

PREPARACION Y ESTANDARIZACION DE ANTIGENO PARA DIAGNOSTICO DE RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA POR INMUNODIFUSION. INFORME PRELIMINAR*

Olga C. Mariño**, Juan E. Villate, Olga E. Rueda, Diana E. Guerrero

INTRODUCCION

Para la detección, estudio y control de cualquier enfermedad es necesario contar con pruebas de diagnóstico que sean seguras, rápidas, económicas y sensibles. La prueba de seroneutralización (SN) se ha utilizado para el diagnóstico de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) con resultados satisfactorios (2); es segura y sensible, pero laboriosa y sofisticada. Como técnicas alternas se han reportado hemaglutinación pasiva (HAP), (10, 7, 1), anticuerpos fluorescentes (9) como también inmunodifusión en gel (ID) (4, 8, 3). Basados en estos reportes y en ensayos preliminares en el Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias (LIMV) se optó por intentar primeramente la producción de un antígeno soluble aplicable a la técnica de inmunodifusión en gel y comparar su comportamiento con respecto a la técnica de referencia SN.

* Contribución del Programa de Enfermedades Infecciosas y Epidemiología, Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias (LIMV). Instituto Colombiano Agropecuario ICA.

MATERIALES Y METODOS:

Cultivos de células: Para aplicación viral se usaron cultivos secundarios de riñón de feto bovino (MDBK) en medio de cultivo MEM-Eagles (F-15) con 10% suero fetal bovino y 200 UI Penicilina/ml. y 200 mg. estreptomycin/ml.

Virus: Se utilizó la cepa 5946 aislada de una hembra bovina en lactancia, edad 6 años, procedente de Tenjo, Cundinamarca e identificada por Villate y Col., (12) en la Sección de Virología del LIMV. El lote inicial presentó un título de $10^{5.5}$ dosis infectante 50% en cultivos de tejidos CTDI₅₀/0.05 ml.

Preparación de antígeno: Se siguió esencialmente el procedimiento descrito por Le Jeune y Col., (8) con algunas modificaciones. Para cada lote se utilizó un mínimo de 4 frascos rotantes de células

** Respectivamente: Microbióloga, M.S., Ph.D.; Médico Veterinario y Microbióloga año rural. Programa de Enfermedades Infecciosas y Epidemiología, ICA-LIMV, Apdo. Aéreo 29743, Bogotá.

MDBK inoculados con 100 ml. de un virus que contenía 100 CTDI₅₀/ml., calculadas según título (10^{5.8} CTDI₅₀/ml.). Los sobrenadantes y las células desprendidas por acción física, fueron colectados entre 48 y 72 horas post-infección, cuando el efecto citopático típico de virus Herpes se desarrolló en un 90% del cultivo. Este material fue sometido a centrifugación durante 15 minutos a 15.000 XG. El sedimento se resuspendió en 1/10 del volumen original de bufer borato pH 8.0, 0.14 M y se sometió a sonicación a 12 D.C. amperios durante 3 minutos en baño de hielo.

El sonicado se centrifugó a 20.000 XG durante 10 minutos; el sedimento se descartó y el sobrenadante se concentró a 1/100 del volumen original por diálisis contra polivinipirrolidona (PVP). Posteriormente, se sometió a congelaciones y descongelaciones rápidas; al producto se le llamó antígeno de extracto celular (IBR-EC) y se probó por inmunodifusión doble e inmunodifusión radial.

El sobrenadante obtenido después de la primeracentrifugación, fue sometido a precipitación con 8.0% P/V de polietilenglicol (PEG) 6.000 y dejado en agitación durante la noche a 4°C. El precipitado fue separado por centrifugación a 20.000 XG y el sedimento resuspendido en 1/20 del volumen inicial y sonicado a 12 DC amperios por 3 minutos y el producto, llamado antígeno de sobrenadante (IBK-S), probado igual que IBR-EC. Se utilizaron preparaciones idénticas, tanto de extracto celular como de sobrenadante a partir de cultivos no inoculados, como control de especificidad de la reacción.

