	299	13	+	+	-	-
Perro	292	13	+	+	-	-
Caballo	290	13				
Ratón	231	10	+	+	-	-
Vallaroo	144	6				
Cuyo	124	5	+	-	-	-

Referencia 2

CUADRO 3FECHAS DE SANGRADOS E INMUNIZACIONESCONEJOS NUEVA ZELANDIA

INMUNIZACION		SANGRADO	
HUMANO	BOVINO	HUMANO	BOVINO
17-2-86	17-2-86	31-3-86	31-3-86
31-3-86	31-3-86	29-4-86	29-4-86
28-4-86	28-4-86	09-6-86	09-6-86
09-6-86	09-6-86	18-6-86	18-6-86
		24-6-86	03-7-86
		03-7-86	18-7-86
		11-7-86	28-7-86
		28-7-86	01-8-86
		08-8-86	08-8-86

CUADRO 4
VALORES DE DENSIDAD OPTICA A 280 nm DE LOS
ANTISUEROS PASADOS A TRAVES DE COLUMNA DE CROMATOGRAFIA

<u>TUBO #</u>	<u>HUMANO 1</u>	<u>HUMANO 2</u>	<u>BOVINO 1</u>	<u>BOVINO 2</u>
1	0.000 ± 0.001	0.011	0.000 ± 0.001	0.000
2	0.002 "	0.019	0.067 "	0.000
3	0.287 "	0.685	0.359 "	0.067
4	1.830 "	1.800	0.955 "	1.178
5	1.810 "	1.930	1.096 "	1.850
6	1.950 "	⊙ 2.000	1.344 "	1.940
7	1.630 "	⊙ 2.000	1.690 "	1.980
8	1.510 "	⊙ 2.000	1.178 "	⊙ 2.000
9	1.172 "	⊙ 2.000	0.888 "	1.970
10	1.017 "	⊙ 2.000	0.707 "	1.830
11	0.899 "	1.980	0.575 "	1.830
12	0.727 "	1.820	0.413 "	1.790
13	0.584 "	1.510	0.391 "	1.379
14	0.511 "	1.203	0.382 "	0.932
15	0.439 "	0.970	0.367 "	0.689
16	0.340 "	0.870	0.349 "	0.597
17	0.340 "	0.787	0.326 "	0.508
18	0.277 "	0.675	0.299 "	0.485
19	0.232 "	0.568	0.280 "	0.446
20	0.214 "	0.478	0.270 "	0.362

⊙ = valores superiores al indicado.

CUADRO 5DETERMINACION DEL TITULO DE LOS SANGRADOS
CONEJO INMUNIZADO CON ALBUMINA HUMNA

Fecha Sangrado	Título vrs. 2 μ g Albúmina humana	Título vrs. suero humano 1:16
31-3-86	1:4	1:4
29-4-86	1:8	1:8
9-6-86	1:8	1:8
18-6-86	1:8	1:8
24-6-86	1:8	1:8
3-7-86	1:8	1:8
11-7-86	1:8	1:8
28-7-86	1:8	1:8
8-8-86	1:8	1:8
"Pool" 31-3- al 8-8-86	1:8	1:8
Título antisuero comercial antisuero humano		1:2

CUADRO 6DETERMINACION DEL TITULO DE LOS SANGRADOS
CONEJO INMUNIZADO CON ALBUMINA BOVINA

Fecha Sangrado	Título vrs. 2 ⁴ / ₉ Albúmina bovina	Título vrs. suero fetal bovino 1:16
31-3-86	-. -	-. -
29-4-86	1:4	1:4
9-6-86	1:8	1:8
18-6-86	1:8	1:8
3-7-86	1:8	1:8
18-7-86	1:8	1:8
28-7-86	1:8	1:8
1-8-86	1:8	1:8
8-8-86	1:8	1:8
"Pool" 29-4 al 8-8-86	1:8	1:8
Título antisuero comercial antisuero bovino		1:4

CUADRO 7
DETERMINACION DEL VOLUMEN DE ELUCION DE LAS
IMPREGNACIONES EN PAPELES FILTROS

No. Placa	Volumen Elución <i>µl</i>	Concen. Anti- Suero	Mosquitos con Antígeno Humano		Mosquitos con Antígeno Bovino	
			Moscas Analizados H. P.	H. C.	Moscas Analizados B. P.	B. C.
1 (HP, HC, BP, BC)	50	1:2	20/20 *	20/20	20/20	20/20
2 (HP, HC, BP, BC)	50	1:4	20/20	-. -	20/20	-. -
3 (HP, HC, BP, BC)	100	1:2	20/20	20/20	20/20	20/20
4 (HP, HC, BP, BC)	100	1:4	20/20	-. -	20/20	-. -
5 (HP, HC, BP, BC)	250	1:2	20/20	20/20	20/20	20/20
6 (HP, HC, BP, BC)	250	1:4	20/20	-. -	20/20	-. -
7 (HP, HC, BP, BC)	500	1:2	13/20	13/20	15/20	15/20
8 (HP, HC, BP, BC)	500	1:4	13/20	-. -	15/20	-. -

Concen. = Concentración

HP = Anti-albúmina humana producida

HC = Anti-albúmina humana comercial

BP = Anti-albúmina bovina producida

BC = Anti-albúmina bovina comercial

* No. Mosquitos positivos/No. Mosquitos examinados.

CUADROS 8 Y 9

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA
LECTURAS ESPECTROFOTOMETRICAS DE LA CURVA DE
CALIBRACION VALORES PROMEDIOS EN DO

CUADRO 8

Tubo #	Concentración µg/ml	\overline{DO}
1	0	0.01
2	5	0.05
3	10	0.11
4	15	0.14
5	20	0.16
6	25	0.22
7	30	0.28
8	35	0.31
9	40	0.34
10	45	0.38
11	50	0.43

CUADRO 9

Tubo #	Concentración µg/ml	\overline{DO}
1	0	0.01
2	5	0.06
3	10	0.13
4	15	0.17
5	20	0.21
6	25	0.26
7	30	0.30
8	35	0.31
9	40	0.36
10	45	0.39
11	50	0.41

Curva de Regresión:

$$Y = 0.014 + 8.31 \times 10^{-3} X$$

$$r^2 = 0.995$$

$$Y = 0.038 + 8.04 \times 10^{-3} X$$

$$r^2 = 0.981$$

CUADRO 10

LECTURAS ESPECTROFOTOMETRICAS ANTISUEROS UTILIZADOS
Y CONCENTRACION DE PROTEINA

Proteína	DO	Concentración en $\mu\text{g}/\text{mL}$	Dilución	Concentración mg/mL
alb. H.P.	0.24	24.7	1/500	12.4
alb. H.C.	0.29	33.2	1/10000	332.1
alb. H. conj	0.24	25.5	1/500	12.7
IgG H.	0.06	2.7	1/500	1.4
IgG H. conj	0.29	33.2	1/1000	33.2
alb. B.P.	0.26	27.6	1/500	13.8
alb. B.C.	0.34	37.2	1/500	18.6
alb. B. conj	0.22	22.6	1/500	11.3
IgG B.	0.23	25.99	1/5000	130.0
IgG B. conj	0.23	24.3	1/500	12.1

alb. H.P. = albúmina humana producida
 alb. H.C. = albúmina humana comercial
 alb. H.conj = albúmina humana conjugada
 IgG H. = IgG humana
 IgG H. conj = IgG humana conjugada
 alb. B.P. = albúmina bovina producida
 alb. B.C. = albúmina bovina comercial
 alb. B. conj. = albúmina bovina conjugada
 IgG B. = IgG bovina
 IgG B. conj = IgG bovina conjugada

CUADRO 11CONCENTRACIONES ANTICUERPOS DE CAPTURA Y CONJUGADOS
PARA LA TECNICA DE ELISA

Antisuero A:	Concentración en $\mu\text{g/pocillo}$	Volumen de Sueros (μL)	Volumen de dilución (mL)
IgG humana	0.5	35	5
IgG humana conjugada	5	15	5
Albúmina humana producida	3	24	5
Albúmina humana conjugada	1	8	5
Albúmina humana comercial	1	3	50
Albúmina humana conjugada	1	8	5
IgG Bovina	1	2	10
IgG Bovina conjugada	0.25	2	5
Albúmina Bovina producida	1	8	5
Albúmina Bovina conjugada	5	45	5
Albúmina Bovina comercial	3	18	5
Albúmina Bovina conjugada	3	27	5

CUADRO 12

ANALISIS DE VARIANZA ANIDADOIgG HUMANA

Fuente de error	Grados de libertad	S.S.	M.S.	MS (E) F
Entre placas	2	0.2598	0.1299	28.27 *
Entre moscos	27	0.1241	0.0046	21.10 **
Error	90	0.0196	0.0002	
Total	119	0.4035		

ALBUMINA HUMANA PRODUCIDA

Entre Placas	2	0.0536	0.4594	20.79 *
Entre moscos	27	0.0348	0.00013	4.99 **
Error	90	0.0233	0.0003	
Total	119	0.1116		

ALBUMINA HUMANA COMERCIAL

Entre Placas	2	0.1338	0.0669	61.41 *
Entre Moscos	27	0.0294	0.0119	1.81 **
Error	90	0.0541	0.0006	
Total	119	0.2173		

Valores Críticos * F0.05 (2,27) 3.35
 ** F0.05 (27,90) 1.61

CUADRO 13

ANALISIS DE VARIANZA ANIDADOIgG BOVINO

Fuente de error	Grados de libertad	S.S.	M.S.	MS (E) F
Entre placas	2	0.2598	0.1299	28.27 *
Entre moscos	27	0.1241	0.0046	21.10 **
Error	90	0.0196	0.0002	
Total	119	0.4035		

ALBUMINA BOVINA PRODUCIDA

Entre placas	2	0.9188	0.4594	133.6 *
Entre moscos	27	0.0668	0.0034	8.77 **
Error	90	0.0254	0.0007	
Total	119	1.0785		

ALBUMINA BOVINA COMERCIAL

Entre placas	2	1.5158	0.7579	306.2 *
Entre moscos	27	0.0668	0.0025	8.77 **
Error	90	0.0254	0.0003	
Total	119	1.6080		

Valores Críticos * F0.05 (2,27) 3.35
 ** F0.05 (27,90) 1.61

CUADRO 14
VOLUMEN ELUCION TECNICA ELISA
PARA TIEMPOS DE DIGESTION

Volumen Elución	Tiempo Digestión	Mosquitos identificados con antígeno bovino		
		Mosquitos analizados		
		IgG B	Alb. Bov. P.	Alb. Bov. C
1000 <i>µl</i>	0	10/10	10/10	10/10
	12	10/10	10/10	10/10
	24	10/10	10/10	8/10
	36	10/10	10/10	10/10
	48	0/10	0/10	0/10
	60	3/10	1/10	1/10
	250 <i>µl</i>	0	10/10	10/10
12		10/10	10/10	10/10
24		10/10	10/10	10/10
36		10/10	10/10	10/10
48		3/10	1/10	1/10
60		4/10	2/10	1/10

CUADRO 15
VOLUMEN ELUCION TECNICA INMUNODIFUSION
PARA TIEMPOS DE DIGESTION

BOVINO

Horas Digestión	alb. B.P.		alb.B.C.		Suero B		IgG B	
	250 μ C	50 μ C	250 μ C	50 μ C	250 μ C	50 μ C	250 μ C	50 μ C
0	8/10	10/10	8/10	10/10	8/10	10/10	6/10	10/10
12	3/10	8/10	6/10	8/10	2/10	8/10	2/10	8/10
24	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10
36	4/10	7/10	6/10	7/10	2/10	5/10	0/10	7/10
48	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	0/10	1/10
60	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
%	27%	43%	35%	45%	22%	40%	13%	43%

CUADRO 16
VOLUMEN ELUCION TECNICA INMUNODIFUSION
PARA TIEMPOS DE DIGESTION
HUMANO 1

Horas Digestión	alb. H. P.		alb. H. C.		Suero H.		IgG H.	
	250 μ l	50 μ l	250 μ l	50 μ l	250 μ l	50 μ l	250 μ l	50 μ l
0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/10	10/10
12	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/10	7/10
24	8/10	9/10	8/10	9/10	8/10	9/10	0/10	4/10
36	0/10	1/10	0/10	1/10	0/10	1/10	0/10	0/10
48	1/10	2/10	1/10	2/10	1/10	2/10	0/10	0/10
60	1/10	2/10	1/10	2/10	1/10	2/10	0/10	0/10
%	50%	57%	50%	57%	80%	57%	0 %	35%

