



PUESTA A PUNTO DE LA TECNICA INMUNOENZIMATICA (ELISA)

PARA EL DIAGNOSTICO DE LA RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA (IBR)

Y SU COMPARACION CON LA SERONEUTRALIZACION

J. Saizar¹

H. Guarino²

F. Capano³

RESUMEN

Se puso a punto la técnica inmunoenzimática de ELISA para la identificación de anticuerpos contra la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR). Se empleó antígeno altamente purificado en gradiente de tartrato de potasio y se determinaron las diluciones óptimas de suero, antígeno y conjugado, mediante el sistema de diluciones múltiples. Como sueros control positivo y negativo, se estableció un pool de sueros positivos y negativos a la Seroneutralización (SN), que se congelaron y utilizaron como standards en cada reacción. Los resultados se expresaron en unidades, para evitar las variaciones de Densidad Óptica (D.O.) entre placas. La técnica se comparó con la SN. Del total de sueros procesados, el 52% resultó positivo a la técnica de ELISA y sólo un 28.5% a SN. La técnica de ELISA demostró ser más rápida, simple y sensible.

INTRODUCCION

La técnica inmunoenzimática ELISA para el diagnóstico de anticuerpos contra diversas enfermedades infecciosas de etiología viral y bacteriana, ha demostrado una mayor sensibilidad, rapidez y sencillez frente a las técnicas comunmente empleadas hasta la fecha (1, 2, 4, 5, 6, 9). Esto es particularmente cierto en el caso de enfermedades virales donde se emplean cultivos celulares para su diagnóstico, por las ventajas que representa no depender de éstos, con todos los inconvenientes que traen aparejados (contaminación, variación del título viral, reacciones inespecíficas, contaminación del cultivo con cepas virales no citopatogénicas, u otros contaminantes).

^{1 2 3} Centro de Investigaciones Veterinarias "Miguel C. Rubino", Dpto. de Virología.

Por otra parte, el empleo de un antígeno altamente purificado elimina la presencia de restos celulares así como otros contaminantes de las células (micoplasmas, virus no citopatogénicos) (1,7), que puedan interactuar con los sitios de reacción del anticuerpo, evitando los falsos positivos. La inoculación de conejos con sobrenadante celular no infectado da lugar a la formación de anticuerpos anti-sobrenadante celular. En un país donde los animales son inmunizados periódicamente con vacunas producidas en cultivos celulares, se pueden encontrar anticuerpos contra el sobrenadante celular, lo que invalidaría cualquier reacción inmunoenzimática dirigida a la identificación de anticuerpos séricos específicos. Para evitar estas reacciones inespecíficas, se requieren mayores diluciones del suero, lo que disminuye la sensibilidad de la prueba (1).

En el presente estudio, se empleó antígeno altamente purificado y se preparó un pool de sueros positivos y negativos a la SN, que fueron empleados como control standard en cada reacción. Para evitar las variaciones de D.O. interplacas, los resultados de D.O. de las diluciones del suero control (+) fueron referidos a unidades arbitrarias. Ambos parámetros, D.O. y unidades fueron correlacionados por regresión lineal. Todos los valores de D.O. de las muestras fueron convertidos en unidades equivalentes a las del suero de referencia, para lograr una significación analítica correcta (6).

Esta prueba se comparó con la SN, para determinar si existe correlación de resultados y de su sensibilidad específica.

MATERIALES Y METODOS

Virus IBR - Producción

El virus IBR cepa Cooper proporcionada por la Universidad de Davis, California, se produjo en monocapas de células de la línea Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), confluentes en un 80%, en botellas de 75 cm³. Las células fueron enjuagadas con PBS dos veces e inoculadas con 2 ml de virus diluido 1:10 con un título a la SN de 1×10^6 dosis infectantes 50%/0.025 ml (DICC 50%/0.025ml). Los cultivos fueron incubados una hora a 37°C y luego se les agregó 40 mls de medio Eagle con -- 10% de suero equino, 1% de gentamicina, 1% penicilina/estrepto y 1% de bicarbonato. Dichos cultivos fueron mantenidos a 37°C hasta la aparición de efecto citopático (CPE). Las monocapas con 80% de CPE fueron congeladas y descongeladas -- tres veces y centrifugadas a 5.300 rpm por 15 minutos. (SORVAL superspeed RC 2-B rotor). El pellet celular fue resuspendido en medio Eagle y centrifugado nuevamente a 5.300 rpm por 15 minutos. Este segundo sobrenadante fue juntado con el primero y éste constituyó la suspensión vírica inicial. Posteriormente se tomó una alícuota para su titulación en cultivo celular MDBK, obteniéndose un título de $1 \times 10^{5.7}$ DICC 50%/0.025 ml.

