

Estandarización de la técnica ELISA en leche entera para la detección de anticuerpos contra el Herpesvirus Bovino-1 (HVB-1)

J.C. PALACIO, O.A. SALDARRIAGA, J.J. ARBOLEDA, J.D. RODAS, F.N. ZULUAGA, J.E. OSSA, LABORATORIO DE VIROLOGIA, FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

RECIBIDO: AGOSTO 1997; ACEPTADO: SEPTIEMBRE 1997

Resumen

Con el propósito de ampliar la aplicabilidad de la técnica de ELISA para el control de las enfermedades infecciosas, en el contexto de la ganadería nacional y específicamente para contribuir al conocimiento y al control de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, se estandarizó una prueba de ELISA en leche entera y se exploró la posibilidad de determinar un animal positivo en una mezcla de leches de varios animales negativos. Para el efecto se seleccionaron 127 animales que mediante pruebas previas de Neutralización y ELISA en suero sanguíneo, habían dado resultados concordantes. De estos animales se tomaron muestras individuales de leche y se estableció un punto de corte con base en los promedios de absorbancia de las muestras positivas y negativas. El análisis se hizo con el programa estadístico Medcalc, utilizando las curvas de respuesta operativa (ROC), el punto de corte resultó ser de 0.09 con un intervalo de confianza del 95% y una sensibilidad y especificidad del 94%. En cuanto a la posibilidad de probar mezclas de varios individuos, se determinó que una muestra de leche de un animal positivo, con un delta de absorbancia alto (>0.20) se puede detectar hasta en 4-6 muestras negativas, mientras que una muestra positiva, con un delta de absorbancia cercano al punto de corte (<0.14), sólo puede detectarse mezclada en una muestra negativa. Este estudio representa un aporte adicional al armamentario técnico para la investigación y el control o erradicación de la RIB.

Introducción

La Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB) es una enfermedad infecciosa asociada con síntomas del sistema respiratorio y genital, además de conjuntivitis y, en terneros, encefalitis e infección sistémica fatal. El agente causal, el Herpesvirus Bovino - 1 (HVB-1) es un miembro de la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae, y su vía de entrada es el tracto respiratorio o el tracto genital (1).

La historia de la enfermedad se inició a principios de siglo en Europa, donde el HVB-1 causó una enfermedad genital que hoy se conoce como Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (VPI) en hembras y Balanopustitis Pustular Infecciosa (BPI) en machos. En la década de los cincuenta en Estados Unidos se presentó una enfermedad respiratoria aguda, que ocasionó grandes pérdidas económicas y se denominó RIB (2), los agentes resultaron ser idénticos; y actualmente se considera que la infección es de distribución mundial, con pocos países libres (7).

En Colombia como resultado de estudios intensivos tendientes a determinar las causas de problemas reproductivos en bovinos de los llanos orientales, el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) logró, en la década de los setenta, 11 aislamientos del virus de la RIB de animales que presentaban vulvovaginitis y abortos (8), en 1976 también fue aislado el virus de una vaca holstein que presentaba vulvovaginitis (17). Recientemente se logró aislar el virus de un toro seropositivo que se inmunosuprimió experimentalmente con corticoides (15). En Colombia se han realizado varias encuestas serológicas buscando anticuerpos contra la RIB, donde la prevalencia de la infección ha variado desde el 0.7% hasta el 67.6% (9).

La importancia económica de la RIB radica en que no solamente ocasiona pérdidas directas: abortos, mortalidad variable y disminución en la producción, sino también por las restricciones comerciales sobre animales y sus productos derivados, desde países infectados hacia países libres.

El HVB-1 tiene la capacidad de establecer latencia, principalmente en ganglios nerviosos, donde el estrés, incluyendo el tratamiento con corticoides puede ocasionar reactivación, reexcreción y transmisión del agente infeccioso (1,2). La latencia asegura la perpetuación de la infección dentro del hato y esto constituye el mayor problema para el efectivo control de la enfermedad (14).

Las vacunas con virus vivo modificado al igual que las vacunas con virus inactivados, inducen buenas respuestas inmunes y son protectoras, pero son usualmente incapaces de prevenir la infección, tampoco previenen el establecimiento de la latencia ni la reexcreción de partículas virales luego de la reactivación del virus latente. Otra dificultad asociada a las vacunas es la confusión para la diferenciación serológica entre bovinos vacunados e infectados naturalmente y esto interfiere con los programas de control; es así como en Bélgica y la Gran Bretaña existe una amplia frecuencia de animales seropositivos con la imposibilidad de atribuirle el resultado a la infección o a la vacuna (10,13,14).

