

Estandarización de la técnica de Elisa para rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB) y determinación de la prevalencia de la infección en el hato blanco orejinegro (BON) de Antioquia

RODAS JD MV.MS, ARBOLEDA JJ MV.MS,
ZULUAGA FN MV.MS, OSSA JE MV. PhD.*

Resumen

Con el objeto de contribuir a la caracterización de la RIB en el país nos dimos a la tarea de estandarizar una prueba de ELISA que nos permitiera realizar el diagnóstico epidemiológico de la infección en forma más económica y logísticamente menos compleja.

Basados en los resultados de 982 sueros previamente probados por Nt, estandarizamos una técnica de ELISA para RIB. El promedio de los delta de densidad óptica para los 796 sueros negativos por la prueba base fué de 0.077 (+/- 0.083 SD) y para los 186 positivos, de 0.52 (+/- 0.22 SD). De acuerdo con estos datos establecimos un punto de corte de 0.27, con el cual logramos una especificidad del 97% y una sensibilidad del 92% para el ELISA en suero sanguíneo y una concordancia con la prueba patrón de 96%.

Adicionalmente realizamos un estudio de la prevalencia de la infección para el hato Blanco Orejinegro (BON) de Antioquia.

Se probaron 593 sueros de ganado BON, obtenidos de cinco haciendas y se encontró una prevalencia del 11.5%. Este valor es más bajo que los descritos previamente para la población general en otras regiones geográficas del país. Es posible, de acuerdo con estos datos, recomendar el establecimiento de hatos libres de la infección, como una estrategia adicional para la preservación de esta raza autóctona en peligro de extinción.

Introducción

La RIB es una enfermedad herpética con sintomatología muy variada, pero generalmente asociada con rinotraqueitis, vulvovaginitis o balanopostitis y aborto; ocasionalmente se pueden presentar encefalitis, nefritis, mastitis y conjuntivitis (8,12). Su agente causante, el HVB-1, fué reconocido desde 1956 y en la actualidad se encuentra ampliamente diseminado en todo el mundo. Sólo se encuentran libres de la infección algunos países europeos tales como Noruega, Finlandia, Suecia, Suiza y Dinamarca (1,12).

En Colombia los primeros informes acerca de la presencia de este agente datan de 1972, año en el cual se lograron tres aislamientos a partir de muestras tomadas de mucosa vaginal y de cervix de animales destinados para sacrificio, en el matadero municipal de Villavicencio, procedentes de fincas con historia de abortos. Posteriormente se llevaron a cabo nuevos aislamientos en hatos lecheros de la sabana de Bogotá y en los Llanos Orientales en 1973 y 1974 respectivamente también, a partir de este mismo año, se realizaron múltiples estudios de prevalencia en departamentos que abarcaban las diferentes regiones

* 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

de la geografía nacional. Tales estudios detectaron una seropositividad que fluctuaba entre un 13% en la población general de la costa atlántica y un 67% en la población de toros en servicio del Urabá antioqueño (5,14).

Hasta el presente la técnica de diagnóstico utilizada en Colombia para la detección de anticuerpos contra la RIB ha sido la neutralización viral, la cual aunque es altamente específica, es susceptible de ser superada en sensibilidad, rapidez y costos por otras técnicas como el ELISA.

Aunque se cuenta con múltiples trabajos que muestran evidencia serológica de la enfermedad en hatos de leche y carne, tanto en el departamento de Antioquia como en el resto del país (2,5,10,14), ninguno de estos estudios se ha desarrollado en razas criollas como el ganado BON. El ganado BON es de particular interés en nuestro departamento por considerarse una raza adaptada al medio a través de 500 años de supervivencia en condiciones cuasi-silvestres.

Adicionalmente, la población BON del país no supera los 6.000 ejemplares, de los cuales la mitad son cruzados con otras razas (Asociación BON, comunicación directa). La población de ganado BON en Antioquia se calcula en alrededor de 800 a 1.000 individuos puros, pero no se tienen datos exactos.