CUADRO 17
VOLUMEN ELUCION TECNICA INMUNODIFUSION
PARA TIEMPOS DE DIGESTION
HUMANO 2

Horas Digestion	alb. H.P.		alb. H.C.		Suero H.		IgGH	
	250 μ l	50 μ l	250 μ l	50 μ l	250 μ l	50 μ l	250 μ l	50 μ l
0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/10	10/10
12	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/10	10/10
24	8/10	9/10	8/10	9/10	8/10	9/10	0/10	3/10
36	1/10	1/10	1/10	2/10	1/10	1/10	0/10	0/10
48	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
60	0/10	1/10	0/10	1/10	0/10	1/10	0/10	1/10
%	48%	52%	48%	53%	48%	52%	0%	40%

CUADRO 18
RESULTADOS TIEMPOS DE DIGESTION
INMUNODIFUSION HUMANO

Tiempo Digestión	Mosquitos determinados con antígeno Humano																							
	IgG Humana						Albúmina H. Producida						Albúmina H. Comercial						Suero Humano					
	2.2	3.2	4.2	5.2	6.2	6.2	2.2	3.2	4.2	5.2	6.2	6.2	2.2	3.2	4.2	5.2	6.2	6.2	2.2	3.2	4.2	5.2	6.2	6.2
0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
12	7/10	10/10	3/10	5/10	7/10	7/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
24	4/10	3/10	0/10	0/10	1/10	1/10	9/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10
36	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	6/10	5/10	7/10	7/10	1/10	2/10	6/10	5/10	7/10	7/10	1/10	1/10	6/10	6/10	6/10	7/10
48	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10	0/10	3/10	2/10	2/10	2/10	0/10	0/10	3/10	2/10	2/10	2/10	0/10	0/10	0/10	3/10	2/10
60	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10

* Lote

CUADRO 19
RESULTADOS TIEMPOS DE DIGESTION
INMUNODIFUSION BOVINO

Tiempo Digestión	Mosquitos identificados con antígeno Bovino																			
	IgC Bovina									Mosquitos Analizados										
	2.2*	3.2	4.2	5.2	6.2	2.2	3.2	4.2	5.2	6.2	2.2	3.2	4.2	5.2	6.2	2.2	3.2	4.2	5.2	6.2
0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
12	8/10	10/10	10/10	10/10	10/10	8/10	10/10	10/10	10/10	10/10	8/10	10/10	10/10	10/10	10/10	8/10	10/10	10/10	10/10	10/10
24	0/10	10/10	10/10	10/10	8/10	0/10	10/10	8/10	9/10	8/10	0/10	10/10	8/10	9/10	8/10	0/10	10/10	8/10	9/10	7/10
36	7/10	0/10	2/10	2/10	5/10	7/10	0/10	0/10	1/10	0/10	7/10	0/10	0/10	1/10	0/10	5/10	0/10	0/10	0/10	1/10
48	1/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10	2/10	1/10	0/10	0/10	0/10	2/10	1/10	0/10	0/10	0/10	2/10
60	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

* Lote

CUADRO 20
RESULTADOS TIEMPOS DE DIGESTION
E LISA HUMANO

Tiempo Digestión	Mosquitos determinados con antígeno Humano																					
	IgG Humana					Albúmina H. Producida																
	2.1 *	3.1	4.1	5.1	6.1	2.1	3.1	4.1	5.1	6.1												
0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10		
12	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	
24	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
36	10/10	9/10	10/10	10/10	10/10	8/10	5/10	10/10	10/10	10/10	8/10	5/10	10/10	10/10	10/10	8/10	5/10	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10
48	10/10	5/10	10/10	10/10	10/10	7/10	2/10	10/10	10/10	10/10	7/10	2/10	10/10	10/10	10/10	7/10	2/10	5/10	5/10	6/10	6/10	7/10
60	10/10	4/10	10/10	10/10	10/10	8/10	2/10	5/10	3/10	5/10	8/10	2/10	5/10	3/10	5/10	6/10	2/10	0/10	2/10	2/10	2/10	0/10

* Lote

CUADRO 21
RESULTADOS TIEMPOS DE DIGESTION
ELISA BOVINO

Tiempo Digestión	Mosquitos Identificados con Antígeno Bovino												
	IgG Bovino						Mosquitos Analizados						
	2.1 *	3.1	4.1	5.1	6.1		2.1	3.1	4.1	5.1	6.1		
0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
12	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
24	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10		3/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
36	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10		10/10	8/10	10/10	7/10	3/10	10/10	5/10
48	4/10	2/10	2/10	5/10	4/10		2/10	1/10	1/10	0/10	3/10	2/10	2/10
60	1/10	1/10	4/10	3/10	2/10		0/10	1/10	1/10	1/10	1/10	0/10	1/10

* Lote

CUADRO 22

PORCENTAJE*DE MOSQUITOS IDENTIFICADOS CON ANTIGENO HUMANO

Horas de Digestión	IgG H		Albúmina Producida H		Albúmina Comercial H	
	1	2	1	2	1	2
0	100	100	100	100	100	100
12	65	100	100	100	100	100
24	16	100	96	98	96	98
36	0	98	40	86	42	84
48	0	90	14	78	14	54
60	0	88	6	46	4	20
Totales	29	96	59	85	60	76

* Lotes completos de 5 x 10 mosquitos/hora de digestión.

1 Inmunodifusión

2 ELISA

Resumen (Cuadros 18,20)

CUADRO 23

PORCENTAJE*DE MOSQUITOS IDENTIFICADOS CON ANTIGENO BOVINO

Horas de Digestión	IgG B		Albúmina B. P.		Albúmina B. C.	
	1	2	1	2	1	2
0	100	100	100	100	100	100
12	96	100	96	100	96	100
24	76	100	70	86	70	88
36	32	100	16	76	16	74
48	4	34	6	14	6	10
60	0	22	0	8	0	6
Totales	51	76	48	64	48	63

* Lotes completos de 5 x 10 mosquitos/hora de digestión

1 Inmunodifusión

2 ELISA

Resumen (Cuadros 19,21)

CUADRO 24

PORCENTAJE*DE MOSQUITOS DEL CAMPO
IDENTIFICADOS CON ANTIGENO BOVINO y/o HUMANO

Fuente de Alimentación	Los Angeles		Los Chatos		La Empalizada	
	1	2	1	2	1	2
Humano	0	3.2	6	13	0	0
Bovino	79	100	88	98	41	89
H + B	0	3.2	3	13	0	0
Ninguno	21	0	4	1.6	59	11

*N = 199, 63 por localidad

1= Inmunodifusión

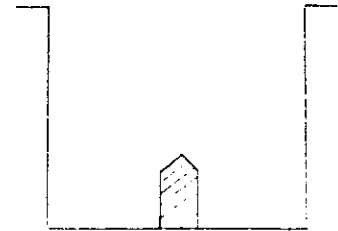
2= ELISA

FIGURA 1

METODO DE ELISA INDIRECTO

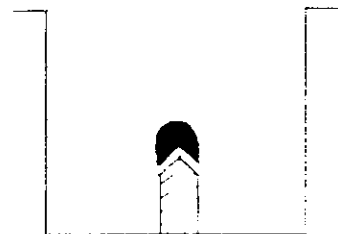
El principio del método de antiglobulina marcada con enzima para medir anticuerpos.

1. Antígeno adsorbido al plato



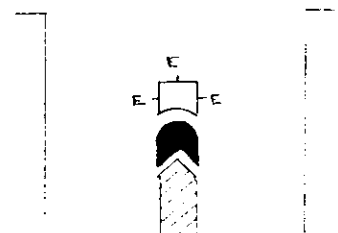
Lavado

2. Adición de suero. Cualquier anticuerpo se adhiere al antígeno



Lavado

3. Adición de antiglobulina marcada con enzima que se une al anticuerpo



Lavado

4. Adición de Substrato

Substrato degradado = cantidad de anticuerpo presente.

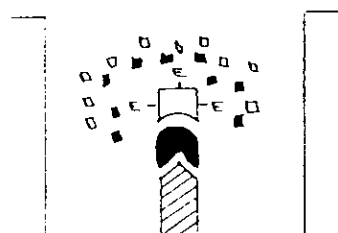


FIGURA 2

METODO DE ELISA INDIRECTO DE CAPTURA

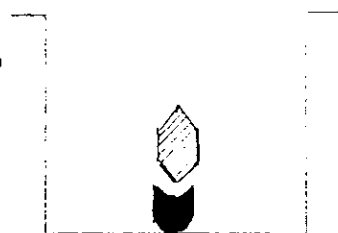
El principio del método de doble anticuerpo para medir antígenos

1. Anticuerpo adsorbido al plato



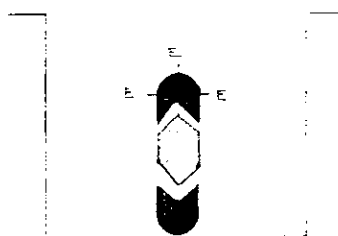
Lavado

2. Solución de prueba conteniendo antígeno añadido



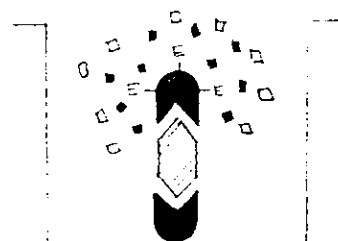
Lavado

3. Adición de anticuerpo específico marcado con enzima.



Lavado

4. Adición de sustrato de enzima



Substrato degradado =

Cantidad de antígeno presente.

FIGURA 3

PATRON DE PLACA DE INMUNODIFUSION

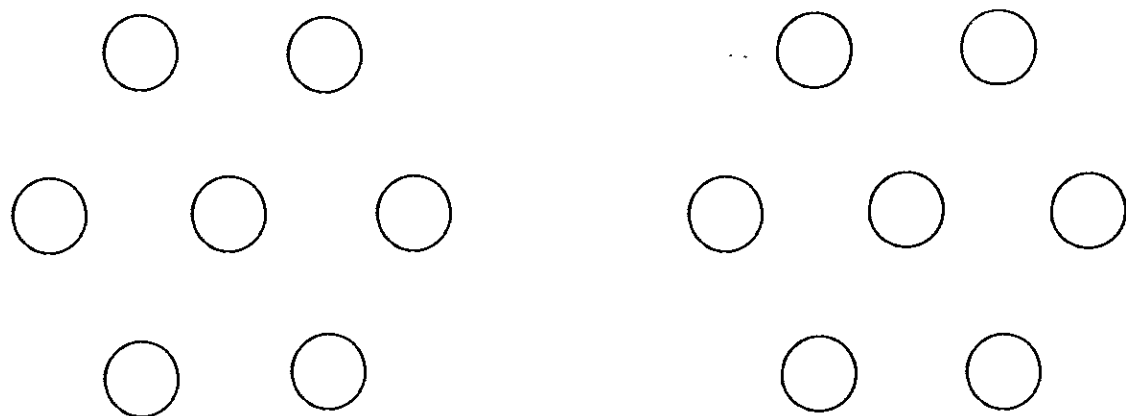
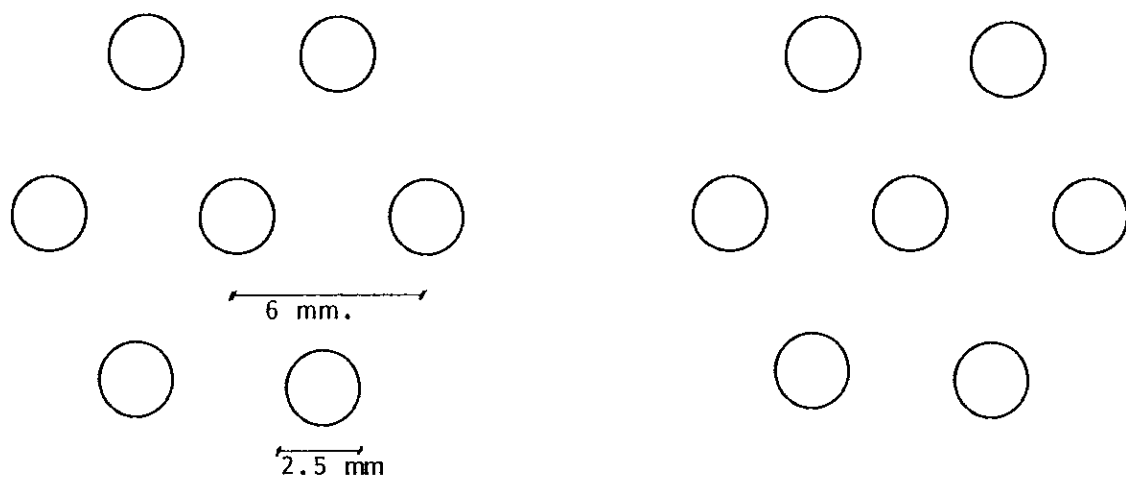
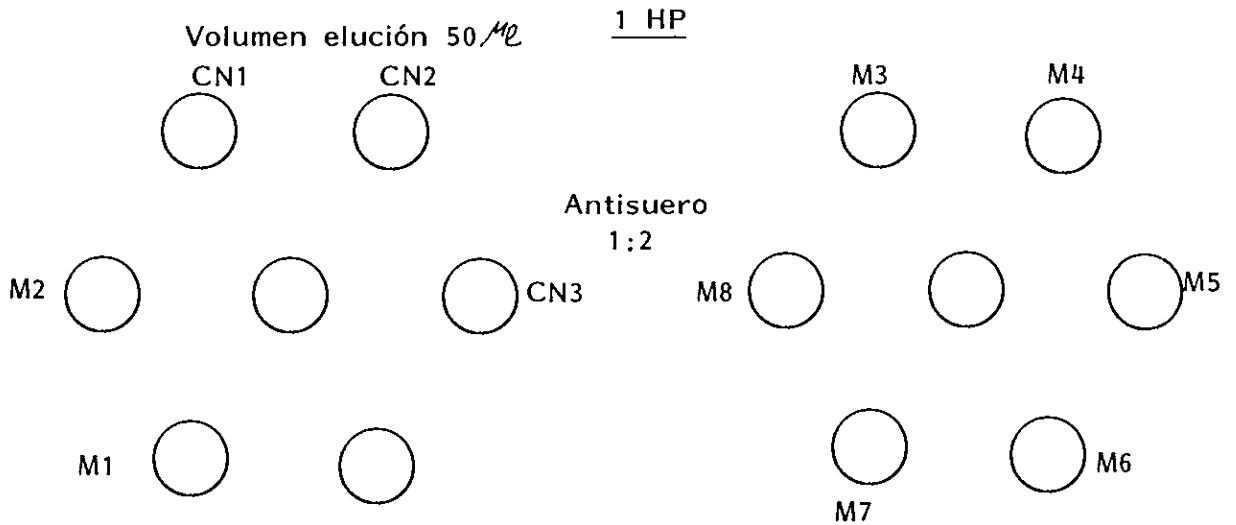


