

Estandarización de una prueba de Elisa para la detección de anticuerpos contra el herpesvirus Bovino-1 (HBV-1) en suero lácteo

RODAS JD MV.MS., ZULUAGA FN MV.MS., HENAO G MV,
RESTREPO M., M.V., OSSA JE MV. PhD*

Resumen

El presente estudio tuvo por objeto estandarizar una prueba de ELISA en suero lácteo para optimizar la aplicación de esta técnica a la caracterización de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB). Se tomaron, para el efecto, 69 muestras de suero lácteo de animales positivos por neutralización y ELISA en suero sanguíneo y 105 de animales negativos por ambas pruebas. El valor promedio de los delta de densidad óptica (diferencia de promedios entre los pozos con antígeno y con control de antígeno) para los 105 sueros negativos fué de 0.04 con una desviación estándar de 0.02 y para los 69 positivos fué de 0.20 con una desviación estándar de 0.06. Con base en estos datos se determinó un punto de corte de 0.08 con el cual se logra una sensibilidad del 100% y una especificidad del 94%. La concordancia de los resultados entre las pruebas para los dos tipos de muestras fué del 97%. Estos resultados aportan un elemento más para la caracterización y el control o erradicación de esta enfermedad en el país. Finalmente se discute la importancia de optimizar aún más esta prueba, mediante el uso de leche entera y de "pooles" de suero lácteo, que permitirían la aplicación de la prueba a estudios masivos de tamizaje en grandes poblaciones

Introducción

El HVB-1, causante de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB), es considerado uno de los grandes problemas infecciosos de la ganadería a nivel mundial (6,11). En Antioquia y el resto del país se ha informado acerca de la evidencia serológica de la infección, si bien las evidencias virológicas han sido escasas y la importancia clínica y, consecuentemente el impacto económico, son aún motivo de controversia (10,14).

El diagnóstico del HVB-1 se hace tradicionalmente por aislamiento y por neutralización, las cuales siguen siendo las pruebas de referencia a nivel mundial. Sin embargo, la técnica de ELISA, desarrollada desde finales de la década del 70, se ha impuesto por sus innumerables ventajas, tanto en el campo de la investigación como del diagnóstico de laboratorio (4,8,12).

Para el caso de la RIB la prueba de ELISA ha sido utilizada con diferentes variaciones, principalmente en Estados Unidos y Europa (1,12).

Nuestro grupo de trabajo se propuso, entonces, la tarea de estandarizar una prueba de ELISA en suero lácteo, basada en pruebas previamente estandarizadas en suero sanguíneo, y tratar de optimizarla para su uso en estudios de prevalencia y en posibles programas de control o erradicación.

Materiales y Métodos

Tamaño muestral: de acuerdo con la tabla de tamaño muestral para estudios descriptivos, con referencia a una población infinita y tomando como límite de confianza un 95% y un error del 10% se decidió un número mínimo de 100 vacas con serología conocida en suero sanguíneo por neutralización y ELISA (3).

* Programa de Reproducción, Laboratorio de virología,
Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, AA 1226. Medellín, Colombia.
Investigación financiada por Colciencias y la Universidad de Antioquia.

Obtención y procesamiento de las muestras: para la obtención del suero lácteo, se utilizaron tubos plásticos Corning de 50cc y se siguió el procedimiento de Zuluaga y cols levemente modificado (13). Se tomaron muestras de 40cc de leche de vacas en lactancia y se transportaron en condiciones de refrigeración. Para evitar resultados inespecíficos no se tomaron muestras de vacas en proceso de secado, en posparto o con mastitis clínica.

Una vez en el laboratorio las muestras fueron conservadas en refrigeración a 4°C/24h y luego sometidas a centrifugación (3.000 rpm/15min) para separar la capa grasa. A continuación se adicionó renina o cuajo comercial (gentilmente suministrado por la unidad de derivados lácteos de la Universidad Nacional) en una proporción 1:1000 a cada muestra, previo ensayo de su poder enzimático (Fuerza de Cuajo). Posteriormente se incubó a 37°C/20min y luego se centrifugó nuevamente a 3.000rpm/5min para separar el suero lácteo de la caseína. El suero lácteo así obtenido se conservó a -20°C hasta su uso posterior en la prueba de ELISA.

Neutralización y ELISA en suero sanguíneo: La neutralización se realizó según procedimientos previamente descritos (5) y el ELISA acorde con métodos estandarizados en nuestro laboratorio

Elisa en suero lácteo: Se hicieron diluciones dobles desde 1:5 hasta 1:80 de 3 sueros lácteos positivos y 3 sueros lácteos negativos concordantes por las pruebas de neutralización y elisa en suero sanguíneo y se adicionaron por duplicado en pozos de microplatos previamente sensibilizados con una dilución 1:100 del antígeno viral y control de antígeno (lisado de células infectadas y no infectadas con el Herpes Virus Bovino -1), para determinar la dilución de trabajo más apropiada.