Purificación viral

El sobrenadante obtenido fue centrifugado sobre una capa de sucrosa al 25% en buffer TEN (0.01M Tris, 0.01M EDTA, 0.1M NaCl pH 7.2), a 86.000 x g durante 90 minutos (centrífuga Beck-man type 30 rotor). El pellet se resuspendió en buffer TEN en un volumen 1/200 del volumen inicial, y fracciones de 600 ul fueron depositados cuidadosamente sobre un gradiente lineal preformado de tartrato de potasio 15-45% en buffer TEN pH 7.2 y centrifugados a 100.000 x g durante 12 horas en el rotor SW 4 Ti de la centrífuga Beckman.

Una banda blanquecina se observó en el tercio superior del tubo y un casquete inferior de aproximadamente 3 ml. Alícuotas de 1 ml fueron tomadas para su lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm. De acuerdo con los valores obtenidos, se hizo un pool de las fracciones 5 al 10 de la banda superior, y 28 al 32 del casquete inferior. Ambos pools fueron deluidos cuatro veces con buffer TEN y centrifugados nuevamente a 86.000 x g por 90 minutos. Los pellets obtenidos fueron nuevamente resuspendidos en 4 ml de buffer TEN y se tomaron alícuotas para su titulación. El resto fue congelado hasta su utilización. Los títulos obtenidos durante las diferentes etapas del proceso, se expresan en el Cuadro 1.

Conjugado

Inmunoglobulina de cabra anti IgG bovina conjugada con peroxidasa proveniente de KPL, fue usada en una dilución de 1:4000 en PBS-Tween 20 al 0.05%.

Sustrato

O-Phenilene Diamine (OPD) proveniente de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., fue utilizado a razón de 4 mg en 10 ml de buffer citrato pH 5, con 10 ul de H₂O₂.

Procedimiento de ELISA

Se emplearon los procedimientos establecidos por Voller, Bidwell & Bartlett (9), con pequeñas modificaciones.

El antígeno (Ag) se diluyó 1:3000 en PBS pH 7.2 y se colocaron 100 ul en placas de 96 hoyos (INMULON 2 Dynatech), dejándose toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se volcó el contenido de Ag y sin lavar, la placa fue bloqueada con 100 ul de albúmina bovina (BSA) al 1% e incubada 30 minutos a 37°C. El contenido se volcó y la placa fue lavada con PBS-T (Tween al 0.05%) tres veces, con lavador de placas manual (Vaccu-Pette/96 VP-96-UST Culturetek Corp.). Posteriormente, se agregaron los sueros control (positivo en cinco diluciones 1:300, 1:600, 1:1200, 1:2400, 1:4800 y en tres hoyos por dilución, y negativo a una dilución de 1:600). La dilución de trabajo de los sueros fue de 1:600 en PBS-T. Todos los sueros fueron probados en tres hoyos cada uno, para evitar el efecto de variación individual. Se incubaron 2 ó 3 horas a 37°C, la placa fue lavada tres veces con PBS-T y se colocó el conjugado diluido 1:4000 en PBS-T. La placa fue dejada toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se volcó el contenido y la placa fue lavada tres veces con PBS-T y se agregó el sustrato (OPD) en buffer citrato pH 5. Se incubó a 37°C y se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 0.1 M.

La lectura de los resultados se realizó en un Espectrofotómetro Dynatech automático MR 600 Microplate Reader) para placas, a una longitud de onda de 490 nm.

Cada placa tenía los siguientes controles: Suero control negativo; suero control positivo en cinco diluciones; suero sustituido por PBS-T y usado como blanco de la reacción; conjugado y sustrato sustituidos por PBS-T. Se empleó un control de Ag, sustituyendo el virus por sobrenadante celular sin infectar.