FIGURA 4

VOLUMEN DE ELUCION Y CONCENTRACION DE ANTISUERO



- CN1 = Moscos no alimentados
- CN2 = Moscos alimentados en cuyo
- CN3 = Moscos alimentados con bovino o humano
- M = Muestra

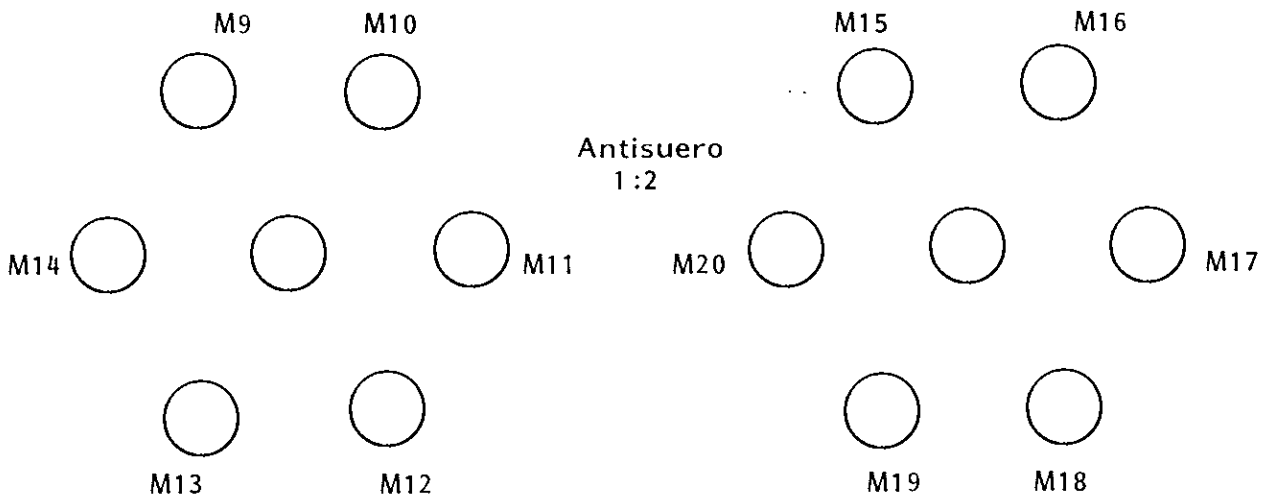


FIGURA 5

**DETERMINACION CONCENTRACIONES OPTIMAS DE ANTICUERPO
DE CAPTURA, CONJUGADO Y VOLUMEN DE ELUCION**

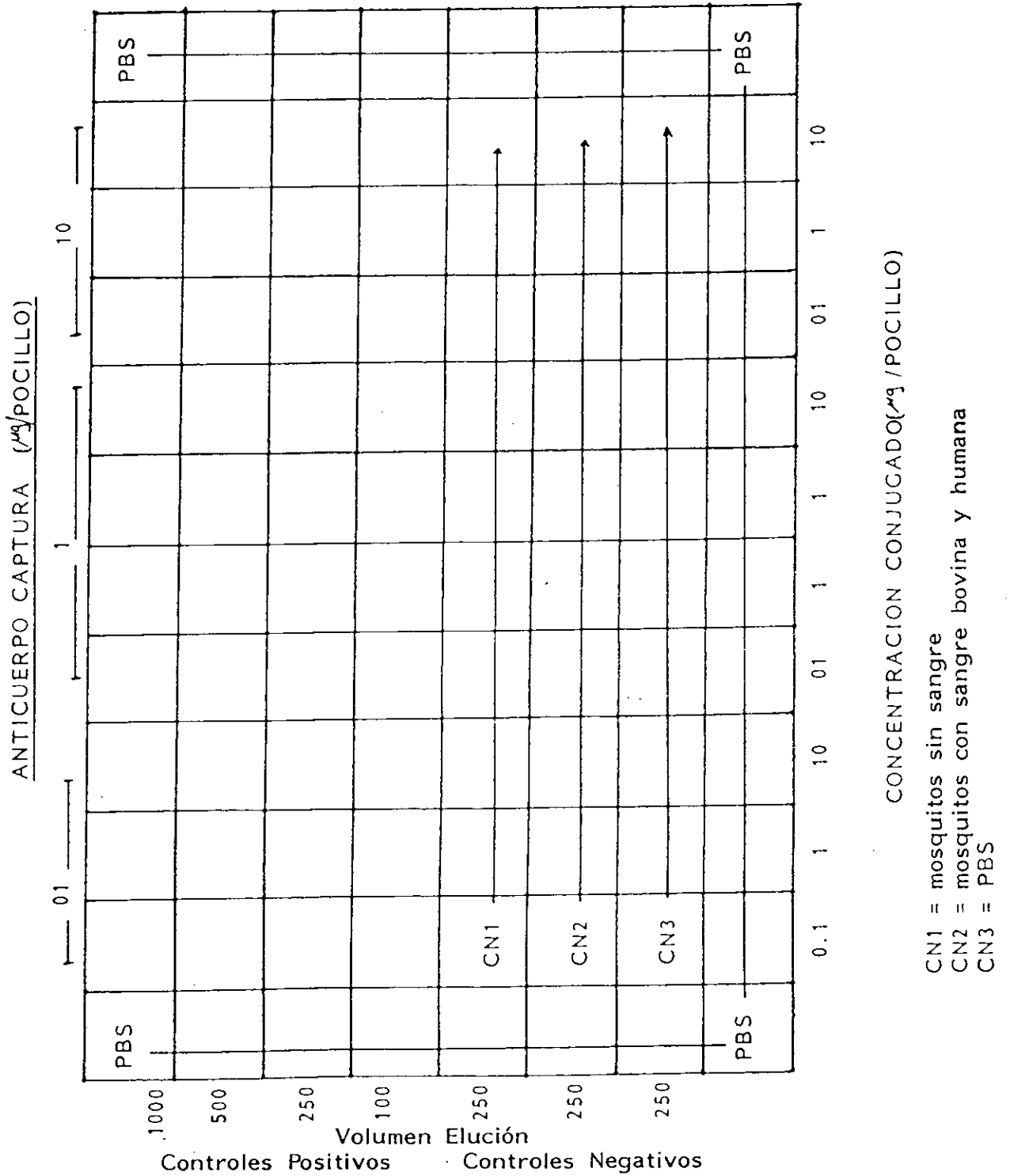
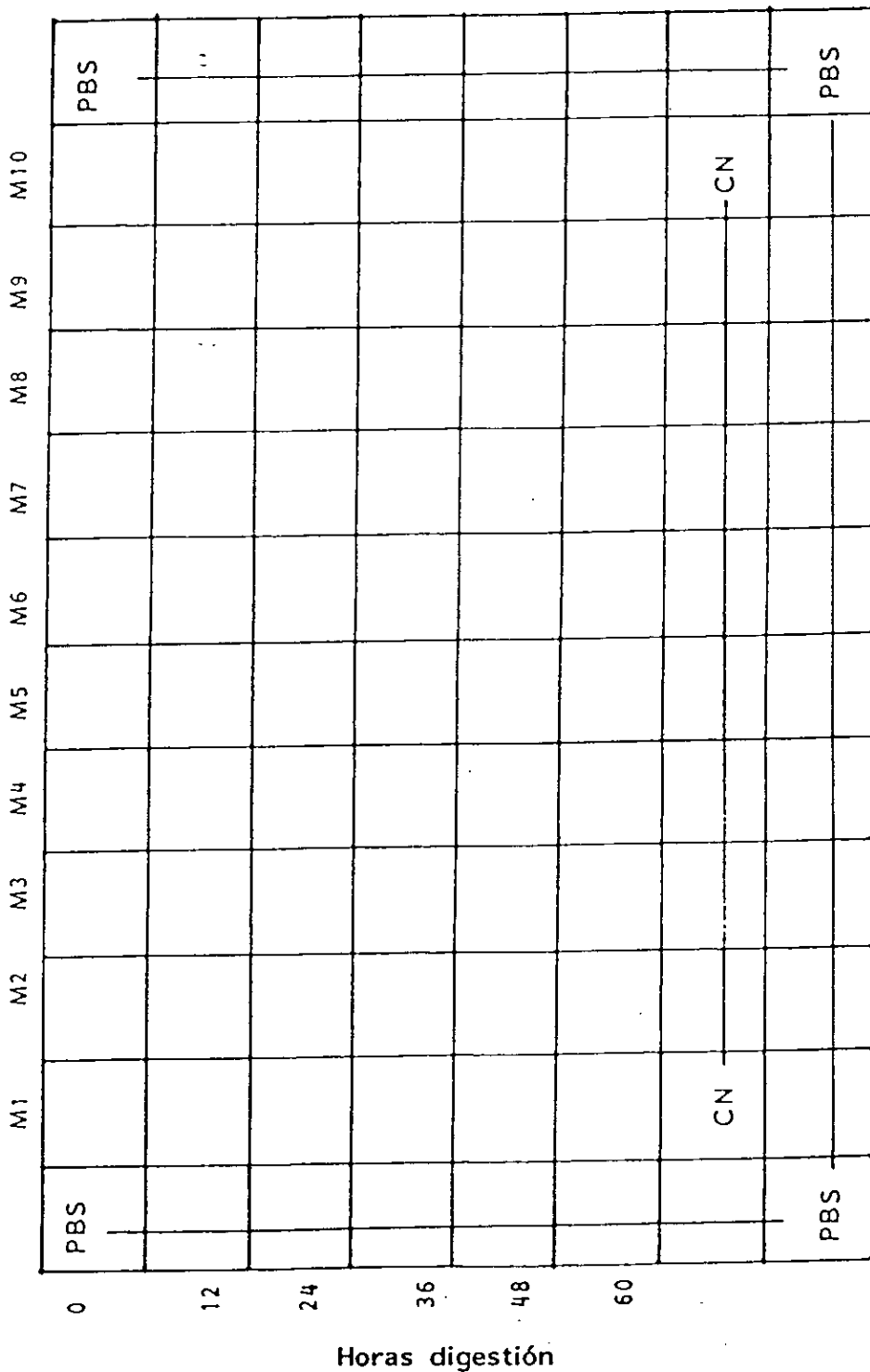