Para el diagnóstico, el control y la erradicación de la RIB, se han ensayado diferentes estrategias en países europeos. Dinamarca, Suiza y Suecia, son países libres, donde la vacunación no ha tenido lugar, y donde los programas de erradicación fueron basados sobre la presunción de que animales seropositivos eran portadores; fue por lo tanto crucial detectar y sacrificar animales seropositivos y para esto fue necesario usar pruebas que fueran altamente sensibles, como la técnica de ELISA (13,14). Esta prueba serológica, ha sido considerada como la más sensible y específica, por esto se ha propuesto como la más apropiada para llevar a cabo la vigilancia epidemiológica en campañas de control o erradicación de la infección (5,6).

En Slovenia se sugirió la evaluación de las muestras de leche por la técnica de ELISA como un método importante para el control de la infección, después de haber encontrado una buena correlación entre los resultados de detección de anticuerpos en suero sanguíneo y muestras de leche (11). Igualmente, Suecia utilizó la técnica indirecta de ELISA para la detección de anticuerpos contra el HVB-1, y usó la estrategia de mezclas de leche (12).

En el caso de Colombia, una alternativa a considerar podría ser la erradicación de la enfermedad, para lo cual se requiere de avances tecnológicos que le permitan al país responder en forma confiable y efectiva a este reto. Entre otras cosas se requieren técnicas muy sensibles y específicas que puedan aplicarse a gran-

des poblaciones en forma oportuna y económica. Esta misma tecnología se podría utilizar para probar la eficacia de las vacunas que ofrece el mercado, en caso de que la decisión fuera controlar con base en vacunación.

En nuestro grupo de investigación se viene trabajando desde hace varios años en la estandarización de técnicas como ELISA en suero sanguíneo y suero lácteo (3,4), lo que nos han permitido generar nueva información sobre la situación serológica de la infección, y ofrecer el servicio diagnóstico al sector pecuario. Interesados en mejorar la utilidad de las pruebas de ELISA, nos dimos a la tarea de estandarizar esta misma técnica para detectar anticuerpos específicos contra el virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en leche entera. Igualmente, quisimos probar la posibilidad de detectar un individuo positivo entre varios negativos, utilizando mezclas de muestras de leche, con el propósito de favorecer la economía del hato.

Con esta técnica completamos el arsenal necesario para ofrecer al país la infraestructura tecnológica de apoyo al control o la erradicación de la infección.

Materiales y Métodos

Tamaño Muestral. El tamaño de muestra que se recomendó para un margen de error del 10% y una población infinita, fue de 100 muestras, según la tabla para la determinación del tamaño muestral en estudios descriptivos con un 95% de confiabilidad (12).

Obtención y procesamiento de las muestras. Se tomaron las muestras de vacas que no estaban sometidas a ningún tipo de tratamiento farmacológico y de más de 10 días posparto.

Las muestras de sangre, 10 cc en tubos al vacío, fueron tomadas por punción de la vena coccígea media. Al mismo tiempo se tomó, del mismo animal, una muestra de 15cc de leche en tubo estéril con tapa rosca, ambas muestras fueron transportadas en refrigeración.

Las muestras fueron procesadas inmediatamente al llegar al laboratorio: la leche se centrifugó a 3.000 rpm/15min para separar la grasa, la muestra de sangre se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos, para separar el suero. Ambas muestras se almacenaron en alícuotas a -70°C hasta su uso.

Virus empleado y cultivos celulares. Los estudios se realizaron con una cepa del HVB-1 donada por la Universidad de Wisconsin, este virus fue titulado por

la técnica de dosis infecciosa 50 (ID50) sobre monocapas de la línea celular Madin Darvin Bovine Kidney (MDBK).

Seroneutralización viral y ELISA en suero sanguíneo. Se utilizó el método cualitativo utilizado por Arboleda y cols (3) en el laboratorio de virología de la Universidad de Antioquia, y además fue utilizado el método indirecto de ELISA estandarizado por Rodas y cols (4).