Procedimiento de SN

La prueba de SN se realizó en microplacas de 96 hoyos (Costar-Dynatech) sobre células MDBK en medio Eagle con 10% de suero equino y 1% de gentamicina y nistatina respectivamente. Los sueros se diluyeron de 2 en 2, de 1:8 a 1:32, utilizándose la dilución 1:4 como control de suero. En cada hoyo se colocaron 0.025 ml de cada dilución de suero y un mismo volumen de una suspensión viral conteniendo 100 unidades infectantes 50%/0.025 ml, excepto en la dilución 1:4 usada como control. La placa se incubó a 37°C durante una hora. Posteriormente se agregaron las células en un volumen de 100 ul por hoyo. La placa fue nuevamente incubada a 37°C durante 72. Diariamente se la observó, hasta la aparición de CPE. Los resultados se expresaron como la dilución máxima del suero con actividad seroneutralizante.

En cada prueba se realizó una titulación del virus, para confirmar que se emplearon 100 unidades infectantes 50% (UI 50%) en la reacción. Además del control de suero, se usaron los siguientes controles: control de células (sólo células en medio Eagle), control de suero positivo y negativo.

RESULTADOS

Purificación viral. En el proceso de purificación del Ag, ocurrió un hecho particular que fue la aparición de dos bandas de absorción con actividad infectante. Una en el tercio superior del gradiente y la segunda como un casquete inferior (fracciones 5/10 y 28/32 respectivamente). El título infectante de ambas fracciones fue muy diferente (Cuadro 1). Sin embargo, al ser probadas en la técnica de ELISA, ambas fracciones dieron resultados similares (Cuadro 2).

Cuadro 1. TITULOS DEL VIRUS IBR EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE SU PURIFICACION MEDIANTE SN

	Título (DICC 50%/0.025 ml)
Suspensión viral inicial	$1 \times 10^{5.7}$
Virus clarificado	1×10^9
<u>Ultracentrifugado</u>	
a) banda superior	$1 \times 10^{3.5}$
b) banda inferior	$1 \times 10^{9.5}$

Cuadro 2. DILUCIONES DEL Ag CONTRA UNA DILUCION UNICA DE SUERO POSITIVO MEDIANTE ELISA

Diluciones	Densidad Optica (*)	
	Fracción 5/10	Fracción 28/32
1:1000	.845	.861
1:2000	.828	.861
1:3000	.776	.784
1:4000	.685	.754

(*) promedio de D.O. de 4 hoyos

La dilución de trabajo fue establecida en 1:3000.

Sueros control positivo. Sueros positivos a la SN fueron probados a diferentes diluciones 1:600, 1:1200, 1:2400, 1:4800 contra una dilución fija de Ag (1:3000) para determinar la dilución óptima de trabajo, así como para hacer un pool de los mismos y utilizarlo como control en cada prueba (Cuadro 3).

Sueros control negativo. Sueros negativos a la SN fueron probados conjuntamente con los positivos con el mismo propósito (Cuadro 3).

Cuadro 3. RESULTADOS EN ELISA DE SUEROS TITULADOS POR SN

Sueros	Densidad Optica (D.O.) Diluciones			
	1:600	1:1200	1:2400	1:4800
<u>Sueros negativos a SN</u>				
1	.168	.146	no testado	
2	.031	-	no testado	
3	.160	.152	no testado	
4	.151	.111	no testado	
5	.117	.085	no testado	
6	.172	.127	no testado	
7	.140	.096	no testado	
8	.111	.047	no testado	
9	.120	.067	no testado	
10	.120	.100	no testado	
11	.139	.087	no testado	
<u>Sueros positivos a SN</u>				
12	1.110	1.037	.926	.960
13	.956	.691	.474	.335
14	.616	.429	.258	.199
15	.417	.252	.147	.096
16	.652	.514	.364	-
17	.777	.555	.274	.238
18	1.968	.753	.516	.308

Las diferencias de D.O. obtenidas entre los sueros positivos y negativos a la dilución 1:600 determinaron que se adoptara ésta como dilución de trabajo. Se hizo un pool con 7 sueros positivos que fue fraccionado y congelado para su utilización como control positivo en todas las pruebas. Igualmente se procedió con los sueros negativos.