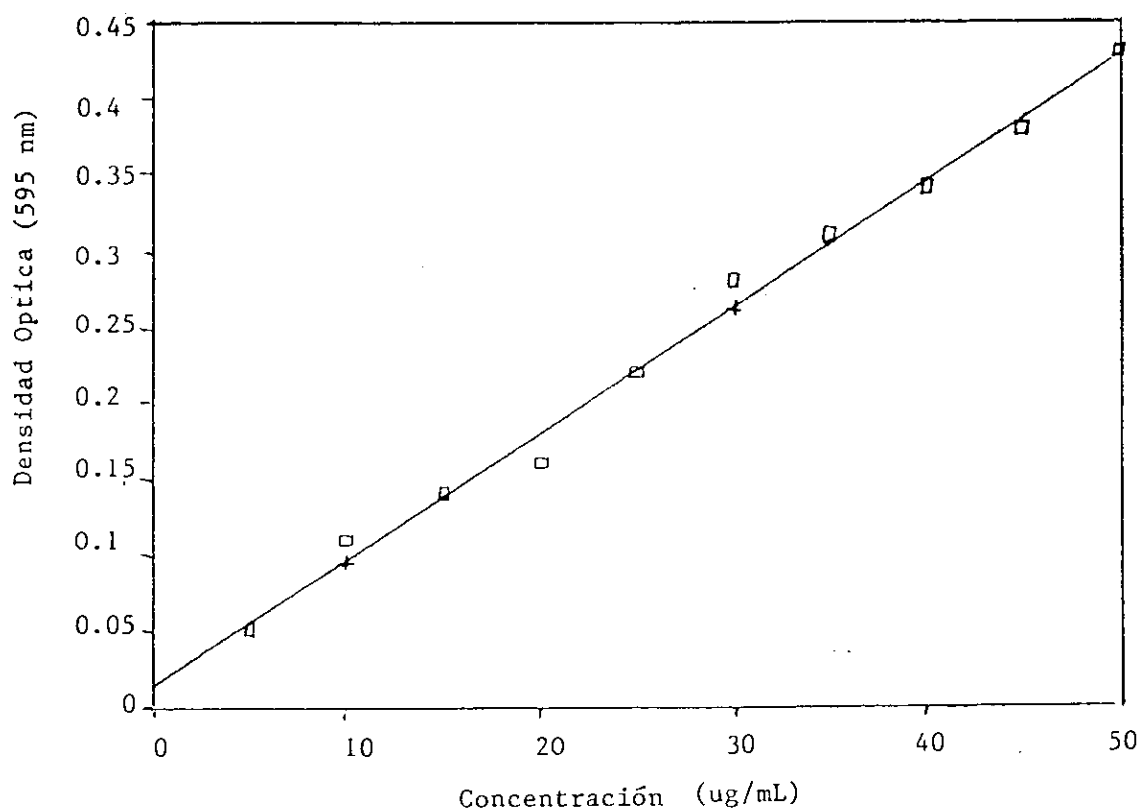
FIGURA 7
ENSAYO DE TIEMPOS DE DIGESTION



M = Muestra
CN = control negativo
PBS = solución tamponada de fosfatos.

GRAFICA 1

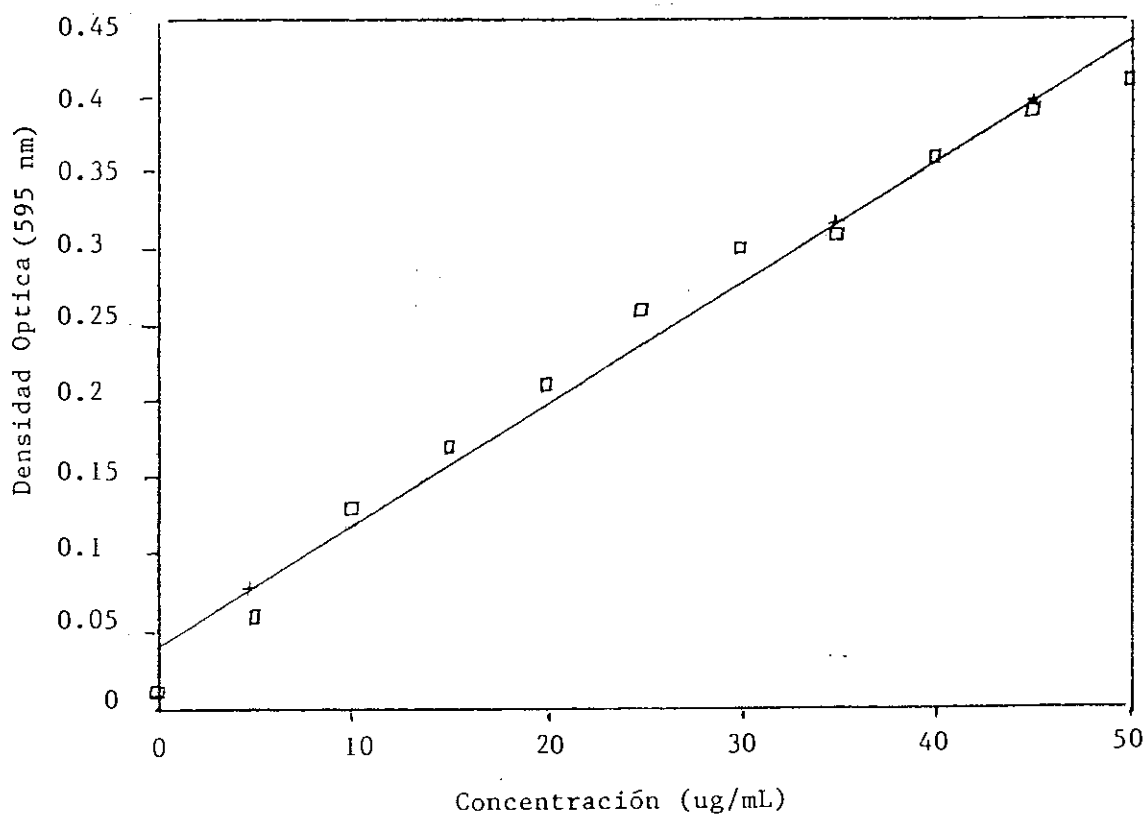
-- DETERMINACION DE CONCENTRACION DE PROTEINA*



*Método de Bradford (Bio - Rad) utilizando gama globulina bovina como proteína de referencia.

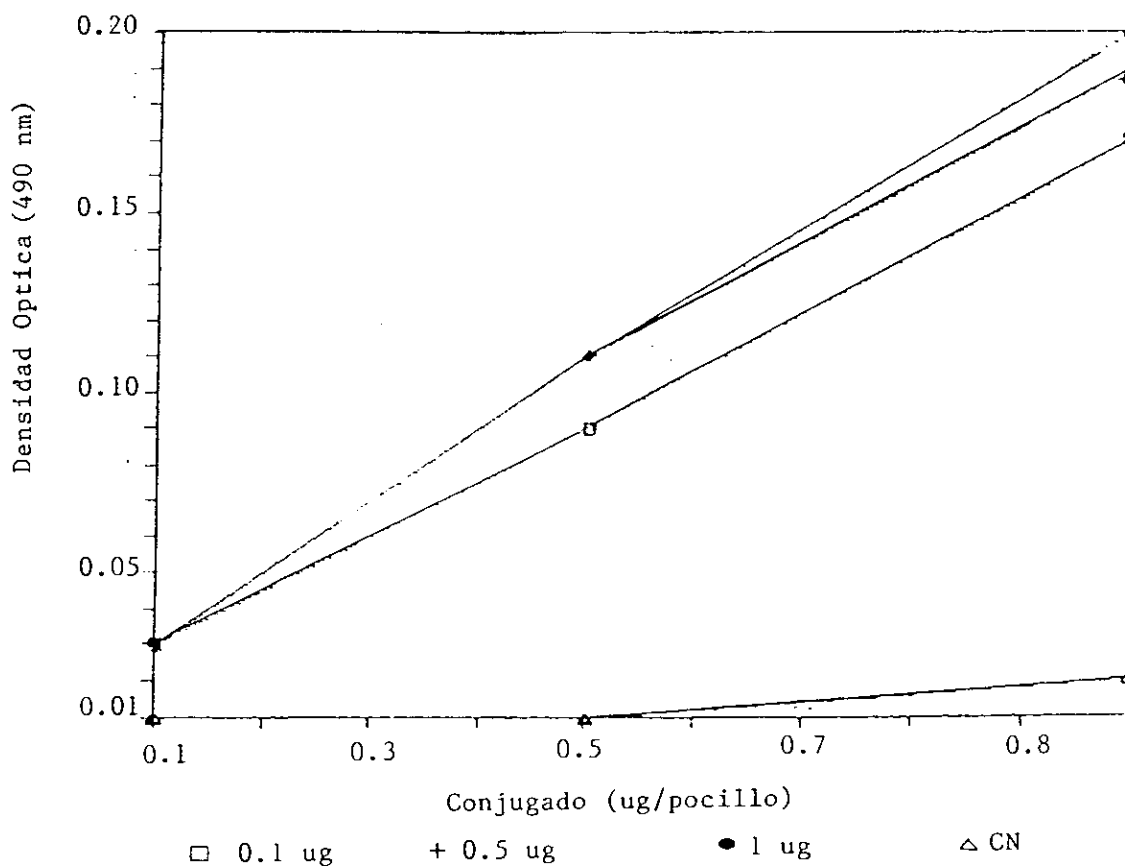
GRAFICA 2

DETERMINACION DE CONCENTRACION DE PROTEINA *

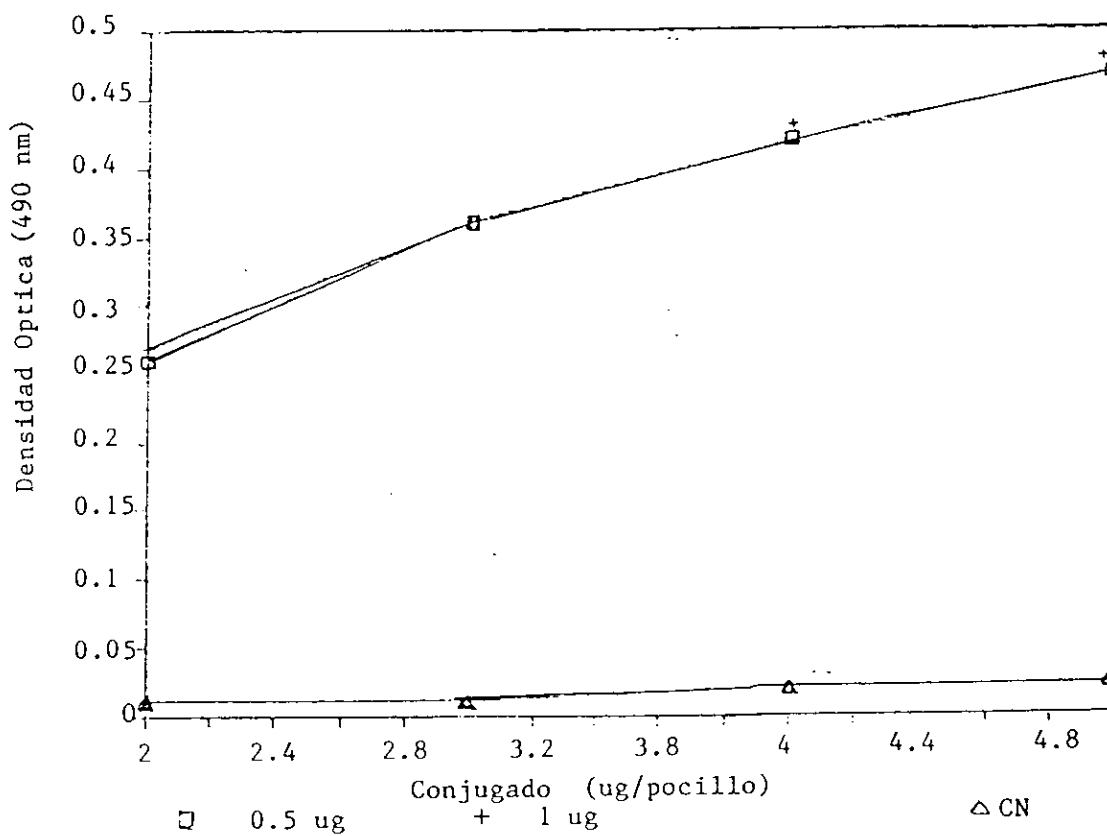


*Método de Bradford (Bio - Rad) utilizando gama globulina bovina como proteína de referencia.