Suero inmune específico: Se obtuvo por inoculación vía vaginal de 10⁴ CTDI₅₀/ml. de la cepa 5946 en un bovino susceptible mantenido en unidad de aislamiento, el cual presentó el cuadro clínico característico. Luego de la recuperación. Se hicieron dos inoculaciones a intervalos de dos meses por la misma vía y se sangró el animal 20 días después de la última inoculación. El suero se repartió en pequeñas alícuotas (3.0 ml.), se conservó a -20°C. y se tituló por SN para usarlo como suero control positivo en cada prueba. Para lograr títulos más elevados se inoculó el mismo bovino vía intramuscular con la cepa inactivada, incorporada a emulsión oleosa. Se utilizó además, como suero de referencia, suero bovino hiperinmune IBR proporcionado por el Dr. B.C. Easterday*.

Inmunodifusión doble: Se utilizó agar noble 0.85% en bufer-Tris 0.05 M, pH 8.0, con una concentración de NaCl 8.5%; éste se dispuso en cajas de petri 100 x 11 mm. Se utilizó un patrón de seis celdas periféricas de 7mm. de diámetro y una celda central de igual tamaño a una distancia entre ellas de 3 mm. El antígeno se colocó en la celda central, el suero control positivo en dos celdas previamente identificadas y los sueros diagnóstico en los restantes. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente en cámara húmeda y se observaron cada 24 horas hasta las 96 h. cuando se hizo lectura final.

* Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Wisconsin, Madison, Wisconsin 53706. U.S.A.

Inmunodifusión radial: Se utilizó agar noble al 10/o en bufer Tris 0.05 M, pH 8.0, NaCl. 8.50/o; el cual se mezcló con suero control positivo en cantidades adecuadas para lograr diluciones progresivas en base dos, manteniendo una temperatura de 50°C. Cada dilución de suero se colocó en cajas de 35 mm. de diámetro; una vez solidificado el agar se perforaron cuatro celdas de 3mm. en las cuales se colocaron diluciones en base del antígeno extracto celular. Se incubaron a temperatura ambiente y cámara húmeda durante 96 horas y se midió el diámetro de los anillos correspondientes a cada dilución.

Seroneutralización (SN): Todos los sueros usados fueron titulados paralela-

mente por microseroneutralización (6). Se utilizaron células RB y MDBK y 100 DI₅₀ de virus de IBR, título 10^{5.5} CTDI₅₀/0.05 ml. en cada prueba.

RESULTADOS:

Se demostró la presencia de una fracción soluble capaz de reaccionar en forma específica con los anticuerpos inducidos por el virus, a partir de extracto celular tanto de cultivos de riñón bovino como de células MDBK. No se obtuvo línea de precipitación a partir de sobrenadante. El antígeno formó una sola línea de precipitación contra el suero control positivo (Figura 1).