ELISA en muestras individuales de leche. Para la estandarización de la técnica ELISA en leche entera, se utilizaron las muestras de los animales cuyos sueros sanguíneos tuvieron una reactividad previamente conocida y concordante por las pruebas de Neutralización y ELISA. Con el fin de determinar la dilución de trabajo para las muestras de leche se realizaron diluciones dobles hasta 1:20, y finalmente empleamos la dilución en la cual la diferencia entre los deltas de densidad óptica fue más amplia.

Se sensibilizaron platos de 96 pozos de fondo en U con el antígeno (1:125) del HVB-1 según lo descrito por Rodas y cols (4), luego se agregaron 100 ul de blotto (leche descremada 2% en PBS), durante 10min. a temperatura ambiente, para bloquear reacciones inespecíficas, después se agregaron 100ul/pozo de cada muestra de leche y se incubó a 37°C en baño María, al cabo de una hora, se lavó con solución de lavado (PBS-Tween-20 al 1%) en tres ocasiones. Posteriormente se adicionaron 100 ul/pozo de una dilución 1:14000 de anti-inmunoglobulina G bovina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) en tampón dilución (PBS-Tween-20 al 4%); se incubó de nuevo en las mismas condiciones antes descritas, se lavó tres veces y se agregaron 100 ul/pozo del sustrato P-nitrofenilfosfato (Sigma) 1mg/ml, diluido en tampón de sustrato; se incubó a temp. Amb./45 min en la oscuridad y finalmente se agregaron 50 ul/pozo de NaOH 2N para detener la reacción y se procedió a la lectura espectrofotométrica a 405 nm (Minireader Uniskan II). También se hicieron ensayos para definir la posibilidad de eliminar el uso del blotto, tratándose de una muestra de leche.

ELISA en "mezclas" de muestras de leche. La prueba estandarizada en muestras individuales; se utilizó para probar "mezclas" constituidas por: 1 positivo en 1 negativo, 1 positivo en 2 negativos, 1 positivo en 3 negativos, y así sucesivamente hasta que el positivo dejó de ser detectable.

Interpretación estadística de los resultados. Para determinar el punto de corte de la nueva prueba estandarizada, se utilizaron las curvas de respuesta

operativa (R.O.C) pertenecientes al programa estadístico Medcalc, el cual determinó además la sensibilidad y la especificidad.

Resultados

Se utilizó la leche sin diluir para la estandarización de la técnica, puesto que así se obtuvo la mejor diferencia entre los deltas de absorbancia para las muestras positivas y negativas.

Se determinó que el uso del blotto (leche descremada) no solo era innecesario, sino que además disminuía levemente la lectura de absorbancia de las leches positivas, sin afectar las lecturas de absorbancia de las leches negativas; por lo tanto se eliminó su uso.

De las 200 muestras probadas, 127 dieron resultados concordantes por las técnicas de Seroneutralización y ELISA en suero sanguíneo, 16 resultaron positivas y 111 negativas. El punto de corte encontrado para los delta de absorbancia fue de 0.09, con un intervalo de confianza del 95% y una sensibilidad y especificidad del 94%. (Ver Figura 1).

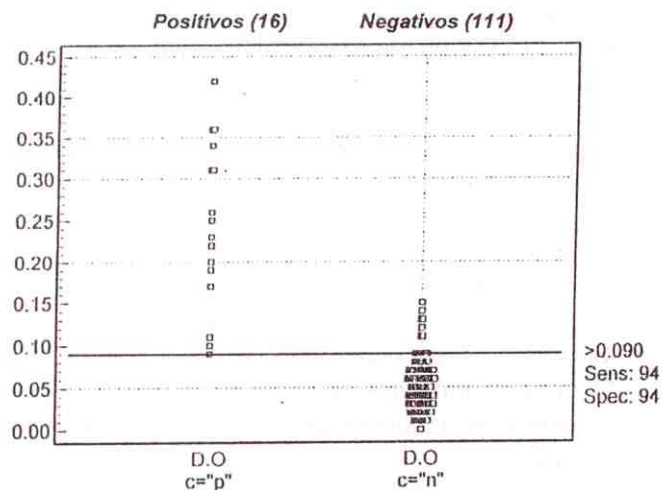


Figura 1. Curva de respuesta operativa (R.O.C) D.O : Densidad Óptica. Spec : Especificidad. Sens: Sensibilidad. 0.09: Punto de corte.