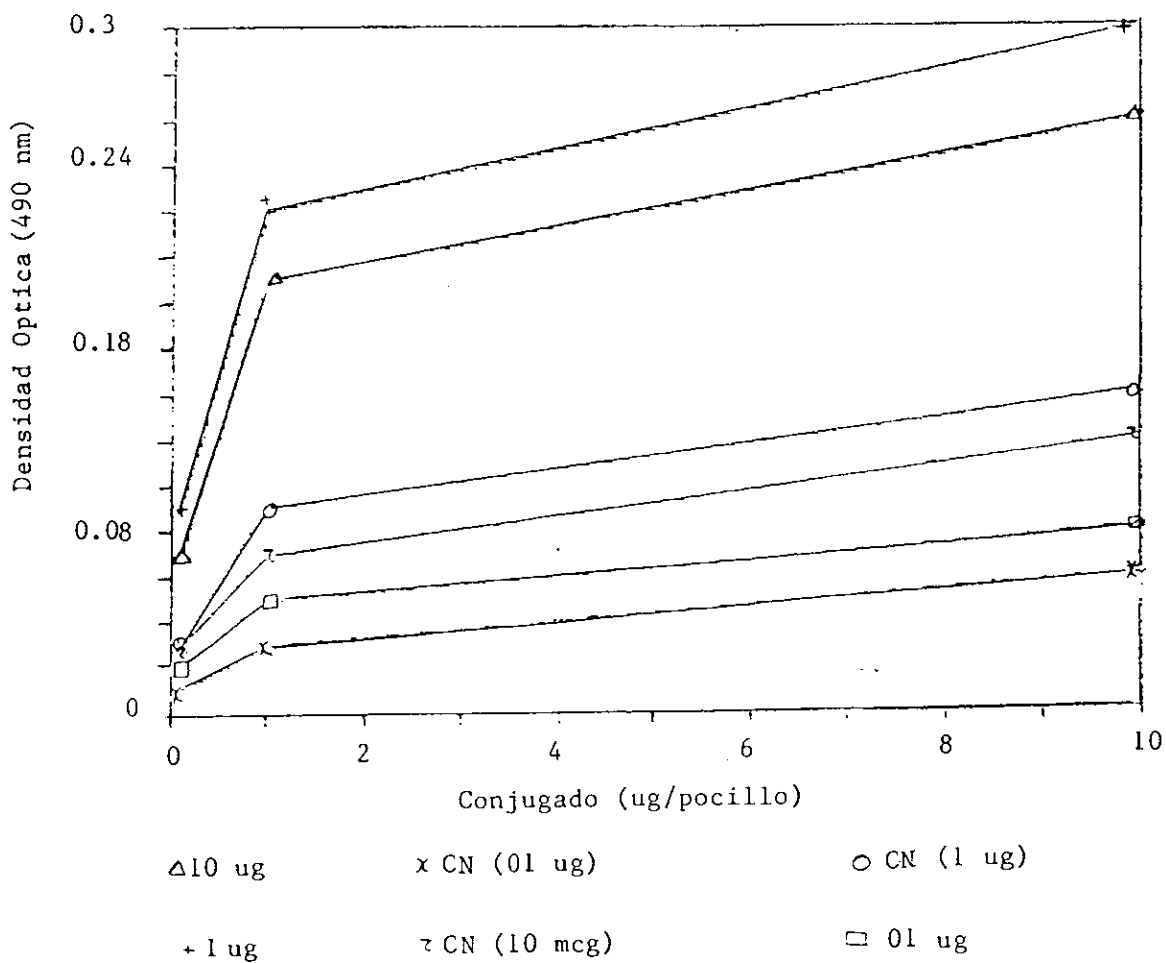
GRAFICA 3.1
ANTI-IgG HUMANA



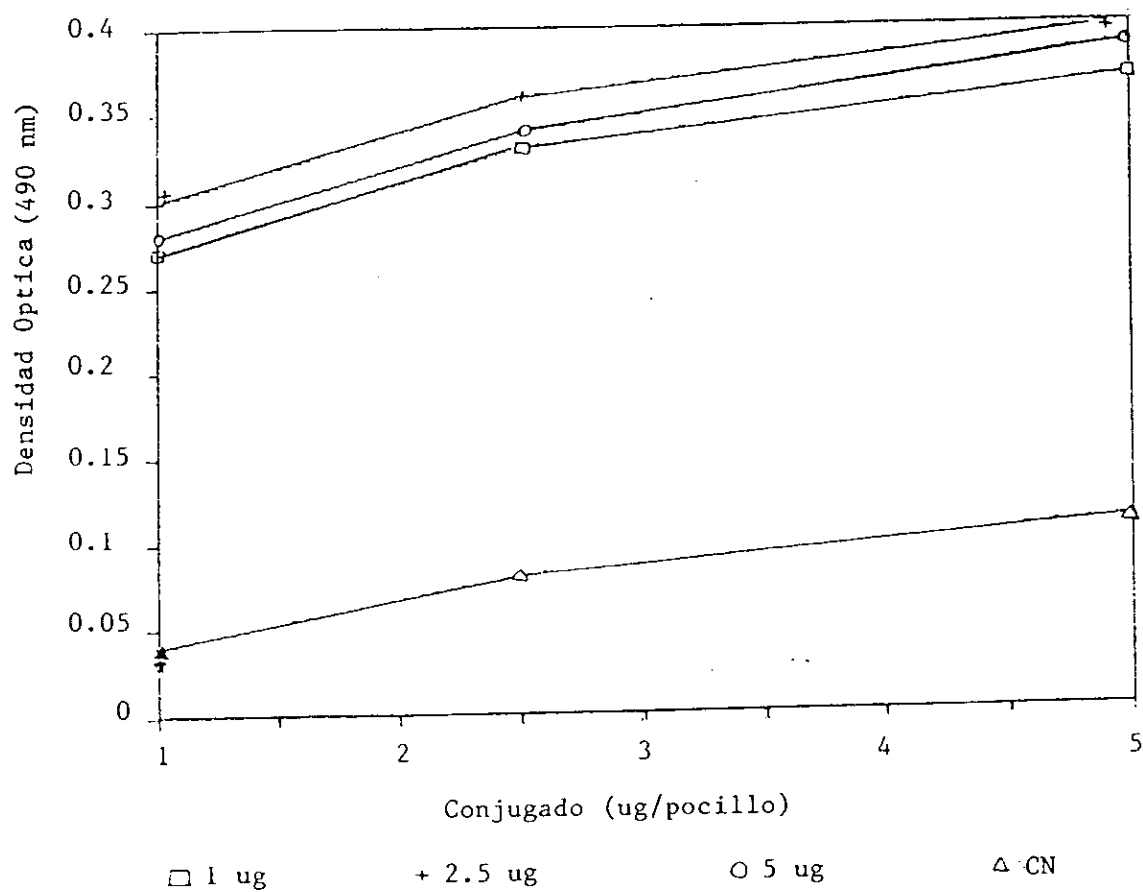
GRAFICA 3.2
ANTI-IgG HUMANA



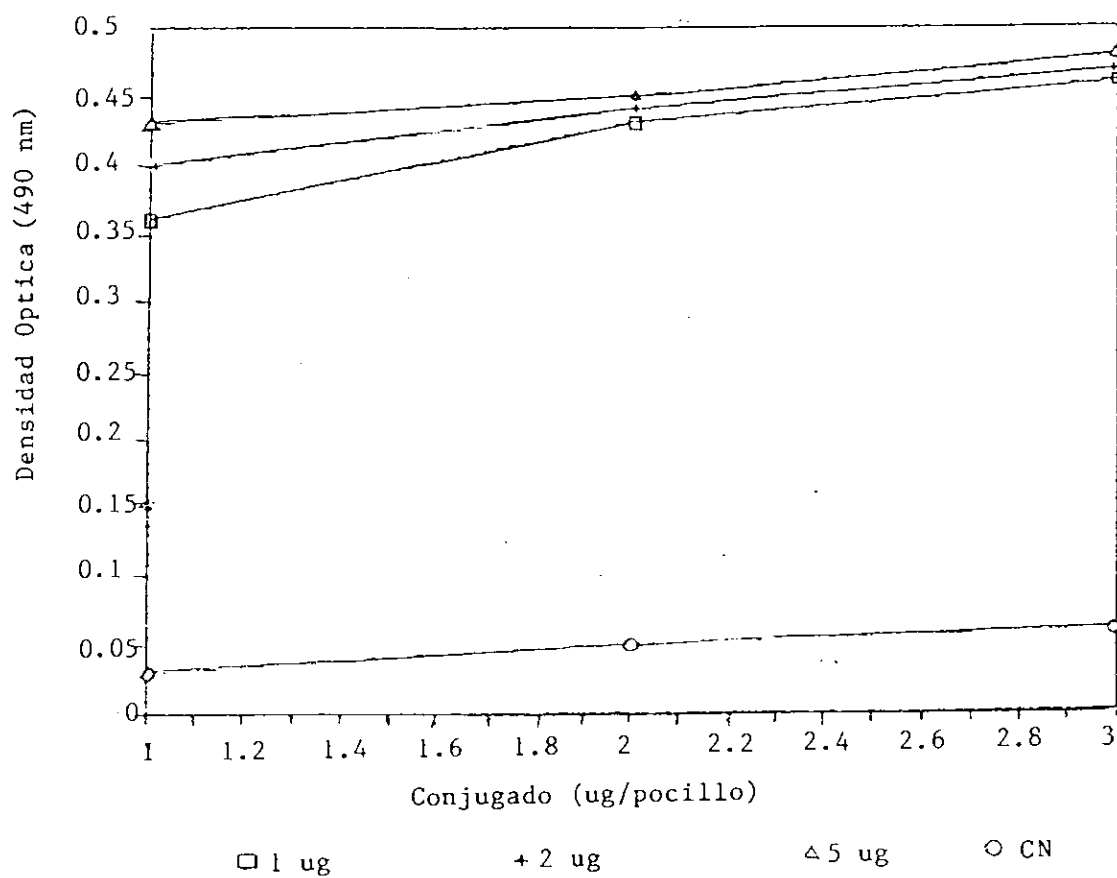
GRAFICA 4.1
ANTI-ALBUMINA HUMANA PRODUCIDA



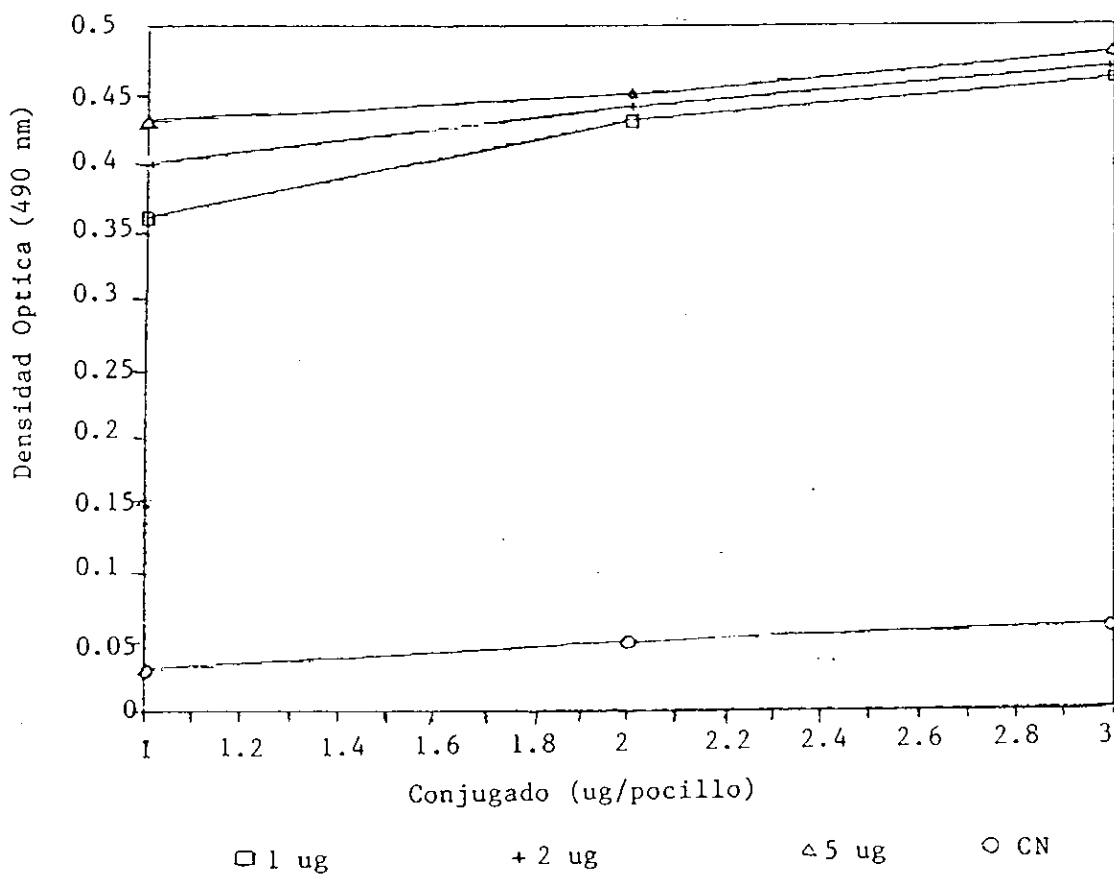
GRAFICA 4.2
ANTI-ALBUMINA HUMANA PRODUCIDA



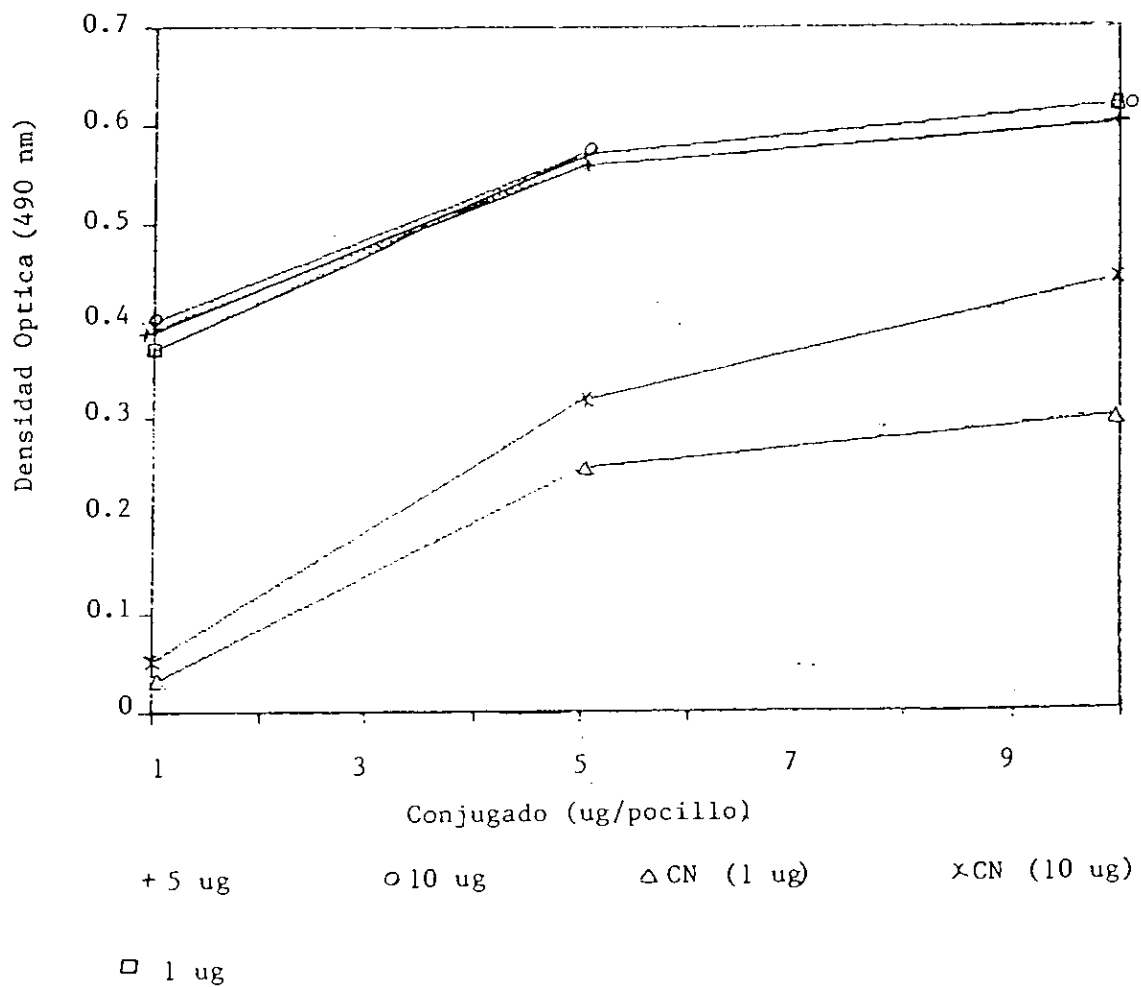
GRAFICA 4.3