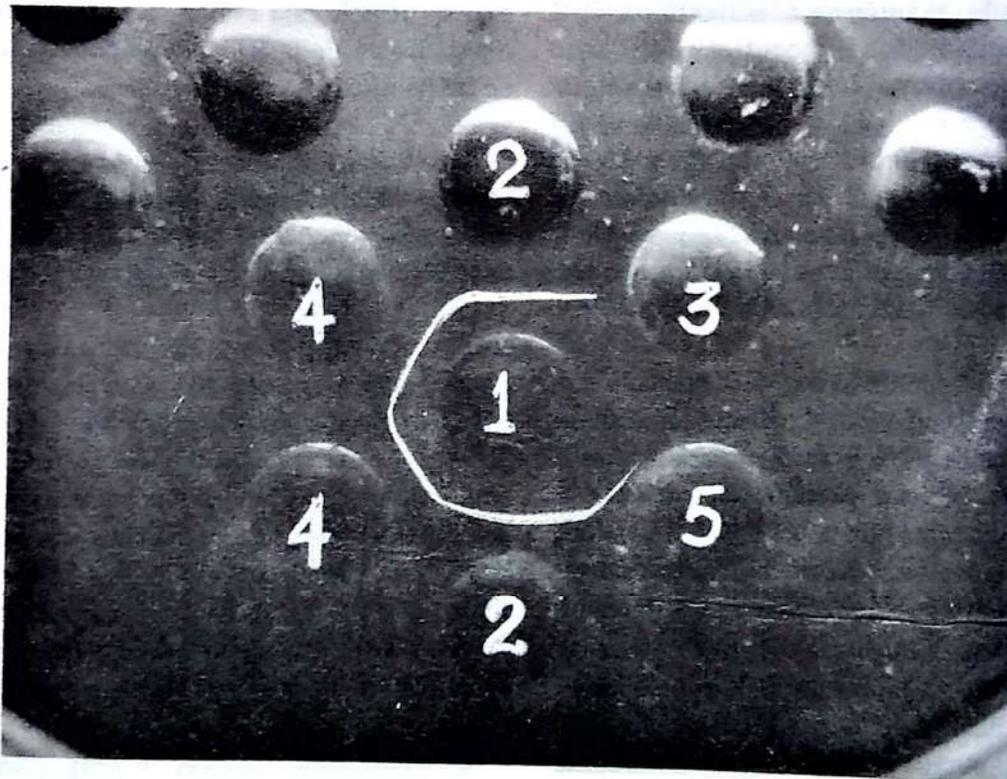


FIGURA 1. Línea de precipitación específica de extracto celular IBR (lote MDBK). (1) Extracto celular; (2) Suero de referencia control positivo; (3) Suero de referencia control negativo; (4) Suero diagnóstico positivo; (5) Suero diagnóstico positivo débil.

La concentración de antígeno obtenido de extracto celular de cultivo MDBK fue, en todos los casos, mayor y de mejor título que la obtenida de cultivos de riñón bovino (Tabla 1). Sin embargo, para ambos casos los sueros controles positivos y negativos, reaccionaron específicamente.

Para conocer las características de la línea de precipitación se efectuó una titulación en bloque; diluciones de sueros contra diluciones de antígeno, usando suero control positivo con título seroneutralizante de 1:64. La dilución 1:8 del antígeno mostró la línea de precipitación más definida cuando se enfrentó a la dilución 1:2 del suero de referencia.

En un intento de estandarización y para garantizar su reacción con sueros de bajo título, el antígeno se enfrentó por IDR a diluciones de suero control. En la Figura 2 se observan los diámetros de los anillos de precipitación, correspondientes a diferentes concentraciones de antígeno ante dilución 1:2 de suero control. La evaluación definitiva sobre número de unidades de antígeno precipitante recomendadas para ID está en proceso.

Se obtuvieron líneas de identidad completa entre el suero de referencia y sueros bovinos llegados para diagnóstico de IBR (Figura 1), que presentaron anticuerpos neutralizantes por la técnica de referencia (SN). No se observó reacción cruzada con sueros bovinos controles positivos para diarrea viral bovina, leucemia bovina, fiebre aftosa y para influenza-3. A partir de la distribución individual de un total de 333 sueros evaluados simultáneamente por SN e ID, se deducen valores de sensibilidad y especificidad de 97 y 96% respectivamente.

DISCUSION

Se considera que el antígeno obtenido brinda características apropiadas para permitir el uso de la ID como prueba de apoyo al diagnóstico de IBR. Es necesario mayor conocimiento de la estabilidad del antígeno, lo cual se logrará con el seguimiento sistemático de lotes cuantificados. La calidad de la línea de precipitación debe mejorar al establecer el número de unidades óptimas de antígeno. Por caracterización electroforética (geles de poliacrilamida) y ultracentrifugación se logrará un mayor conocimiento de la fracción soluble, que al parecer se trata de un componente glicoprotéico de la cubierta viral (5).

La prueba de SN se utiliza rutinariamente como prueba de referencia y por ello se utilizó para evaluar sensibilidad y especificidad de la ID a pesar de no hallar en la literatura valores para SN.

Los hallazgos para ID indican que la técnica es altamente confiable, lo cual unido a su sencillez y bajo costo justifica continuar el proceso de estandarización.