Para el efecto de probar las mezclas de leche, se tuvo en cuenta el valor de absorbancia de las muestras positivas y se encontró que aquellas con un alto

valor de absorbancia, supuestamente las de más alto título, aún fueron detectables en mezclas con 4 - 6 leches de individuos negativos, mientras que las muestras con un bajo delta de absorbancia solo fueron detectables en mezclas con sólo una muestra negativa.

Adicionalmente en el transcurso del trabajo encontramos que las muestras no deben ser descongeladas para posteriores estudios serológicos, puesto que los valores de absorbancia se disminuyen significativamente.

Discusión

Colombia se enfrenta ante la disyuntiva de control o erradicación de la *Rinotraqueitis Infecciosa Bovina*. Para tomar alguna decisión se debe conocer el impacto de la infección, pero este aún se desconoce por la falta de posibilidades de diagnóstico de esta y de otras enfermedades infecciosas con las que puede confundirse. Nuestra meta ha sido la caracterización de esta infección y para el efecto nos hemos dado a la tarea de desarrollar los elementos diagnósticos que nos permitan profundizar en la investigación a la vez que nos permita ofrecer tecnologías apropiadas para el diagnóstico y el control. Esta técnica en leche entera posee varias características que la hacen comparativamente mejor, si se la compara con la neutralización y los ELISAs en suero sanguíneo y en suero lácteo; así:

- 1) no se requiere personal especializado para la toma de la muestra,
- 2) el procedimiento no es invasivo y no causa estrés en los animales,
- 3) se eliminan riesgos sanitarios para los animales y riesgos laborales para los técnicos,
- 4) no se requiere material estéril,
- 5) en el laboratorio se requiere una menor manipulación y un menor equipamiento para el proceso respectivo,
- 6) se elimina un paso en la prueba de ELISA, lo que representa un ahorro en recursos de tiempo/ hombre. En conjunto, los costos directos e indirectos son menores.

Puesto que los índices de prevalencia detectados en estudios de nuestro grupo son relativamente bajos (10-15%) sería entonces posible hacer aproximaciones epidemiológicas probando mezclas de leches, por lo

menos de dos individuos, lo cual puede representar, una reducción de los costos en más de un 50%, y adicionalmente, para efectos de control oficial, sería posible hacer pruebas en canecas en los centros de acopio para detectar los hatos positivos y eventualmente, llegar a los animales portadores de la infección en las fincas.

La prueba estandarizada en este trabajo, bien sea en muestras individuales o en mezclas, estaría disponible para la realización de estudios epidemiológicos puntuales o para el seguimiento prospectivo de un hato determinado. Esta técnica sería de la mayor importancia si el país decide iniciar una campaña de erradicación; pues en este caso la búsqueda sistemática de animales portadores de la infección se convierte en la principal estrategia para evaluar la campaña de erradicación y mantener el estatus libre de la infección. Si tal fuera la decisión sería importante perfeccionar esta técnica hasta lograr la detección de un positivo en 4-6 negativos, lo que se podría lograr, en principio, mejorando la calidad del antígeno, esto eventualmente permitiría utilizar una dilución mayor de las muestras de leche.

Actualmente se encuentra en el mercado una vacuna trivalente que contiene virus vivo termosensible del Herpes Bovino tipo 1 de la *Rinotraqueitis Infecciosa Bovina* (RIB), virus inactivado de la *Diarrea Viral Bovina* (DVB) y virus vivo de la *Parainfluenza 3* (PI3) (18); el uso generalizado de esta vacuna no permitiría la diferenciación serológica, con las técnicas de diagnóstico disponibles, entre animales vacunados y animales infectados en forma natural, de esta forma sería imposible establecer la real presencia e impacto de la enfermedad en nuestros hatos y se dificultaría la toma de decisiones para iniciar una campaña de erradicación. Si la realidad nacional exige el uso masivo de la vacuna, nuestro laboratorio dispone de las herramientas necesarias para evaluar la calidad y el impacto de la misma.

Agradecimientos

Este estudio fue realizado como parte del proyecto "Caracterización epidemiológica y virológica de la *rinotraqueitis infecciosa bovina*"; código 1115-07-018-95 financiado por Colciencias y la Universidad de Antioquia. Los autores agradecemos al doctor Fernando Montoya por su asesoría estadística; y a los doctores Jorge Gómez y Obaldo Ramos por su colaboración en la obtención de las muestras de campo.

