

## DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DE UN ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1

Alejandro R. Valera S. (Med. Vet.)<sup>1</sup>; Cecilia M. Galosi O. (Dra. Cs. Vet.)<sup>2,3</sup>;  
María G. Echeverría A. (Dra. Cs. Vet.)<sup>2,4</sup>; María P. Silvestrini G. (Med. Vet.)<sup>1</sup>;  
Jorge R. Romero B. (Dr. Cs. Vet.)<sup>1</sup>; Edgardo O. Nosetto K. (Dr. Cs. Vet.)<sup>2,5</sup>

### DEVELOPMENT AND STANDARIDIZATION OF AN INDIRECT ELISA TO DETECT ANTIBODIES AGAINST BOVINE HERPESVIRUS 1

*An indirect enzyme linked immunosorbent assay (I-ELISA) was developed to detect antibodies to BHV-1 in serum samples. Nonidet P40-solubilized infected with BHV-1 reference strain and mock-infected cell lysates were used as antigens. Serum samples were diluted 1: 64 and a commercial horse radish peroxidase-labelled rabbit anti-bovine IgG was used as second antibody. The reaction was developed using azino-dietilbenzotiazol-sulfonate (ABTS). Cut-off was determined by ratio sample (Rs). Virus neutralization (VN) test was used as a reference test over the 587 samples, 416 of them were positive by VN and I-ELISA, 145 were negative by both techniques, and 26 were positive by I-ELISA and negative by VN. Using VN as standard, the ELISA showed a relative specificity and sensibility of 100 and 84.79%, respectively.*

**PALABRAS CLAVES:** Herpesvirus bovino 1; diagnóstico; ELISA indirecto.

**KEY WORDS:** Bovine Herpesvirus 1; diagnosis; Indirect ELISA

## INTRODUCCIÓN

La rinotraqueítis infecciosa bovina (RIB) es una enfermedad causada por un virus clasificado dentro de la familia Herpesviridae. Existen cinco tipos de virus herpes que poseen como hospedador natural al bovino, designados como Herpesvirus bovino (VHB) 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente. El VHB-1 se encuentra serológicamente relacionado con la RIB, vulvovaginitis pustular infecciosa (VPI), balanopostitis (BPI) y encefalomiелitis no supurativa. También está relacionado con síntomas oculares, entéricos, neonatales y dermatitis infecciosas (Gibbs y Rweyemamu, 1977). La infección por VHB-1 se traduce en tres formas clínicas que pueden ocurrir simultáneamente o en forma aislada, siendo éstas: respiratoria, genital y abortigénica. En cualquiera de estos casos las pérdidas económicas son de gran impacto en la producción pecuaria.

neamente o en forma aislada, siendo éstas: respiratoria, genital y abortigénica. En cualquiera de estos casos las pérdidas económicas son de gran impacto en la producción pecuaria.

La RIB es una enfermedad de distribución mundial, conocida en Estados Unidos de Norteamérica desde 1954. En Argentina fue diagnosticada por primera vez en 1968, aunque se la menciona desde 1959 (Bowes y col., 1970; Lager y col., 1981). El virus fue aislado por primera vez en el país en 1972 (Epstein y col., 1972). Estudios más recientes (Maliandi y col., 1996) indicaron que la infección con VHB-1 se detectó en el 97,68% de los establecimientos muestreados, siendo la prevalencia promedio en cada establecimiento de 45,5%. Aunque los estudios fueron regionales en la mayoría de los casos, todos demuestran la importancia de la enfermedad y su alta prevalencia (Di Santo y col., 1996; Fort y col., 1996).

La técnica de virus neutralización (VN) es desde hace años la prueba serológica de referencia para la detección de anticuerpos (AC) (Payment y col., 1979). La inmunofluorescencia es una alternativa confiable, rápida y relativamente más sensible que la VN (Payment y col., 1979; Assaf y col., 1975) aunque ofrece

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Veterinarias (CEDIVE), Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP, Ruta 2 Km 116, CC147 (7130) Chascomús, Bs. As.

<sup>2</sup>Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

<sup>3</sup>Investigador Adjunto Comisión de Investigaciones Científicas, Provincia de Buenos Aires (CIC).

<sup>4</sup>Investigador Asistente CONICET.