La obtención de resultados positivos por ID que se comprobaron negativos a SN se explicaría por la posible necesidad de mayor exactitud en el número de unidades de antígeno necesarias y a variaciones intrínsecas de las dos pruebas. La utilidad de la ID en estudio y diagnóstico de sueros que presentan factores tóxicos, para SN, se ha comprobado en algunas muestras trabajadas en el LIMV.

Es importante conocer la proporción de resultados falsos negativos, que podrían obtenerse de sueros de bajo título seroneutralizante. Por ello se intentará

continuar la utilización del antígeno en el seguimiento de animales en fase post-vacunal y post-infección, ya que los niveles de anticuerpos circulantes varían de acuerdo a la vía de entrada del virus (11). Es de considerar que la sensibilidad teórica de la prueba es inferior a la de SN y HAP (7); así que sería interesante efectuar una comparación de resultados con esta última prueba. Sin embargo, en evaluaciones no incluidas en este informe, se han logrado detectar sueros positivos con títulos SN tan bajos como 1:2.

Al igual que para SN, para la ID, no se conoce la correlación existente entre título de anticuerpos y protección, de tal manera que estos anticuerpos solo indican un contacto previo. Este aspecto será analizado posteriormente en estos laboratorios.

RESUMEN:

Se describe la preparación de un antígeno aplicable a la prueba de inmunodifusión a partir de cultivos celulares (MDBK) infectados con cepa de campo (5946) de virus rinotraqueitis infecciosa bovina. El antígeno fue evaluado cualitativa y cuantitativamente y establecidas las condiciones óptimas de la prueba.

Los resultados preliminares indican especificidad del antígeno obtenido y posibilidad de producción en cantidades suficientes. Sueros de título alto de anticuerpos neutralizantes permiten un alto porcentaje de identidad con resultados obtenidos por inmunodifusión, mientras que los sueros con títulos bajos (SN) requieren mayor estudio. Se discuten las ventajas de utilización de la técnica como apoyo para la detección de anticuerpos en el diagnóstico de la infección.

INMUNODIFFUSION ANTIGEN FOR DIAGNOSIS OF INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS ANTIBODIES. PRELIMINARY REPORT.

SUMMARY:

Preparation of a soluble infectious bovine rhinotracheitis antigen from tissue cultures (MDBK) is described and its standardization attempted.

Preliminary results showed good antigen yield, and good specificity and sensitivity were obtained as immunodiffusion was compared with seroneutralization test.

A complete evaluation is in progress for standardization of the test.

TABLA 1. COMPARACION DE CINCO LOTES DE ANTIGENO SOLUBLE IBR,
EXTRACTO CELULAR

Identificación	Título en DI50/ 0.05 ml.	Concentración proteína mg/ml*	Título IDD**	Título IDR ***
Lote 1 RB	$10^{3.5}$	3.5	2	—
Lote 2 RB	$10^{3.0}$	7.8	4	—
Lote 1 MDBK	$10^{5.5}$	13.6	8	32
Lote 2 MDBK	$10^{5.5}$	4.9	8	8
Lote 3 MDBK	$10^{5.7}$	9.8	8	32

* Evaluado a partir de extracto celular por el método de Folin-Ciocalteu.

** Recíproco de la mayor dilución de antígeno que produjo línea de precipitación específica con suero de referencia en inmunodifusión doble (ID).

*** Recíproco de la más alta dilución de antígeno que produjo un anillo de precipitación ante suero de referencia en inmunodifusión radial (IDR).

TABLA 2. DISTRIBUCION DE SUEROS (N – 333) EVALUADOS POR LA
TECNICA DE SERONEUTRALIZACION Y DE INMUNODIFUSION

Inmunodifusión doble (ID)	Seroneutralización (SN)		
	Posit.	Negat.	Total
Positivo	34	13	47
Negativo	1	285	286
Total . . .	35	298	333