El bajo número de ejemplares de esta raza y las características importantes que se le atribuyen, tales como la prolificidad y la rusticidad, esta última entendida como la adaptación al medio, son la mayor justificación para emprender estudios que apunten a su caracterización, recuperación y preservación.

El presente estudio enfocó dos problemas complementarios: primero, estandarizar una prueba de específica, sensible, fácil, y económica para el diagnóstico serológico de la RIB y, segundo usar dicha técnica para establecer la prevalencia de esta infección en el hato BON de Antioquia.

Materiales y Métodos

Producción y titulación del antígeno viral: Para el efecto se utilizó el procedimiento del ELISA para Citomegalovirus estandarizado por Correa y cols (6).

Brevemente, se preparó el antígeno a partir de células MDBK infectadas durante 72 horas, con el virus de referencia (cepa Wisconsin), mediante extracción con tampón de glicina y sonicación; en la misma forma se procesaron células no infectadas como antígeno control. Estas preparaciones se titularon a las diluciones 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400 en platos de 96 pozos de fondo en "U" (NUNC immunoplate UII) por triplicado, para buscar la dilución en la cual fuera posible hacer una mejor diferenciación entre las densidades ópticas obtenidas en los pozos con y sin antígeno para dos sueros controles positivos y dos sueros controles negativos, previamente definidos mediante neutralización (7), en diluciones de 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160.

Estandarización del ELISA: Para determinar el punto de corte con una dilución de antígeno 1:100 y una dilución del suero 1:80, se utilizaron 982 sueros bovinos previamente probados por neutralización (7), de los cuales 389 pertenecían al banco de sueros del laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia y 593 correspondían a sueros de animales de la raza BON, que fueron recolectados, específicamente, para los efectos de este estudio.

Los platos sensibilizados fueron conservados a -70°C y al momento de su uso fueron tratados con leche en polvo descremada al 2%, en tampón salino fosfatado (PBS 0.15M, pH 7.2), 100 ul/pozo/10min; luego se descartó este líquido y se agregaron 100 ul/pozo por duplicado en pozos con antígeno y control de antígeno, de cada suero a probar diluido 1:80 en tampón de dilución (PBS-Tween 20 al 4%); se incubó 1h/ 37°C mediante flotación en baño María y se lavó con solución de lavado (PBS-Tween 20 al 1%) en tres ocasiones. Posteriormente se adicionó la anti-inmunoglobulina G bovina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) 100ul/pozo; se incubó de nuevo en las mismas condiciones antes descritas, se lavó con PBS-Tween y se agregaron 100ul/pozo del sustrato P-nitrofenilfosfato (Sigma) 1mg/ml, diluido en tampón de sustrato; se incubó Temp.amb./45 min. en la oscuridad y finalmente se agregaron 50ul/pozo de NaOH 2N para detener la reacción y proceder a la lectura espectrofotométrica a 405 nm (Minireader Uniskan II).

Población de estudio y toma de muestras: Para el estudio se obtuvieron 593 muestras de 5 hatos del departamento de Antioquia ubicados en los municipios de San José del Nus, Barbosa, Medellín, Rionegro y Uramita. Las muestras de 10cc de sangre fueron tomadas por punción de la vena yugular, en tubos al vacío y posteriormente fueron transportadas al laboratorio, bajo refrigeración, donde se separó el suero por centrifugación para conservación a -20°C hasta su uso.

Análisis estadístico: Para la obtención del punto de corte del ELISA 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) (6).

Tamaño de la muestra: basados en la tabla para determinación del tamaño muestral en estudios descriptivos con respecto a una población infinita, el número de sueros utilizados para la estandarización del ELISA (982), brinda un límite de confianza del 99.7% y un margen de error del 5% (4).