<sup>5</sup>Investigador Adjunto CONICET.

dificultades técnicas y errores de interpretación ocasionados por la subjetividad del operador. El enzimo inmuno ensayo (ELISA) es utilizado en virología como reemplazante de la VN convencional, por ser de similar especificidad y sensibilidad superior y el ELISA indirecto (ELISA-I) ya es usado para el serodiagnóstico de diversos Herpes virus animales (Galosi y col., 1993; Hohdatsu y col., 1986; Dutta y col., 1983; Nosetto y col., 1992; Payment y col., 1979). El objetivo de este trabajo fue desarrollar una técnica alternativa a la VN para el diagnóstico serológico de la RIB, que fuera confiable, rápida y permitiera analizar una gran cantidad de muestras a un costo reducido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Células y virus:* se utilizó la línea celular RK13 (riñón de conejo). Los cultivos celulares se desarrollaron con Medio Mínimo Esencial (MEM, Nissui, Japón) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), antibióticos y 0,3 mg/ml de glutamina (MC). Para la preparación de los Antígenos (Ag) se utilizó la cepa viral Los Angeles de BHV-1 [LA, Estados Unidos - 1956] (Gibbs y Rweyemamu, 1977), de título  $10^{5,75}$  DICT 50%/0,05 ml, obtenida a través del Veterinary Microbiology and Preventive Medicine, Iowa State University, Estados Unidos. El medio de mantenimiento celular fue el mismo que el anterior pero libre de SFB (MSS).

*Antígeno soluble:* monocapas celulares completas fueron inoculadas con multiplicidad de infección 0,5 e incubadas a 37°C con MSS. Cuando se observó efecto citopatogénico generalizado las células fueron recogidas junto con los sobrenadantes y centrifugadas a 8000 x g durante 20 minutos a 4°C (Centrifuga refrigerada Tomy Seijo RS-20). El "pellet" se lavó dos veces con "buffer" TE (Tris 0,01M, EDTA 0,001M pH 7,4) y luego se resuspendió en el mismo "buffer" con el agregado de 1% de Nonidet P40 (NP40), en un volumen 200 veces menor al volumen de MSS sobrenadante original. Se centrifugó 15 minutos a 4000 x g y luego a 100.000 x g durante 60 minutos (Ultracentrifuga Beckman L8-80). El sobrenadante se utilizó como Ag viral (AgV), y se conservó a -20°C. Con la misma metodología se elaboró Ag control partiendo de células no infectadas (AgC).

*Sueros:* se utilizaron cuatro lotes de sueros: S<sub>1</sub>) Cuatro sueros positivos de casos clínicos de VHB-1 y cuatro sueros negativos a VHB-1 previamente analizados por VN. Todos conservados en alícuotas a -80°C. S<sub>2</sub>) 587 muestras de sueros tomados al azar de rodeos bovinos. S<sub>3</sub>) Un suero positivo y un negativo de referencia a

VHB-1 obtenidos a través del National Institute of Animal Health, Tsukuba, Japón. S<sub>4</sub>) Sueros heterólogos positivos a (VHS-1); VHE-1 y VHE-4. Todos los sueros fueron inactivados a 56°C durante 30 minutos.

*VN:* se desarrolló la técnica convencional en microplacas utilizando virus fijo-suero variable (Assaf y col., 1975).

*ELISA-I:* los Ag (AgV y AgC) fueron titulados diluyéndolos en buffer carbonato-bicarbonato 50 mM pH=9,6 y colocándose 0,1 ml de cada dilución a partir de la dilución 1: 15, en base dos, desde la columna 1 a la 12 en microplacas (Nunc Maxisorb), las cuales se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda, siendo posteriormente bloqueadas durante 60 minutos a 37°C con ovoalbúmina al 0,1% o solución tamponada de fosfatos (PBS) con el agregado de Tween 20 al 0,005% (PBST) (IAEA, 1989). Esta última solución se utilizó también para el lavado y como diluyente de sueros y conjugado. Posteriormente y luego de tres lavados se agregaron los sueros del grupo S<sub>1</sub> diluidos desde 1: 20, en base dos, desde la fila A hasta la H, y se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Se lavaron tres veces y luego se incorporó a toda la placa 0,1 ml por pocillo de anti-gamaglobulina bovina conjugadas con peroxidasa (EY Laboratories, Estados Unidos) en la dilución 1:1000. Las placas se incubaron nuevamente durante 60 minutos a 37°C, se lavaron tres veces y por último se adicionó 0,1 ml por pocillo de solución de sustrato (ácido cítrico 0,1M; Fosfato disódico 0,2M; peróxido de hidrógeno al 0,01% y azinodietilbenzotiazol-sulfonato (ABTS) —Sigma— 0,3 mg/ml). Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos fueron leídos utilizando un filtro de 405 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Titertek Multiskan Flow Laboratory, Reino Unido), a distintos intervalos de tiempo.

Para determinar el límite superior de negatividad se emplearon los sueros de los grupos S<sub>1</sub> y S<sub>3</sub>, enfrentándolos a la dilución óptima de AgV y AgC. El límite superior de negatividad se estableció según los parámetros fijados por la Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA, 1989), considerándolos la DO promedio de muestras negativas por VN más un desvío estándar [DOX<sub>n</sub> + 1DE]. Todos los sueros que enfrentados con el AgV tuvieron DO superior a los valores resultantes de la fórmula anteriormente citada fueron enfrentados al AgC.