Determinación del punto de corte: conocida la dilución de trabajo más apropiada para el suero lácteo, se procedió a determinar el punto de corte. Para el efecto se tabularon los delta de densidad óptica de cada suero, obtenidos a partir de la diferencia entre los

promedios de los pozos con antígeno y control de antígeno.

El punto de corte se calculó con base en el promedio de los delta de absorbancia de los sueros negativos más dos desviaciones estándar, con lo cual se asegura que el 95% de los mismos estén correctamente clasificados (Statgraphics 6.0). De acuerdo con las exigencias para esta prueba en suero lácteo, el punto de corte fue el valor de máxima sensibilidad con referencia a la neutralización y el ELISA en suero sanguíneo.

Resultados

Para la estandarización de la técnica se emplearon un total de 174 sueros lácteos correspondientes a los sueros sanguíneos concordantes por las pruebas de Neutralización y ELISA, este número supera el límite inferior (100) establecido de acuerdo con el tamaño muestral requerido para este estudio.

Acorde con el análisis de 2 muestras el promedio de los delta de densidades ópticas de los sueros negativos fue de 0.04 con una desviación estándar de 0.019 y para los sueros lácteos positivos el promedio fue de 0.20 con una desviación estándar de 0.06.

La distribución de los datos fue normal y la gráfica múltiple de cajas y bigotes (gráfica 1) permitió observar 2 grupos de valores bien diferenciados. De esta gráfica se determinó el rango de valores para la iteración entre 0.07 equivalente a un valor por debajo del mínimo delta de densidad óptica de los sueros positivos que fue de 0.08 y 0.12 equivalente al máximo valor de densidad óptica de los sueros negativos. El punto de corte seleccionado fue de 0.08.

La tabla de contingencia (tabla 1) permite definir la sensibilidad y la especificidad. Para el punto de corte acordado la sensibilidad alcanza un 100% es decir se logra una perfecta correlación entre las dos pruebas con las muestras positivas; la especificidad, sin embargo alcanza un 94.3% lo que significa que solo 99 de 105 sueros negativos son detectados por la nueva prueba. La concordancia final entre la dos pruebas es de 96.6%.

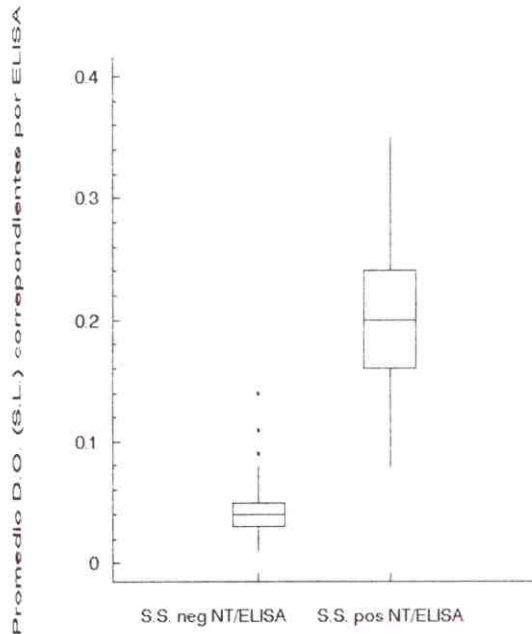


Figura 1. Gráfica múltiple de cajas y bigotes (SS) NT y Elisa.
S.S.: Suero sanguíneo. S.L. Sueros lácteos.
D.O. Densidad óptica NT: Neutralización

Tabla 1. Comparación de resultados concordantes por Elisa y neutralización en suero sanguíneo con los obtenidos por Elisa en suero lácteo

ELISA EN SUERO LACTEO			
ELISA/NT SUERO SANGUINEO	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
POSITIVOS	69	0	69
NEGATIVOS	6	99	105
TOTAL	75	99	174

Discusión

Para la detección de la infección con el HVB-1 se han desarrollado una gran variedad de pruebas de ELISA y en nuestro laboratorio en particular, hemos estandarizado previamente una prueba en suero sanguíneo que nos permite hacer un diagnóstico serológico con una sensibilidad del 92% y una especificidad del 97% con relación a la prueba de neutralización.

El presente estudio tuvo por objeto optimizar el ELISA mediante el uso de muestras más fáciles de

obtener y eventualmente más informativas de la situación de un hato o una región. Igualmente la prueba propuesta podría tener gran aplicación al momento de realizar programas de control o erradicación de la enfermedad, bien a nivel de hato, o a nivel nacional.

Es interesante notar que el ELISA en suero lácteo mostró valores de densidad óptica menos dispersos alrededor del promedio para positivos y negativos; sin embargo esto deberá probarse en condiciones de campo, pues bien podría deberse a la condición de doble concordancia por neutralización y ELISA en suero sanguíneo, que fue un criterio de inclusión para los sueros lácteos a probar.

La inmunoglobulina G es la más abundante de las inmunoglobulinas en la leche bovina (0.29 mg/ml) pero solo representa el 2.6% de la concentración en suero sanguíneo (11.2 mg/ml) (7,9); a pesar de esto el ELISA en suero lácteo resultó altamente sensible.