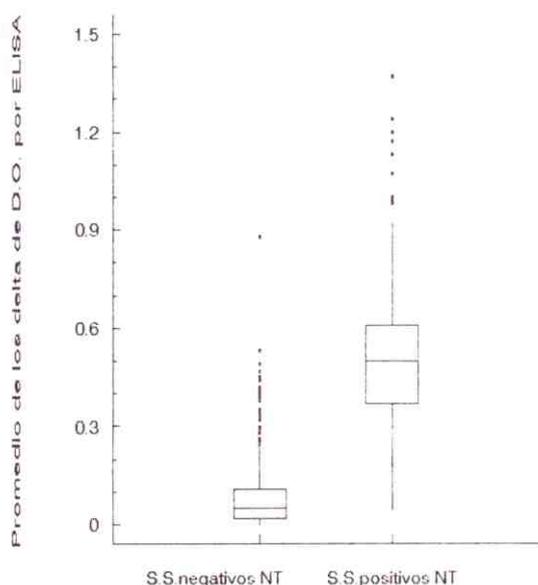


Figura 1. Gráfica múltiple de cajas y bigotes para S.S.
 S.S.... Sueros sanguíneos
 D.O. ... Densidad óptica.
 N.T. ... Neutralización

Resultados

Estandarización de la técnica de ELISA

De los 982 sueros bovinos probados, 186 resultaron positivos (18.94%) por neutralización y 796 (81.06%) fueron negativos.

Al realizar la prueba de ELISA los sueros negativos presentaron un promedio de delta de absorbancia de 0.077 (+/- 0.083 SD), mientras que para los sueros positivos el promedio fue de 0.52 (+/- 0.22 SD) (véase Figura 1).

La observación de la gráfica de cajas y bigotes de sueros positivos y negativos nos acercó a la aproximación del punto de corte basados en el promedio de los sueros negativos más dos desviaciones estándar (0.24 aprox.), valor por debajo del cual se encontrarían el 95% de los datos negativos en una distribución normal.

A partir de este valor y hasta 0.30 se probó reiterativamente la concordancia entre las pruebas. Finalmente encontramos que 0.27 es el valor con el cual se logra la mayor concordancia entre ambas técnicas (946/982, 96.2%), con una especificidad del 97% (773/796) y sensibilidad del 92% (171/186), como se puede apreciar en la siguiente tabla de contingencia. (Tabla 1) que indica los resultados obtenidos por neutralización (NT) y Elisa en suero sanguíneo.

Tabla 1. Resultados obtenidos por NT y Elisa en suero sanguíneo

		Elisa		
	NT	Pos	Neg	Total
Pos		171	15	186
Neg		23	773	796
Total		194	788	982

Como puede observarse 15 (1.5%) sueros positivos por neutralización fueron negativos por ELISA y 23 (2.3%) negativos por neutralización fueron positivos por Elisa.

Prevalencia de RIB en el hato BON de Antioquia

La prevalencia de infección con el HVB-1, fue de 11.5% por neutralización y de 12.14% por la prueba de ELISA.

Los resultados serológicos para los hatos muestreados, por cada una de las dos pruebas utilizadas fueron los siguientes. Tabla 2.

Tabla 2. Sueros positivos por NT y Elisa para los hatos BON muestrados en Antioquia

	n	NT	ELISA
ICA - San José del Nus	339	34(10%)	33(9.7%)
Universidad de Antioquia	93	5(5.4%)	7(7.5%)
Rionegro	74	6(8.1%)	6(8.1%)
Universidad Nacional	48	3(6.3%)	7(14.6%)
Uramita	39	20(51%)	19(49%)
Total	593	68(11.5%)	72(12.14%)

De acuerdo con los anteriores resultados la concordancia por ambas pruebas para los 593 sueros BON fué del 98.65% (585/593)

Discusión

El ELISA ha ocupado un lugar privilegiado entre las pruebas serológicas, en la última década; la rapidez en la obtención de los resultados, su facilidad de ejecución y la gran sensibilidad y especificidad la convierten en una de las herramientas más apropiadas para el diagnóstico serológico de las entidades virológicas en general (3,9,13).

Los resultados del presente trabajo indican que la prueba de ELISA descrita, representa una alternativa diagnóstica altamente específica para RIB, si se la compara con la neutralización como prueba de referencia. Los resultados falsos negativos, es decir positivos por neutralización y negativos por la nueva prueba, podrían atribuirse a la presencia de IgM en individuos infectados en forma aguda o reciente, isotipo que no se buscó en la prueba de ELISA.