ANTI-ALBUMINA HUMANA PRODUCIDA



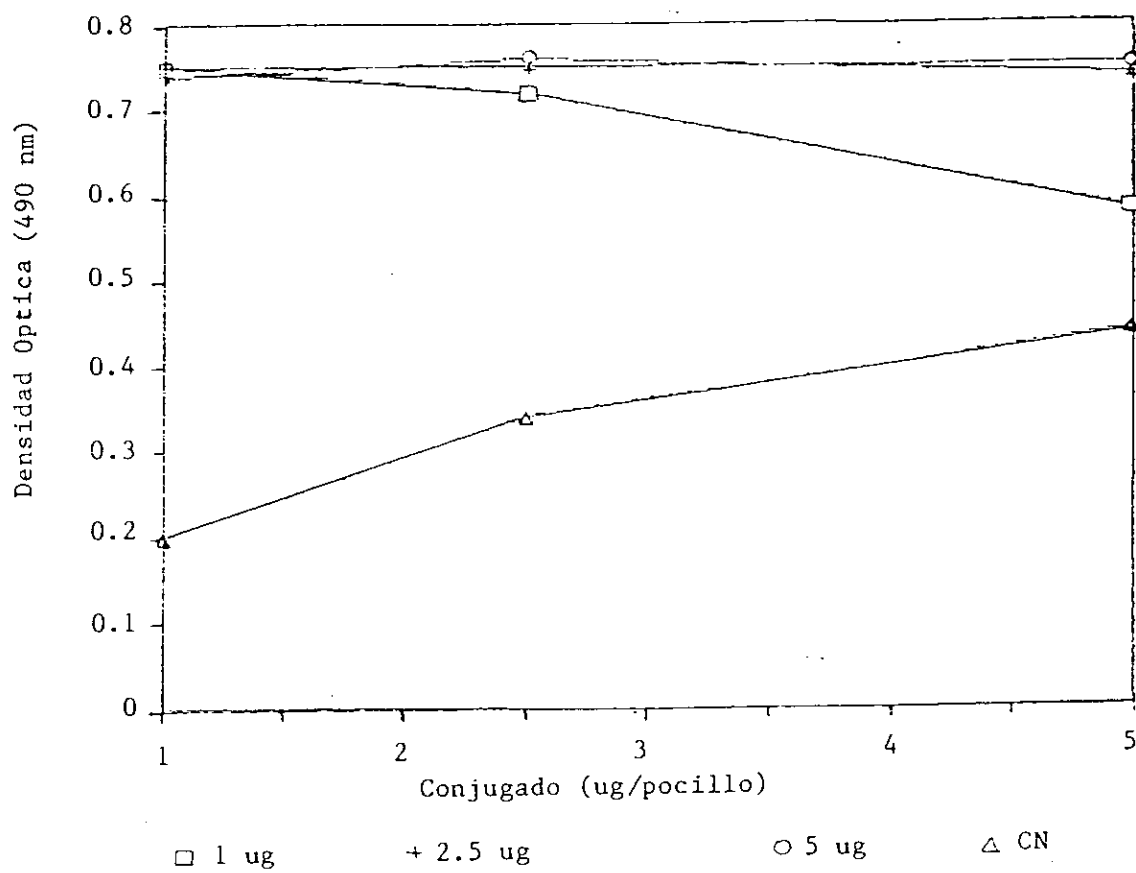
GRAFICA 4.3
ANTI-ALBUMINA HUMANA PRODUCIDA



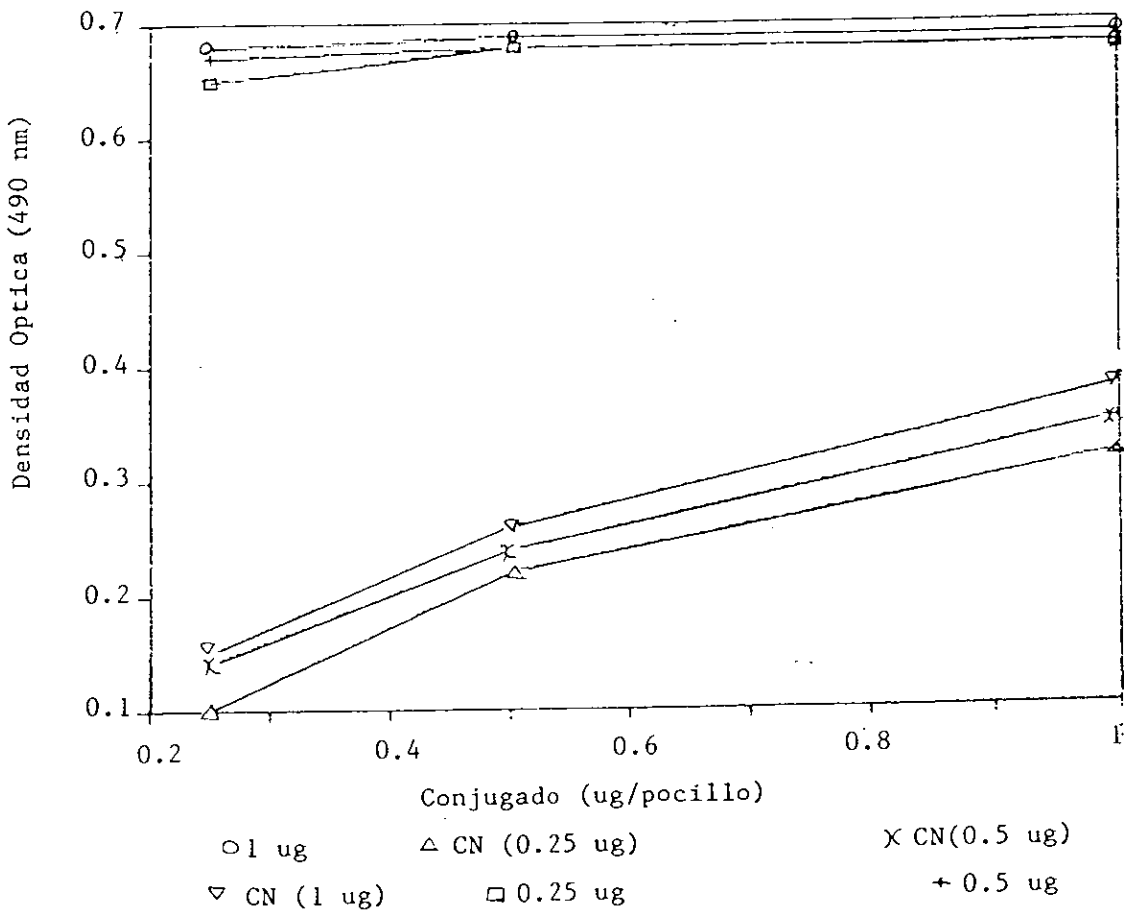
GRAFICA 5.1
ANTI-ALBUMINA HUMANA COMERCIAL



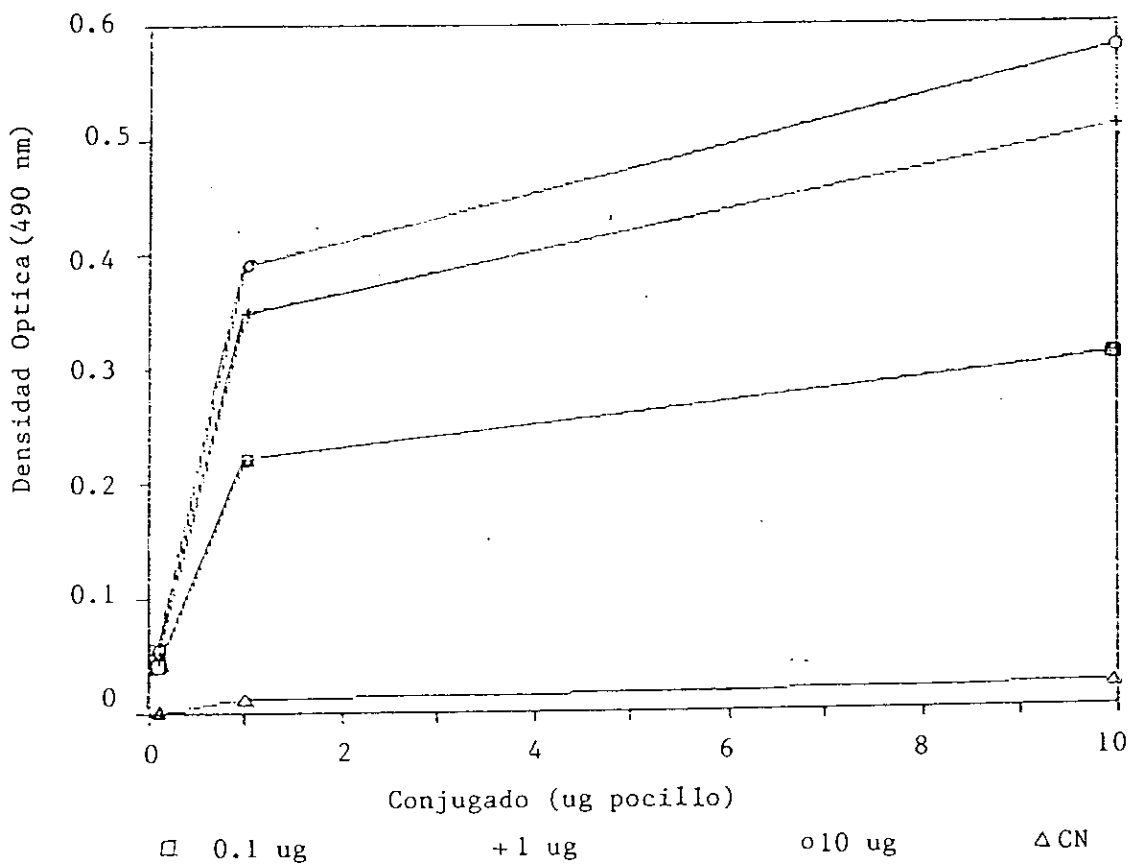
GRAFICA 6.1
ANTI-IgG BOVINA



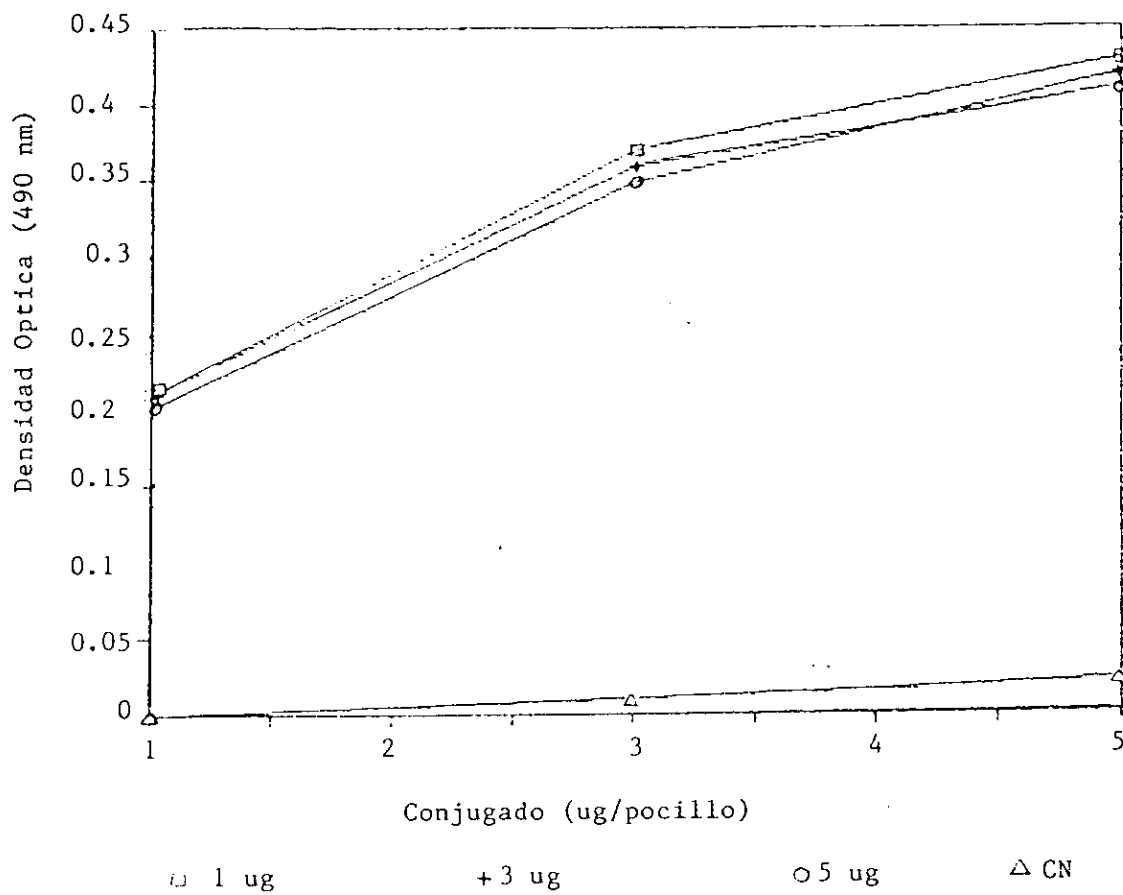
GRAFICA 6.2
ANTI-IgG BOVINA