$$\text{Sensibilidad} = 34/35 \times 100 = 97$$

$$\text{Especificidad} = 285/298 \times 100 = 96$$

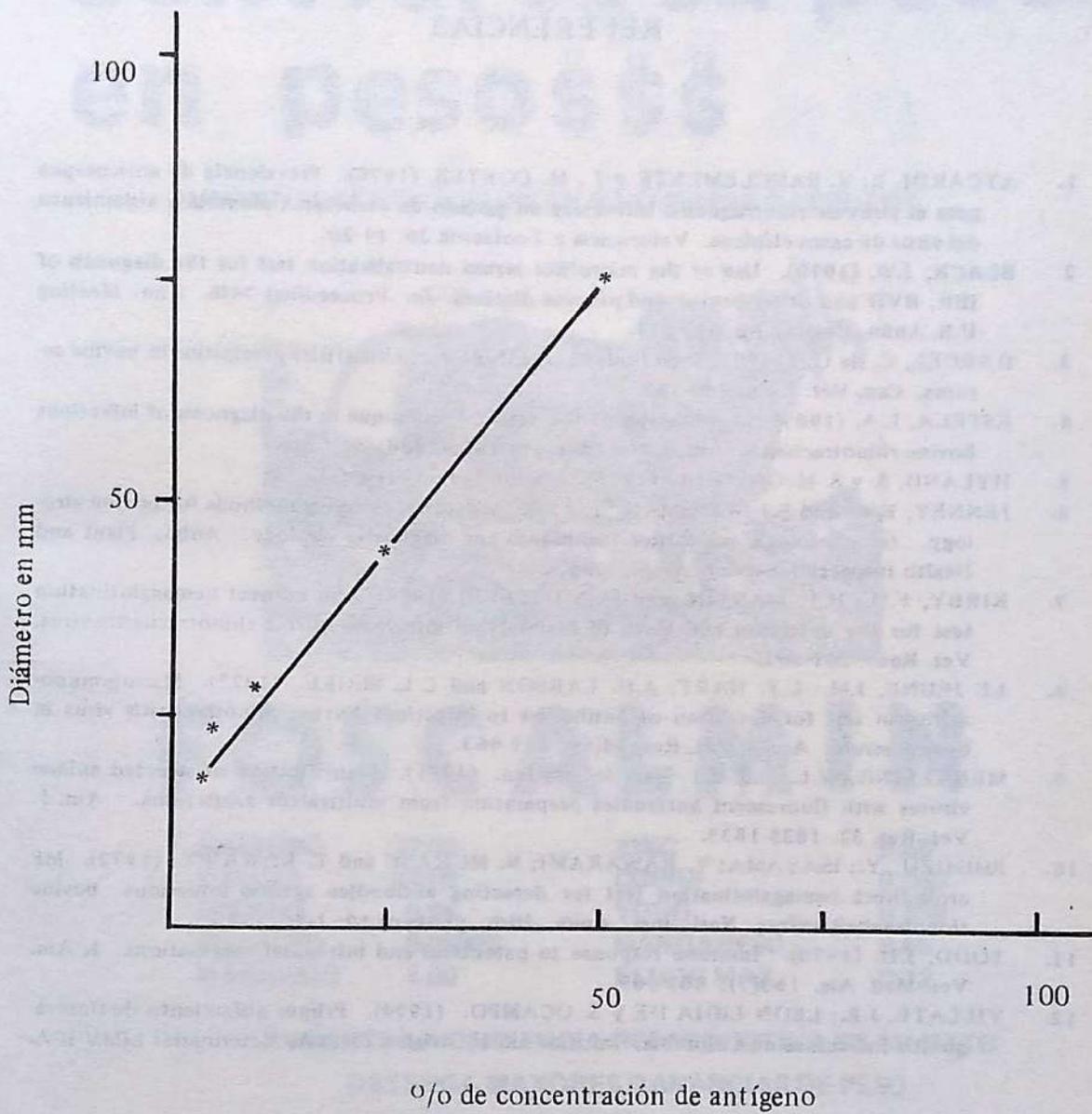


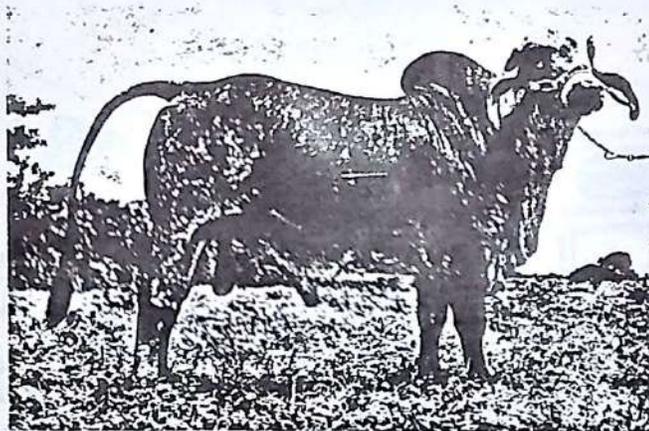
FIGURA 2. Relación entre la concentración de antígeno IBR y el diámetro del anillo de precipitación (mm²). Lote 1 MDBK.

REFERENCIAS

1. AYCARDI, E; V. SANCLEMENTE y J. M. CORTES. (1978). Prevalencia de anticuerpos para el virus de rinotraqueitis infecciosa en ganado de carne en Colombia y aislamiento del virus de casos clínicos. *Veterinaria y Zootecnia* 30: 14-20.
2. BLACK, J.W. (1970). Use of the microtiter serum neutralization test for the diagnosis of IBR, BVD and other bovine and porcine diseases. *In: Proceedings 74th. Ann. Meeting U.S. Anim. Health.* pp. 512-515.
3. DARCEL, C. de Q. (1977). Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) precipitins in bovine serums. *Can. Vet. J.* 18: 259-262.
4. ESTELA, L.A. (1967). Application of the agar gel technique in the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. *Am. J. Vet. Res.* 28: 1903-1904.
5. HYLAND, S. y S. MCGREGOR. (1977). Comunicación personal.
6. JENNEY, E.W. and S.J. WESSMAN. (1973). Microtiter serology methods for bovine virology. *In: Serologic microtiter techniques for diagnostic virology.* Anim. Plant and Health Inspection Service, Ames, Iowa.