De otro lado, los falsos positivos podrían ser explicados como falsos negativos de la neutralización, bien por baja sensibilidad de la prueba o por un fenómeno de potenciación dependiente de anticuerpos, como el descrito en otras familias virales como la

Flaviviridae (11). La segunda alternativa no pudo ser confirmada, pero la primera sí explicó por lo menos una tercera parte de la discordancia, pues al probar de nuevo los sueros por neutralización en una dilución de 1:4 se detectaron anticuerpos.

De esta manera, sin dejar de reconocer la prueba de neutralización como aquella que por su especificidad sigue siendo la prueba patrón para el HVB-1, se debe tener en cuenta que esta técnica, por emplear cultivos celulares, requiere de equipos y destrezas especializadas y de períodos de tiempo más largos para la obtención de resultados. Adicionalmente, el desarrollo de técnicas de diagnóstico más eficientes y menos dependientes de la importación de insumos, le permite a los investigadores del país el desarrollo de proyectos tendientes a caracterizar, a un menor costo, y con mayor participación desde el punto de vista de la creatividad, los problemas nacionales de salud.

En cuanto a la prevalencia de la RIB observada en el hato BON de Antioquia, podríamos decir que es baja (11.5%), si la comparamos con trabajos previos en el departamento y en otras regiones (2,5,10,14). Esto sugiere la posibilidad de erradicación basados en las experiencias de otros países(1).

De otra parte la seropositividad podría estar relacionada con las condiciones de manejo de cada hato si tenemos en cuenta que la prevalencia en la hacienda de Uramita cuya población representa menos del 10% del número total de datos, aporta el 30% del total de animales seropositivos.

En resumen, se estandarizó una prueba que permite iniciar estudios de prevalencia más extensos y comparativos entre varias regiones y razas de ganado; y la técnica ha sido aplicada al estudio del problema en la raza BON que representa un potencial genético que es necesario salvar y caracterizar, por ser el resultado de la adaptación cuasi-natural a las condiciones del país a través de 500 años de sobrevivencia en este medio.

Summary

Standardization of an ELISA Technique for Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) and Determination of the prevalence of infection in the Blanco Orejinegro (BON) cattle from Antioquia, Colombia.

With the objective of contributing to the characterization of IBR in Colombia, we commit ourselves to standardize an ELISA test to improve the serologic diagnostic BHV-1 infection.

The ELISA test was standardized with 982 neutralization tested serum samples. The delta averages of optical density for 186 and 796 positive and negative sera by ELISA, were 0.52 and 0.077 with standard deviations of 0.22 and 0.083 respectively. A cut off point was established at 0.27 and the specificity and sensibility were 97 and 92 % respectively. The % of concordance between ELISA and NT was 96%.

A prevalence study was carried out in BON cattle from Antioquia. 593 (representing 80% of the which universe) serum samples were taken and tested from 5 pure breeding farms. 11.5 % of prevalence was found. This finding is lower than those found on previous studies in Colombia. The results suggest that the establishment of a herd free infection policy could be a good choice to aid in the objective of preserving autochthonous Colombian cattle.

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. BARRERA M, PERALTA E L y NODA J. Técnica ELISA para detectar anticuerpos contra el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina. *Rev. Salud Animal* 1987;9:96-101.
4. 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.
5. CIAT. Informes anuales. *Salud animal*. 1972,1973,1974,1975.
6. 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.
7. 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.
8. KRAMPS J A,QUAK S,WEERDMEEESTER 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. FENNER F, BACHMAN P, GIBBS E, et al. *Veterinary Virology* Orlando: Academic Press, 1987. 660p.
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. STPHENSON JR.(1988).Flavivirus vaccines. En: *Vaccine* vol 6
12. TIKOO S.K., CAMPOS M. and BABIUK L.A. Bovine Herpesvirus-1: Biology, pathogenesis and control. *Advances in Virus Research*. 1995. Vol 45 p. 191-223.
13. 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.
14. ZUÑIGA 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.