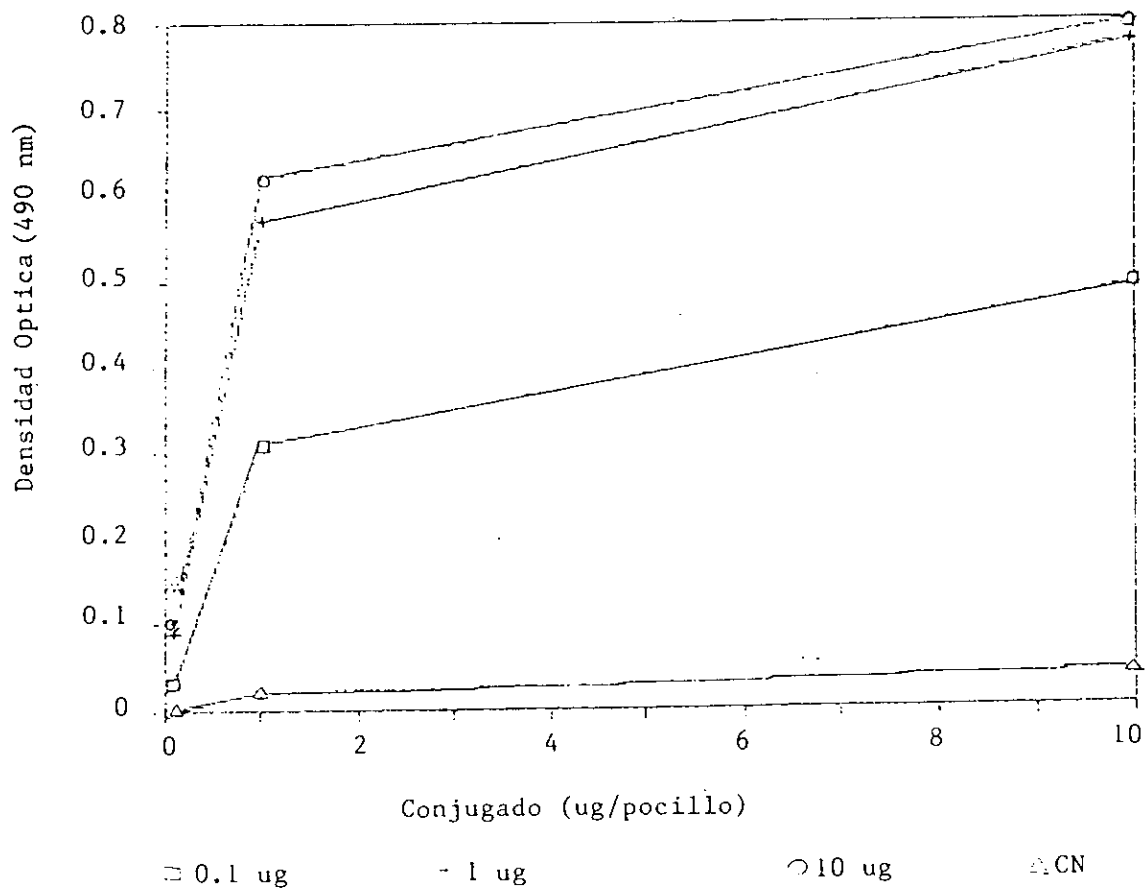
GRAFICA 7.1
ANTI-ALBUMINA BOVINA PRODUCIDA



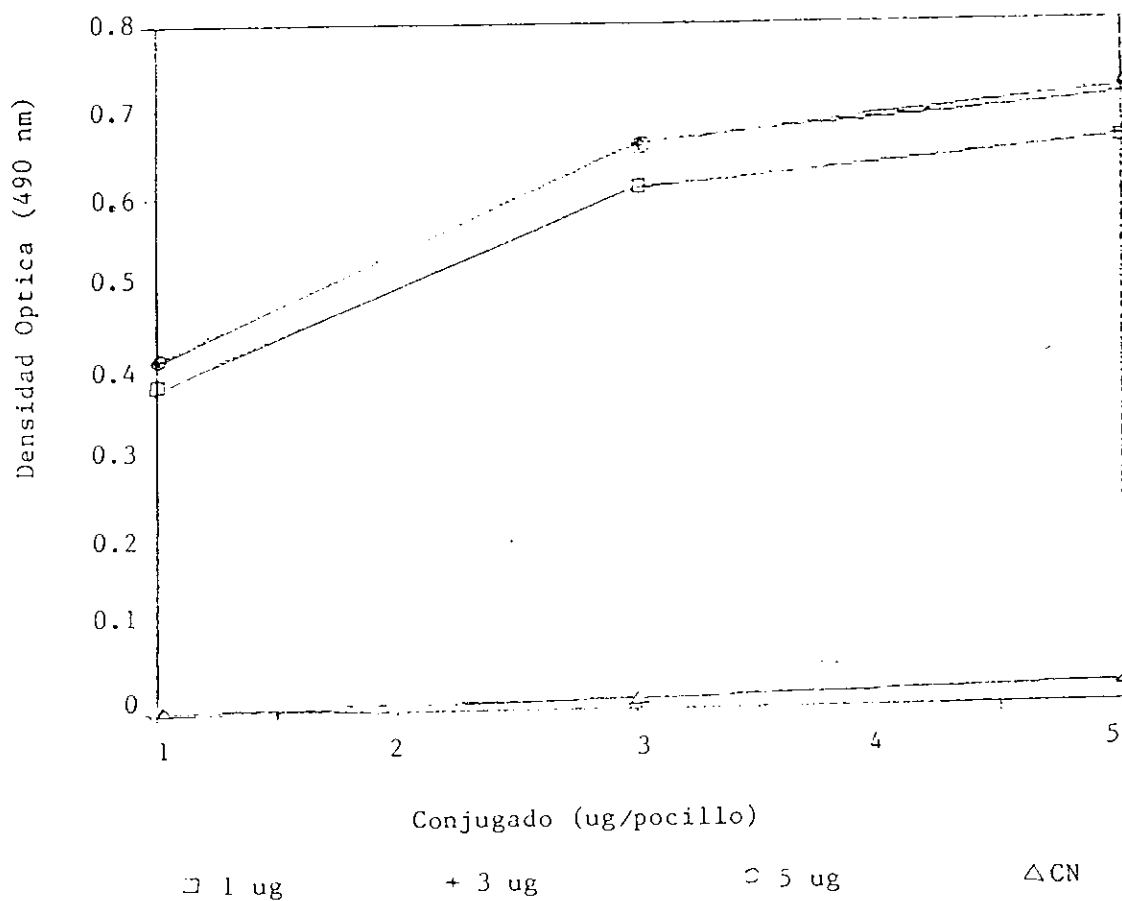
GRAFICA 7.2
ANTI-ALBUMINA BOVINA PRODUCIDA



GRAFICA 8.1
ANTI-ALBUMINA BOVINA COMERCIAL

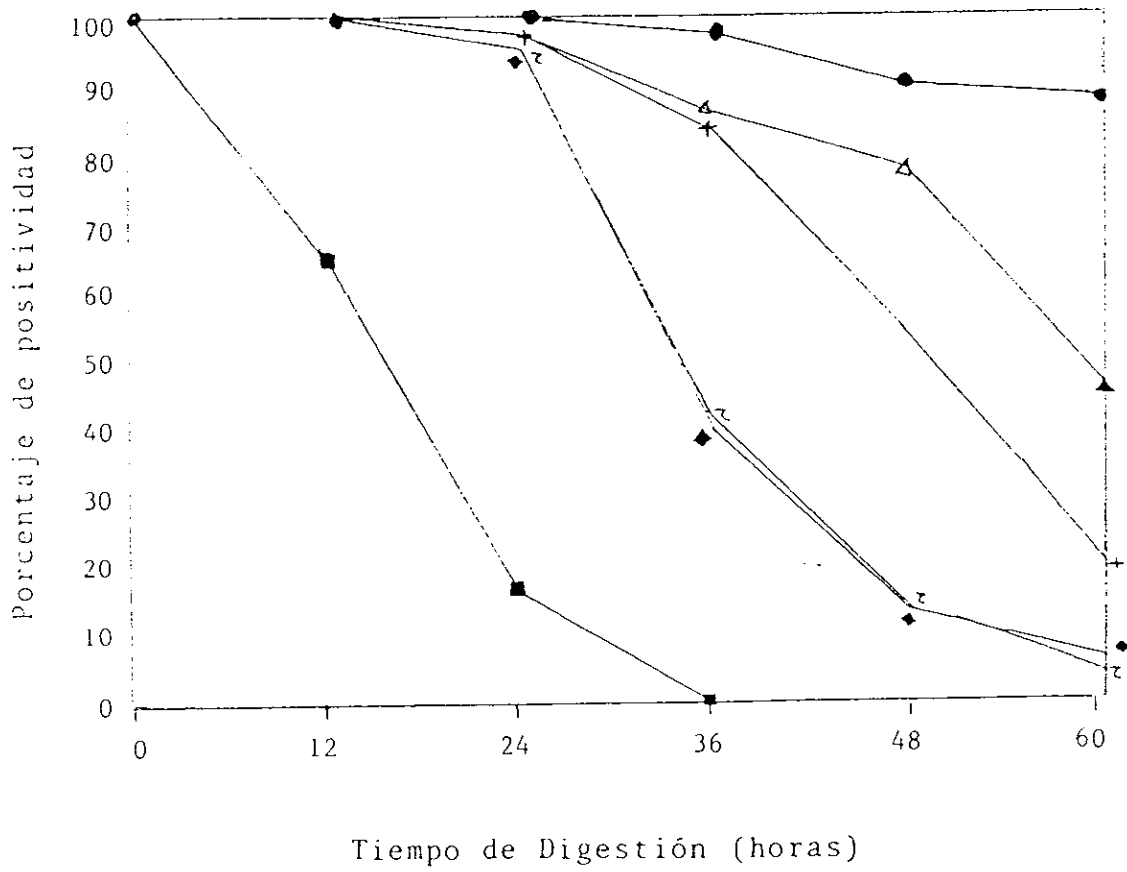


GRAFICA 8.2
ANTI-ALBUMINA BOVINA COMERCIAL



GRAFICA 9

PORCENTAJE DE MOSQUITOS IDENTIFICADOS
CON ANTIGENO HUMANO



■ IgGH I.