7. KIRBY, F.D.; H.T. MARTIN, and D.C. OSTLER, (1974). An indirect hemagglutination test for the detection and assay of antibody to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Vet. Res.:* 361-362.
8. LE JEUNE, J.M.; L.T. HART; A.D. LARSON and C.L. SEGEF. (1977). Microimmunodiffusion test for detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine serum. *Am. J. Vet. Res.* 38(4): 459-463.
9. MENGELING, W.L. and M.J. Van der Matten. (1971). Identification of selected animal viruses with fluorescent antibodies preparation from multivalent antisera. *Am. J. Vet. Res.* 32: 1825-1833.
10. SHIMIZU, Y.; ISAYAMA; Y. KAWAKAMI; N. MURASE and T. KAWANO. (1972). Microindirect hemagglutination test for detecting antibodies against infectious bovine rhinotracheitis virus. *Natl. Inst. Anim. Hlth. (Tokyo)* 12: 1-7.
11. TODD, J.D. (1973). Immune response to parenteral and intranasal vaccinations. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 163(7): 807-809.
12. VILLATE, J.E.; LEON LIGIA DE y S. OCAMPO. (1974). Primer aislamiento de rinotraqueitis infecciosa en Colombia. Informe anual División Ciencias Veterinarias LIMV-ICA.

Convierta su peso en peso\$\$\$

AUMENTE LAS UTILIDADES EN SU EMPRESA GANADERA



FOSCALMIN

FOSFORO	12.00	ZINC	0.65
CALCIO	24.00	COBRE	0.065
HIERRO	0.65	YODO	0.039
COBALTO	0.00325	MANGANESO	0.65
MAGNESIO	1.00	FLUOR MAX.	0.12