Summary

Standardization of an Elisa technique for detection of antibodies against HVB-1.

With the purpose of extending the applicability of the ELISA technique for the control of infectious diseases, in the context of national livestock and specifically to contribute to the knowledge and control of Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), an ELISA technique was standardized in whole milk and the possibility of determining a positive animal in a mixture of samples from various negative animals was explored. For this purpose 127 animals were selected by previous testing of IBR antibodies by NT and serum ELISA. All these animals gave concordant results by both techniques. From these animals single samples of milk were taken and a cut-off point was established. The analysis was done by Medcalc estadistical program, using responsive operative curves (ROC), the cut-off point was found at 0.09 and both, the specificity and sensibility were 94%. Also it was found that a single milk sample from one positive animal, with a high delta of absorbance (>0.20) could be detected in mixture with 4-6 negative samples, while those positive but with a delta value near the cut-off point (<0.14) could be mixed only with one negative sample to maintain its positivity. This study represents an additional contribution to the technical armamentarium for research and control or eradication of RIB.

Referencias

- 1 Suresh, K. T., Campos, M., and Babiuk, L. A. Bovine herpesvirus -1 (HVB-1): Biology, pathogenesis and control. *Advances in Virus Research*. 1995 Vol 45.
- 2 Fenner, F. et. al. *Veterinary Virology*. 1987, 659p.
- 3 Arboleda, J.J., Bedoya, D.A., Rodas, J.D. Estudio sobre Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) en un hato lechero del Valle del Aburra. Tesis (Médico Veterinario) U. de A. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 1.991.
- 4 Rodas, J. D. y col. Estandarización de una técnica ELISA para rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y encuesta serológica del hato BON de Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 1996 Vol. 9 (1y2). P.35-39.
- 5 Ackerman M., et. al. Eradication of infectious bovine rinotracheitis in Switzerland: Review and prospects. *Veterinary Microbiology*, (1990) 23: 365-370.
- 6 Witte K., Hanneman P., Dopatka H., Gresendorf B. Technical Improvements of a comercial ELISA to detect antibodies against bovine herpesvirus 1. *Med. Microbiol. Immunol.* 1989; 178: 9-20.
- 7 Espinasse J. Puntualización sobre la rinotraqueitis de los bovinos (IBR-VPI). *Gaceta Veterinaria* 1980; Vol 42 No.350:311-314.
- 8 CIAT. Informes anuales. *Salud animal*. 1972,1973,1974,1975.
- 9 Rodas, J.D. y col. Espectro clínico y epidemiológico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 1996 Vol. 9 (1y2). P.3-13.
- 10 Van Drunen Littel- et. al. Bovine herpesvirus-1. *Vaccines. Imm. And Cell Biol.* 1993. 71: 405-420.
- 11 Hostnik P., Grom J. Laboratory Diagnostics and control of IBR infection in Slovenia. *International symposium on I.B.R. and other ruminant herpesvirus infections. Abstracts. Tecnical report No. 6, August 1995.*
- 12 Bjornerot, L. et. al. The history of BHV-1 in Sweden and the eradication programme. *International symposium on I.B.R. and other ruminant herpesvirus infections. Abstracts. Tecnical report No. 6, August 1995.*
- 13 Ackerman, M. et. al. Round table on infectious bovine rinotracheitis infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. *Veterinary Microbiology*. (1990) 23: 361-363.
- 14 Lemaire M., Pastoret P., Thiry E. Le controle de l'infection par le virus de la rhinotracheite infectieuse bovine. *Ann. Méd. Vét.* 1994. 138: 167-180.
- 15 Gongora, O.A. y col. Aislamiento de un herpesvirus bovino tipo - 1 (HVB-1) de secreción nasal y esmegma prepucial en un toro reproductor. *Revista de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. Vol. XLIII No. 1, Junio de 1995.
- 16 Betancur, J. y col. Metodología de la Investigación en Ciencias de la Salud. Centro de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina U de A. Segunda edición. 1992.
- 17 Villate, J.E., y cols. Aislamiento del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa bovina y reproducciones experimentales de la enfermedad. *Memorias del X Congreso Nacional de Veterinaria y de zootecnia*. P 80-81. Medellín, Colombia. 1976.
- 18 Pfizer. Cattle Master®3. Vacuna contra IBR-BVD-PI 3. 1997.