● IgGH E.

◆ AlbHP I

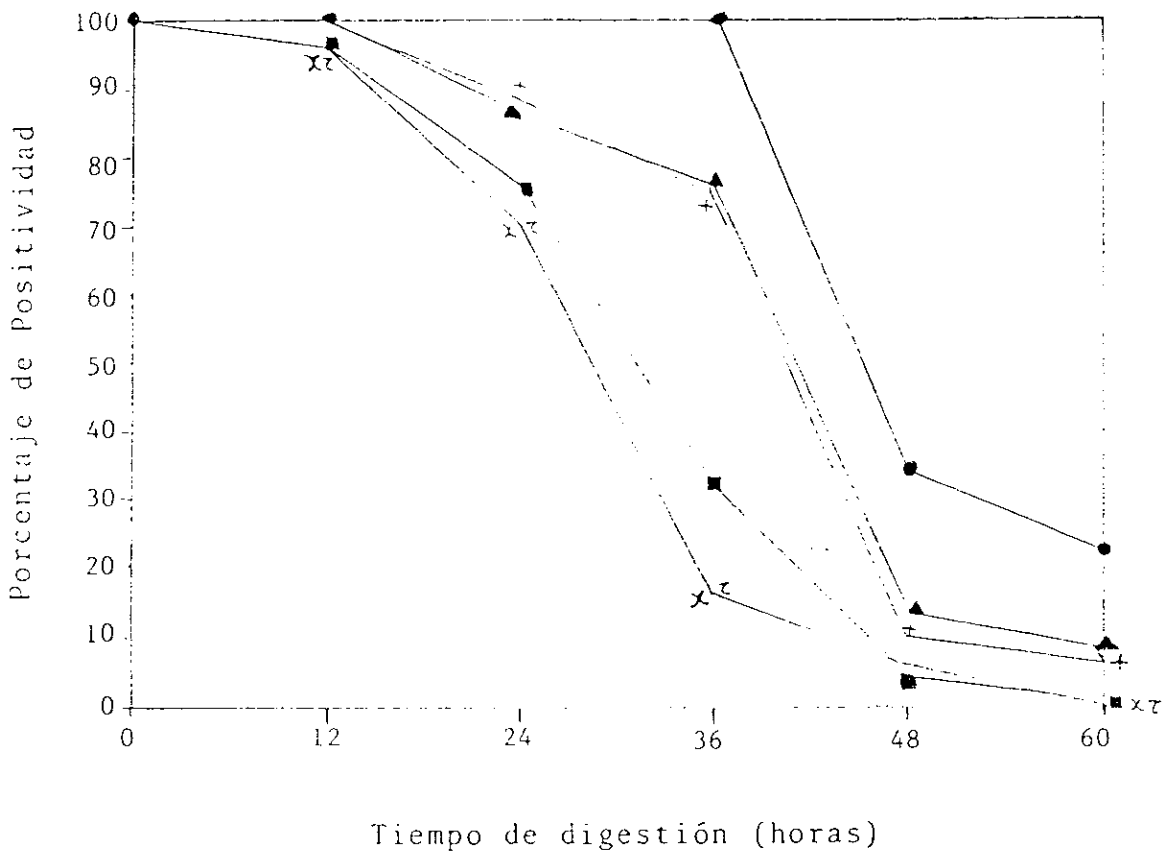
▲ AlbHP E.

▽ AlbHC I

+ AlbHC E.

GRAFICA 10

PORCENTAJE DE MOSQUITOS IDENTIFICADOS
CON ANTIGENO BOVINO



■ IgGB I.

● IgGB E.

x AlbBP I.

▲ AlbBP E.

z Alb BC I.

+ AlbBC E.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Córdoba-Alva, F., S. Estrada-Parra. 1977. Fundamentos de Inmunología é Inmunoquímica. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. 2a. Ed. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, D.C. pp 11-17
- 2) Campbell, D.H., J.S. Carvey, N.E. Cremer, D.H. Sussdorf. 1964. Methods in Immunology. W.A. Benjamin, Inc. New York pp. 45-50.
- 3) Carpenter Philip L. 1965. Immunology and Serology. 2a. Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. pp 23-30
- 4) Bruce-Chwatt, L.J., Garret-Jones, B. Weitz, 1966. Ten years study of host selection by anopheline mosquitoes. Bulletin of the World Health Organization. 35: 405-439.
- 5) Weitz, B. 1956. Identification of blood meals of blood-sucking arthropods. Bulletin of the World Health Organization. 15: 473-490.
- 6) Boreham, P.F.L., C. Garrett-Jones. 1973. Prevalence of Mixed blood meals and double feeding in a malaria vector (A. sacharovi). Bulletin of the World Health Organization. 48: 605-614.
- 7) Boreham, P.F.L. 1975. Some applications of bloodmeal identifications in relation to the epidemiology of vector-borne tropical diseases. Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 78: 83-91.
- 8) Breeland, S.G. 1972. Studies on the ecology of Anopheles albimanus. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 21: 751-754.
- 9) Edman J.D., D.T. Taylor. 1968. Culex nigripalpus: seasonal shift in the bird-manual feeding ratio in a mosquito vector of human encephalitis. Science. 161: 67-72.
- 10) Bray, R.S., G.S. Gill, R. Killick-Kendrick. 1984. Current and possible future techniques for the identification of blood meals of vector haematophagous arthropods. WHO/VBC/84. 905/WHO/MAL/84. 1013. pp 1-5.
- 11) Service, M.W. 1970. A battery-operated light trap for sampling mosquito populations. Bulletin of the World Health Organization. 43: 635-641.

- 12) Garret-Jones, C. 1964. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bulletin of the World Health Organization*. 30: 241-261.
- 13) Eliot, R. 1968. Studies on man-vector contact in some malarious areas in Colombia. *Bulletin of the World Health Organization*. 38: 239-253.
- 14) Molineaux, L., K. Dietz, A. Thomas. 1978. Further epidemiological evaluation of a malaria model. *Bulletin of the World Health Organization*. 56: 565-571.
- 15) Nájera, J.A. 1974. A critical review of the field application of a mathematical model of malaria eradication. *Bulletin of the World Health Organization*. 50: 449-457.
- 16) Dietz, K., L. Molineaux, A. Thomas. 1974. A malaria model tested in the African savannah. *Bulletin of the World Health Organization*. 50: 347-357.
- 17) Downe, A.E.R., P.E. Morrison. 1957. Identification of blood meals of blackflies (diptera: simuliidae) attacking farm animals. *Mosquito News*. 17:37-40.
- 18) Garret-Jones, C., G.R. Shidrawi. 1969. Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*. *Bulletin of the World Health Organization*. 40: 531-540.
- 19) Rachou, R.G., G. Lyons, M. Moura Lima, J.A. Kerr. 1965. Synoptic epidemiological study of malaria in El Salvador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 14: 1-62.
- 20) Collins, R.T., B.K. Dash, R.S. Agarwala, K.B. Dhal. 1983. An adaptation of the gel diffusion technique for identifying the source of mosquito bloodmeals. *World Health Organization*. WHO/MAL/ 83.992 WHO/VBC/83.873. pp. 1-11.
- 21) Garvey, J.S. N.E. Cremer, D.H. Sussdorf. 1977 *Methods in Immunology*. 3rd. Ed. The Benjamin Cummings Publishing Company. Massachusetts U.S.A.
- 22) Voller, A.G. Huldt, C. Thors, E. Engvall. 1975. New serological test for malaria antibodies. *British Medical Journal*. 1: 659-661.
- 23) Voller, A.D.E. Bidwell, A. Bartlett, D.G. Bleck M. Perkins, B. Oladehin. 1976. A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. *Journal of Clinical Pathology*. 29: 150:153.

- 24) Franco, E.L. 1983. Diagnosis of acute acquired Toxoplasmosis with the enzyme-labelled antigen reversed immunoassay for immunoglobulin M antibodies. *Journal of Immunoassay*. 4: 373-393
- 25) Engvall, E., P. Perlmann. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, elisa III, Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *The Journal of Immunology*. 109: 129-135.
- 26) Voller, A.D.E. Bidwell, A. Bartlett, A. 1976. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. *Bulletin of the World Health Organization*. 53: 55-65.
- 27) Burkot, T.R. W.G. Goodman, G.R. DeFoliart, 1981. Identification of mosquito blood meals by enzyme linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 30: 1336-1341.
- 28) Edrissian, Gh. H., A. Hafizi. 1982 Application of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to identification of Anopheles mosquito bloodmeals. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 76: 54-56.
- 29) Engvall, E.P. Perlmann, 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 8: 871-874.
- 30) Voller, A.D.E. Bidwell, A. Bartlett. 1977. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Dynatech Laboratories. Alexandria, Va. 48 pp.
- 31) Service, M.W. A. Voller, D.E. Bidwell. 1986. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the identification of blood-meals of haematophagous insects. *Bulletin of Entomological Research*. 76: 321-330.
- 32) Burkot, T.R., F. Zavala, R.W. Gdwadz, F.H. Collins R.S. Nussenzweig, D.R. Roberts, 1984. Identification of malaria infected mosquitoes by a two-site enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 33: 227-231.
- 33) Burkot, T.R. J.L. Williams, I. Schneider. 1984. Identification of Plasmodium falciparum - infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 33: 783-788.

- 34) Clarck-Gil, S., R.F. Darsie. 1983. Mosquitoes of Guatemala, *Mosquito Systematics*. 15: 151-284.
- 35) Tempelis, C.H. 1975. Host-feeding paterns of mosquitoes, with a review of advances in analysis of blood meals by serology. *Journal of Medical Entomology*. 11:635-653.
- 36) Edman, J.D., H.W.Kale II. 1971. Host behavior: its influence on the feeding success of mosquitoes. *Annals of the Entomological Society of America*. 64: 513-516.
- 37) Sudia, W.D., R.W. Chamberlain. 1962. Battery operated light trap, an improved model. *Mosquito News*. 22:126-129.
- 38) Zulueta, J. de, C. Garret-Jones 1965. An investigation of the persistence of malaria transmission in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 14: 63-77.
- 39) Bruce-Chwatt, L.J. 1974. Resurgence of malaria and its control. *Journal of Tropical Medicine an Hygiene*. 77 supplement. pp. 62-66.
- 40) Brady, J. 1974. Calculation of anopheline man-biting densities from concurrent indoor and outdoor resting samples. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 68:359-361.
- 41) Moskowskij, S.D. 1967. A further contribution to the theory of malaria erradictation. *Bulletin of the World Health Organization*. 36: 992-996.
- 42) Clark, M.F., A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*. 34: 475-483.
- 43) Lilienfeld, Abraham M. 1976. *Foundations of Epidemiology*. Oxford University Press. Inc. U.S.A.
- 44) Phillips, R. Stephen. 1983. *Malaria. Studies in Biology No. 152*. Edward Arnold Publishers. Great Britain.
- 45) Weitz, B. 1960. Feeding habits of blodsucking arthropods. *Experimental Parasitology*. 9:63-82.
- 46) McKinney, R.M., J.T. Spillane, P. Holden. 1972. Mosquito to blood meals: Identification by a fluorescent antibody method. *American Journal of Tropical Medicine an Hygiene*. 21: 999-1003.

- 47) Washino, R.K., J.G. Esle. 1972. Identification of blood meals of hematophagous arthropods by the hemoglobin crystallization method. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 21: 238-245.
- 48) Tempelis, C.H., M.L. Rodrick. 1972. Passive hemagglutination inhibition technique for the identification of arthropod blood meals. *American Journal Tropical of Medicine and Hygiene.* 21: 238-245.
- 49) Tempelis, C.H., M.F. Lofy. 1963. A modified precipitating method for identification of mosquito blood-meals. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 12: 825-831.
- 50) Crans, W.J. 1964. Continued host preference studies with New Jersey mosquitoes. *Proceedings of the National Journal of Mosquito Association.* 51: 50-58.
- 51) Chamberlain, R.W., W.D. Sudia. 1967. Methods for the study of mosquitoes. *Bulletin of the World Health Organization.* 35: 405-439.