Para avanzar más en la optimización de esta prueba, hasta hacerla aplicable, en forma más amplia a las condiciones de nuestro medio, sería importante estandarizarla para "pools" de sueros bovinos como se ha hecho en otros países (1), y probar la posibilidad de utilización de leche entera para simplificar el trabajo al abolir el uso de enzimas y de centrifugación.

Resultados preliminares de nuestro grupo (no mostrados en este artículo) han indicado que es posible detectar un suero positivo en un "pool" de 10 muestras; sin embargo, la densidad óptica en los pozos con control de antígeno se aumenta, mientras que en los pozos con antígeno se disminuye, con relación al suero positivo probado en forma individual. Es necesario por lo tanto establecer un nuevo punto de corte para el efecto. En cuanto a la posibilidad de utilizar leche entera tenemos también resultados preliminares que indican una concordancia del 90% con las pruebas previamente estandarizadas.

Con este estudio hemos hecho una nueva contribución a la caracterización de la RIB en Colombia y, muy especialmente, hemos aportado un elemento diagnóstico que podría ser de gran utilidad cuando lleguemos a conocer el comportamiento de esta infección en el país, con lo cual podríamos estar en capacidad de proponer programas de control o erradicación.

Summary

Standardization of an ELISA Technique for detection of antibodies against Bovine Herpes virus-1 (BHV-1) in milk serum

The objective of this study was to standarize an ELISA technique for serological testing of BHV-1 in milk serum. This technique is expected to facilitate large serological screening in milking cows.

For this purpose, 69 samples from Nt and ELISA positives and 105 Nt and ELISA negatives animals were used.

The average of optical densities for the negative samples was 0.04+/- 0.02 and for the positive the average was 0.20+/-0.06 Based on this results we set a delta value of optical density of 0.08 as the cut-off point for positivity. This value gives a sensibility of 100% and specificity of 94%.

The concordance between serum Nt and serum ELISA and milk serum ELISA was of 97%.

The standardization of this ELISA provides a new instrument not only for the characterization of the infection in our country but also for its control and eventual eradication.

Finally, we discuss the possibility of further optimizing by using straight milk or milk serum pools to facilitate further the massive screening of large populations.

Referencias

1. ACKERMAN M, MULLER H, BRUCKNER L. et al. Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Suizerland: review and prospects. *Vet Microbiol* 1990; 23: 365-370.
2. ARBOLEDA J, BEDOYA D, RODAS J. (1991). Estudio sobre la Rinotraqueitis Infecciosa bovina en un hato lechero del Valle del Aburrá. Trabajo de Grado. Fac. de Med. Vet. y de Zoot- Univ. de Antioquia, 1991.
3. BETANCUR J, GARCIA L, MANOTAS R, MONTOYA F, SANCHEZ F. Metodología de la investigación en ciencias de la salud. 2a ed. Medellín: Imprenta Universidad de Antioquia, 1992. 244p.
4. CORREA M, ARANGO A, OSSA J. Estandarización de un método de ELISA para Citomegalovirus humano. *Acta Médica Colombiana* 1990; Vol 15 No.4: 180-186.
5. DEREGT D, CHO H J and KOZUB G C. A comparative evaluation of two sensitive serum neutralitation test for bovine herpesvirus-1 antibodies. *Can J Vet Res* 1993;57:56-59.
6. FENNER F, BACHMAN P, GIBBS E, et al. *Veterinary Virology* Orlando: Academic Press, 1987. 660p.
7. HALLIWELL RE, GORMAN NT. *Veterinary Clinical Immunology*. W.B. Saunders Company Ed. 1989. 548 p.
8. KRAMPS JA, QUAK S, WEERDMEESTER K. et al. Comparative study of sixteen enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. *Veterinary Microbiology* 1993;35:11-21.
9. NORCROSS NL. Secretion and composition of colostrom and milk. *J Am Vet Med Ass.* 1982; Vol 181 No.10:1057-1060.
10. SOSSA S, FLOREZ V, ARANGO P. Estudio serológico para la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) en hatos lecheros del altiplano norte y del oriente de Antioquia. Trabajo de grado. Fac de Med Vet y Zoo- Univ. de Antioquia, 1982.
11. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, TIKOO S, LIANG X, BABIUK L. Bovine herpesvirus-1 vaccines. *Imm and Cell Biol* 1993; 71: 405-420.
12. WITTE K, HANNEMAN P, DOPATKA H, GIESENDORF B. Technical improvements of a commercial ELISA to detect antibodies against bovine herpesvirus 1. *Med Microbiol Immunol* 1989; 178: 9-20.
13. ZULUAGA F, RESTREPO G, HEINRICH J, ARANGO L, GOMEZ G. Diagnóstico de brucellosis por aglutinación en lactosuero y su comparación con sero-aglutinación. Trabajo de grado Fac de Med Vet y Zoot- Univ. de Antioquia, 1970.
14. ZÚÑIGA I, OSSA J, HINCAPIE O. Prevalencia de IBR en reproductores del Urabá Antioqueño para 1977. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 1978; Vol 1 No.2: 135-148.