Diluciones del conjugado. Manteniendo fijas las diluciones de Ag y sueros, se realizaron las siguientes diluciones del conjugado: 1:500, 1:1000, 1:2000; 1:4000, 1:8000; 1:10000, para determinar su dilución óptima de trabajo. (Cuadro 4)

Cuadro 4. DILUCIONES DEL CONJUGADO

Sueros	Diluciones y resultados en D.O.					
	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:10000
Suero +	1.595	1.435	1.100	.915	.530	.390
Suero -	.112	.089	.099	.094	.003	-

Fue elegida la dilución de trabajo 1:4000

Sustrato

El sustrato fue utilizado de acuerdo a lo establecido en el manual publicado por Dynatech (ver Materiales y Métodos)

Comparación de las técnicas de ELISA y SN. Del banco de sueros del C.I.Vet. Rubino, se tomaron 85 sueros bovinos inactivados a 56°C por media hora, y fueron estudiados por ambas técnicas (Cuadro 5)

Cuadro 5. COMPARACION DE RESULTADOS EN ELISA Y SN (*)

Suero N°	SN	ELISA	Suero N°	SN	ELISA	Suero N°	SN	ELISA
1	-	0	30	-	293	59	-	0
2	-	305	31	-	72	60	-	14
3	-	0	32	-	0	61	-	411
4	-	0	33	-	0	62	-	228
5	-	0	34	-	0	63	+1:32	858
6	-	0	35	-	918	64	+1:16	1281
7	-	0	36	-	1412	65	+1:16	1209
8	-	0	37	+1:32	638	66	+1:16	1042
9	-	0	38	+1:16	1402	67	-	359
10	-	0	39	+1:16	743	68	+1:16	1394
11	-	0	40	+1:16	478	69	+1:16	658
12	-	0	41	+1:16	1263	70	+1:16	660
13	-	0	42	-	323	71	-	321
14	-	0	43	+1:16	1156	72	+1:16	700
15	-	0	44	+1:16	439	73	-	1105
16	-	258	45	-	439	74	+1:16	211
17	-	486	46	+1:16	674	75	-	74
18	+1:8	687	47	-	1043	76	+1:8	656
19	-	168	48	+1:16	735	77	-	461
20	-	0	49	-	1504	78	+1:16	959
21	-	0	50	+1:8	645	79	-	0
22	-	0	51	-	363	80	-	0
23	-	0	52	+1:16	0	81	-	0
24	-	0	53	-	0	82	-	0
25	-	0	54	-	0	83	-	0
26	-	4	55	-	0	84	-	0
27	-	236	56	-	0			
28	-	0	57	-	0			
29	+1:8	376	58	-	0			

(*) Los resultados de SN corresponden a diluciones del suero, y los de ELISA a unidades.

RESUMEN

Sueros	ELISA	%	SN	%
Positivos	44	52.4	24	28.5
Negativos	40	47.6	60	71.5
Total	84		84	

Para determinar el umbral por encima del cual los sueros se consideran positivos a la prueba de ELISA, se tomaron los valores en unidades arbitrarias de 31 sueros negativos ambas pruebas, se calculó la media (\bar{x}), el desvío standard (σ) y se le sumó a la media dos desvíos standard. El resultado fue 21 unidades. En consecuencia, todo suero con más de 21 unidades se consideró positivo.

Del cuadro 5 resulta que se detecta un 52% de sueros positivos por ELISA y sólo 28.5% por SN. De los 24 sueros positivos a la SN, todos excepto uno resultaron positivos por ELISA. Hubieron 20 sueros positivos por ELISA que resultaron negativos por SN.

DISCUSION

La aparición de dos bandas de absorción con actividad infectante luego de la ultracentrifugación en el gradiente de tartrato de potasio, fue discutida ampliamente con el Dr. Ardans, de la Univ. de Davis, California, durante la estadía de un mes del autor en dicha institución. Sin embargo no fue posible analizar qué proteínas actuaban en cada fracción. Se consideró que extraordinariamente quedaron restos celulares con partículas virales adsorbidas luego de la clarificación de la suspensión viral contra el colchón de sucrosa. Ello explicaría el elevado título del virus en la fracción inferior. A pesar de esta diferencia de título, el comportamiento de ambas fracciones en la prueba de ELISA a una misma dilución fue similar, por lo cual en el trabajo se emplearon las dos fracciones indistintamente.

El análisis de los resultados de los 84 sueros estudiados demostró que 44 sueros (52.5%) resultaron positivos por la técnica de ELISA, mientras que por SN sólo 24 (28.5%). De los sueros positivos a SN, sólo uno resultó negativo a ELISA, mientras que de los positivos a ELISA sólo 23 resultaron positivos a la SN.