Para establecer el punto de corte se utilizaron los sueros de los grupos S<sub>2</sub> y S<sub>3</sub>. La expresión del punto de corte se calculó por dos metodologías.

1. La DO promedio de la población negativa por VN y ELISA más un desvío estándar (DOX<sub>n</sub> + 1 DE).

2. El cociente (Cm) entre la diferencia de la DO de la muestra problema (DOm) y la DO promedio de las muestras control negativo (DOXc), y la diferencia entre los promedios de las DO de las muestras débil positivas (DOXdp) y la DO promedio de las muestras control negativo (DOXc) (Manual Herdecheck, 1986).

$$Cm = \frac{Dom - (DO-Xc)}{(DOXdp) - (DO-Xc)}$$

Para el análisis de los resultados se utilizó el software S.A.S.® (Statistical Analysis System), siendo los procedimientos utilizados: el análisis de chi cuadrado, sensibilidad y especificidad, índice Kappa y el procedimiento GLM para el cual se utilizó un diseño experimental anidado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se desarrolló un ELISA indirecto para detectar Acs contra VHB-1. La utilización de un Ag soluble preparado con células infectadas con virus resultó satisfactoria debido a que no fue necesaria la inactivación del virus, ya que con el uso de NP40 en el proceso de elaboración se destruyen los viriones (Hohdatsu y col., 1986).

El Ag reaccionó específicamente con los sueros positivos del grupo S<sub>1</sub>, determinándose una dilución óptima constante de uso de 1:1000, correspondiente a 4.4 ug de proteína por pocillo. La dilución 1: 64 de los sueros redujo el color de fondo inespecífico por lo cual se decidió utilizar esta dilución para todos los sueros problema.

No se observó reacción positiva, cruzada o inespecífica con el Ag enfrentado a los sueros del grupo S<sub>4</sub>. El uso de PBST como solución de bloqueo y diluyente de los sueros minimizó la inespecificidad de color, respecto al uso de ovoalbúmina en las mismas condiciones. El tiempo de lectura se estandarizó en 20 minutos y/o una DO de 1100 a 1300 del grupo S<sub>3</sub>. Todos los sueros del grupo S<sub>3</sub>, cuya DO fue superior a 725 con el AgV fueron posteriormente enfrentados al AgC.

Teniendo en cuenta el Cm se consideraron: negativo, Cm = < 1; débil positivo, Cm entre 1 y 1,3; y positivo franco Cm = ≥ a 1,4.

El análisis de ambos métodos estadísticos resultó significativo con p < 0.01 para chi cuadrado, valor del índice Kappa 0.872 (Martin y col., 1997) y p < 0.05 para GLM.

El análisis de los resultados utilizando la fórmula Cm, tuvo una interpretación más homogénea.

La sensibilidad de la técnica fue de 100% y la especificidad de 84,79%. (Tabla 1).

**TABLA 1**

RESULTADOS OBTENIDOS SOBRE 587 SUEROS DE CAMPO FRENTE AL VIRUS HERPESBOVINO-1 ANALIZADOS POR VIRUS NEUTRALIZACIÓN Y ELISA-I

	VN+	VN-	Total
ELISA+	416(a)	26(b)	442
ELISA-	0(c)	145(d)	145
Total	416	171	587

Sensibilidad = a x 100/a+c = 100%

Especificidad = d x 100/b+d = 84,79%

Nuestros resultados demuestran que este ELISA-I es específico para la detección de Ac contra VHB-1 y muy sensitivo para la detección de bajos niveles de Ac. Cuando la técnica fue aplicada a un gran número de muestras la alta sensibilidad se hizo evidente. Comparativamente con la VN el ELISA-I es menos costoso, consume menor tiempo y podría ser usado para titular rápidamente gran cantidad de sueros.

## RESUMEN

Se desarrolló un ELISA indirecto para el diagnóstico de VHB-1, utilizando un antígeno soluble elaborado con una cepa viral de referencia. Los sueros se emplearon en la dilución 1:64 y como segundo anticuerpo se utilizó un suero comercial anti IgG bovina conjugado con peroxidasa. La reacción fue revelada con Azino-dietilbenzotiazol-sulfonato (ABTS) y agua oxigenada. Se determinó el punto de corte de acuerdo al cociente entre las densidades ópticas de las muestras problema (Cm) y los sueros de referencia. Los resultados fueron comparados con los obtenidos por Virus Neutralización (VN). Se analizaron 587 muestras de suero bovino tomadas al azar, de las cuales 416 resultaron positivas por ELISA y VN, 145 negativas por ambas técnicas y 26 positivas por ELISA y negativas por VN. La sensibilidad y especificidad fue de 100 y 84,79% respectivamente.