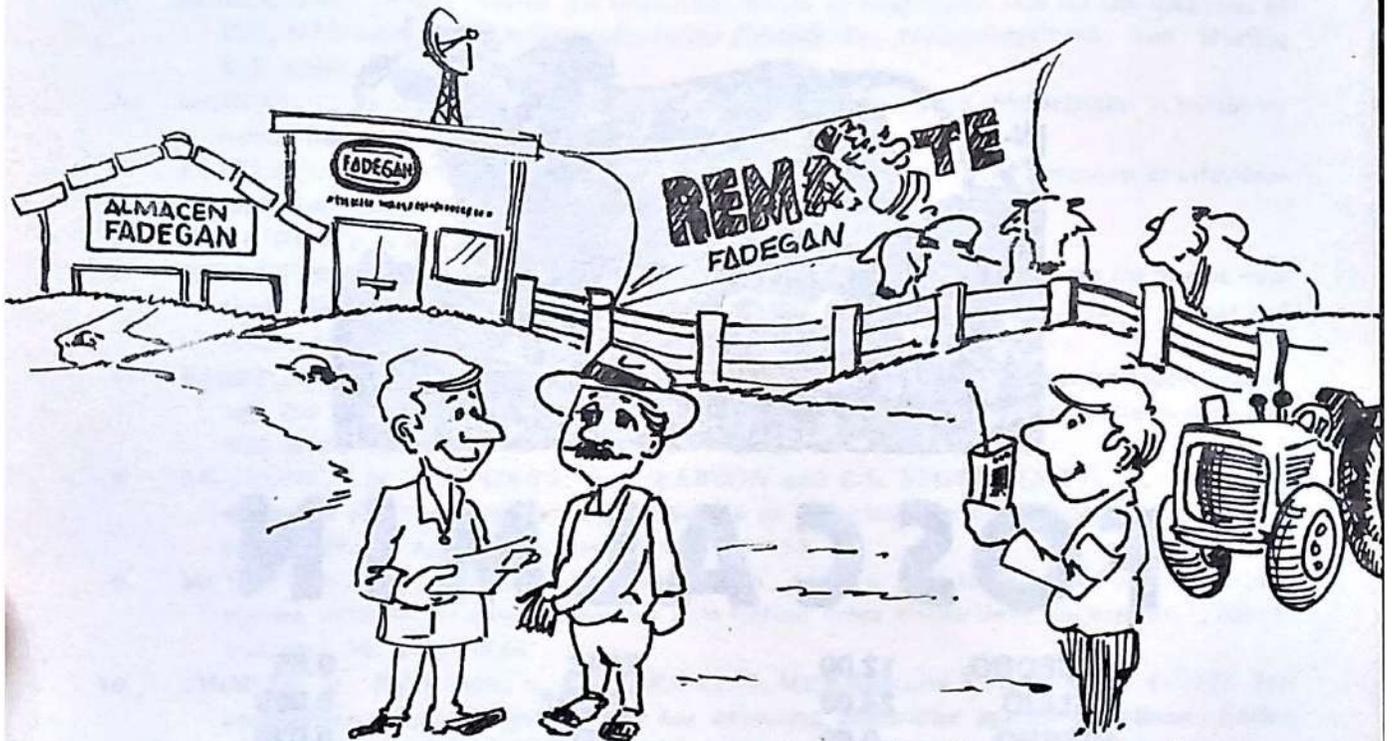
AUMENTE LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA DE SU HATO
OBTENGA MAYORES GANANCIAS DE PESO
LOGRE UNA MEJOR PRODUCCION DE LECHE
PREVENGA O CORRIJA LAS DEFICIENCIAS MINERALES DE
SU GANADO

MEZCLANDO CON EL ALIMENTO DE 15 A 20 KGS POR
TONELADA, OBTENDRA MAGNIFICOS RESULTADOS.

UN PRODUCTO CON LA CALIDAD



Qué bien sirve FADEGAN



La Federación Antioqueña de Ganaderos es una organización gremial que busca la defensa y desarrollo del sector, a través de la vigilancia de sus intereses y la prestación de servicios, así:

- * Asistencia técnica Agropecuaria
- * Asesoría Jurídica
- * Radioteléfono
- * Comunicaciones
- * Investigaciones económicas
- * Planta de sales y concentrados
- * Almacenes Agropecuarios
- * Desarrollo y Fomento
- * Importaciones
- * Comercialización de carnes
- * Maquinaria y vehículos para el campo



FEDERACION ANTIOQUEÑA DE GANADEROS

Sede, Calle 72 No. 64-155 Teléfono: 570800 Medellín