No es posible correlacionar los resultados positivos a ambas técnicas, porque sueros con una actividad seroneutralizante alta (1:32), mostraron valores bajos de D.O. y/o unidades. Por otra parte, sueros débiles positivos o negativos a la SN mostraron valores altos de D.O. y/o unidades.

La explicación de la mayor sensibilidad de la técnica de ELISA radica en la capacidad de la prueba de identificar anticuerpos seroneutralizantes y no seroneutralizantes (1,5), mientras que la SN sólo identifica anticuerpos seroneutralizantes.

Se concluye que esta técnica es más sensible y sencilla que la SN, por los siguientes motivos:

- por identificar otros anticuerpos además de los seroneutralizantes;
- porque no requiere trabajar con cultivos celulares;
- porque en 48 horas como máximo se obtiene un resultado confiable, pudiéndose reducir el tiempo a ocho horas, luego de estudios que acorten los tiempos de reacción.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración de las Sras. Nelsa Caporale por su trabajo en cultivos celulares; Gladys González por las pruebas de SN; Sr. Atahualpa Sánchez por la producción de medios; Dra. Ma. Angélica Solari y Sr. Herman Topolanski por el diseño del programa para el computador. Un agradecimiento muy especial al Dr. Alberto -- Nieto (Profesor titular de Inmunología, Fa. de Química, Uruguay), por su constante apoyo y consejo científico.

Este proyecto se realizó con el aporte financiero de la International Foundation for Science (IFS), de Suecia, Proyecto B/1134.

SUMMARY: SET UP OF THE ELISA TEST FOR THE DIAGNOSIS OF INFECTIONS BOVINE RHINOTRACHEITIS (IBR) AND ITS COMPARISON WITH SERUM NEUTRALIZATION

The ELISA test was set up for the identification of antibodies against Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR). Highly purified antigen through potassium tartrate gradients was used, and optimum dilutions of sera, antigen and conjugate were established by the multi-dilutions system. Pools of positive and negative sera to Serum Neutralization (SN) were established as positive and negative controls. -- They were frozen and used as standards in each test. Results were expressed in units to avoid Optic Density (O.D.) variations between plates. The test was compared with SN. Results showed that 52% of the sera were positive to ELISA and -- only 28.5% to SN. This comparison shows that ELISA is more sensitive, faster and simpler.

BIBLIOGRAFIA

1. Bolton, D. et all. 1981. Evaluation of the critical parameters of a sensitive ELISA test using purified Infectious Bovine Rhinotracheitis virus antigens. *Vet. Microbiology*, 6 (1981); 265-279
2. Crowther, J.R. et all (1979). Detection and Quantification of Foot & Mouth -- Disease Virus by Enzyme Labelled Immunosorbent Assay Techniques. *J.G. - Virology* (1979), 42, 597-602
3. Engvall, E., Perlmann, P. (1972), ELISA III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme Labelled Anti-Immunoglobulin in Ag Coated Tubes (1972), *J. Immunology* 109; 129-135
4. Hamblin, C. et all. A Rapid Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the serological confirmation of Suine Vesicular Disease. *Br. Vet. J.* (1982), 138, 247.
5. Lombard, M., Piroid, R., Titration of FMD antibodies in Cattle sera: Comparative study of two methods: SN on cells and ELISA. *IFFA Merieux*.
6. Malvano, R. et all. ELISA for antibodies measurements. Aspects related to -- Data Expression. *J. of Immunological Methods*, 48 (1982) 51-60
7. Solsona, M. et all. Recherche des anticorps contre le virus de la Rhinotracheite Bovine Infectieuse para la méthode ELISA. *Bulletin de l'Academie*. 215-225
8. Soula, A. et all. ELISA IBR. Expression d'un titre ELISA (1982). *Develop. -- Biol, Standard*. Vol. 52, 147-157
9. Voller, A. Bidwell, D. and Bartlett, A., Microplate Enzyme Immunoassay for -- the Immunodiagnosis of Virus Infections. *Manual of Clinical Immunology* by Rose & Friedman. American Society of Microbiology, Chapter 69, 506-512.
10. Dynatech Manual on Enzyme Immunoassays.