## REFERENCIAS

- ASSAF, R.; MARSOLAIS, G.; MAROIS, P.; PAYMENT, P. 1975. Correlation between the serum neutralization test and the indirect immunofluorescent test for the detection of specific antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Can. J. Comp. Medicine* 39: 224-226.
- BOWES, N.; NISNOVICH, L.; MORGAVI, M. 1979. Reproducción experimental de rinotraqueítis bovina. *Gaceta Veterinaria* 32: 181-186.

- DI SANTO, M.L.; SCHETINO, D.M.; GOGORZA, L.M.; TORRES, J.O.; MORÁN, P.E.; ARROYO, G.H.; LARGHI, J.L.; PARDO, D.A. 1996. Infecciones virales del bovino: Herpes virus bovino-1 (VHB-1) y virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) en un rodeo de tambo y otro de cría, Tandil, Argentina. Resumen del V Congreso Argentino de Virología, Tandil, 24-27 de abril de 1996.
- DUTTA, S.K.; TALBOT, N.C.; MYRUP, A.S. 1983. Detection of equine herpesvirus-1 antigen and the specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 44: 1930-1934.
- EPSTEIN, B.; GIL TURNES, G.; ETCHEVERRIGARAY, M.E. 1972. Aislamiento de virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina y *Listeria monocytogenes* de un feto bovino. *Estrato de Veterinaria XX*: 235.
- FORT, M.C.; IBARGUREN, C.; BUSETTI, M.R.; ESAIN, F.; PÉREZ, L.R. 1996. Prevalencia de Acs contra el herpes virus bovino-1 (VHB-1) en la población bovina de dos departamentos de la provincia de la Pampa. Resumen del V Congreso Argentino de Virología, Tandil, 24-27 de abril de 1996.
- GALOSI, C.M.; OLIVA, G.A.; NOSETTO, E.O.; TOHYA, Y.; ETCHEVERRIGARAY, M.E. 1993. Desarrollo de un enzimo-inmunoensayo indirecto para el diagnóstico del virus Herpes Equino tipo 1. *Rev. Med. Vet.* 74: 275-278.
- Gibbs, E.P.J.; Rweyemamu, M.M. 1977. Bovine herpesvirus. Part 1. *The Veterinary Bulletin* 47: 317-332.
- HOHDDATSU, T.; EIKI, T.; IDE, S.; YAMAGISHI, H. 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to equid Herpesvirus type 1 (EHV-1). *Jpn. J. Vet. Sci.* 48: 1045-1048.
- LAGER, I.; FONDEVILA, N.; SADIR, A.M.; FERNÁNDEZ, F.; SCHUDEL, A.A. 1981. Rinotraqueítis infecciosa bovina (HVB-1) 1: Aislamiento y caracterización biológica del agente etiológico (L-114). *Rev. Med. Vet.* 62: 404-410.
- MALIANDI, F.S.; FERNÁNDEZ, F.; BARRANDEGUY, M.; GAMMELGARD, M.; CORVA, S. 1996. Encuesta epidemiológica sobre infecciones virales en bovinos lecheros. Resumen del V Congreso Argentino de Virología, Tandil, 24-27 de abril de 1996.
- Manual Herdchek™ anti-PRV ELISA. Agritech Systems inc., 1986.
- Manual of ELISA, International Atomic Energy Agency (IAEA) publication, joint FAO/IAEA Division, Viena, 1989.
- MARTIN, S.; MEEK, A.H.; WILLEBERG, P. 1997. *Epidemiología Veterinaria. Principios y Métodos*, Ed. Acribia. Zaragoza (España), 71-85.
- NOSETTO, E.O.; ECHEVERRÍA, M.G.; GIMENO, E.J.; PECORARO, M.R.; ETCHEVERRIGARAY, M.E. 1992. Development of an indirect and a dot ELISA to detect antibodies to Pseudorabies virus in Argentina. Proceeding of a Final Research Coordination Meeting of an FAO/IAEA/SIDA regional network for Latin america on animal disease diagnosis using immunoassay and labelled DNA probe techniques, IAEA: 58-64.
- PAYMENT, P.; ASSAF, R.; TRUDEL, M.; MAROIS, P. 1979. Enzyme-Linked immunosorbent assay for serology of infectious bovine Rhinotracheitis virus infections. *J. Clin. Microbiol.* 10: 633-636.
- SÁNCHEZ VIZCAÍNO, J.M. 1980. Manual sobre el enzimo inmuno ensayo (ELISA) en patología animal. I.N.I.A. Madrid, España.