XVII JORNADAS URUGUAYAS DE BUIATRIA
Paysandú, R.O.U., 16 - 18 de junio de 1989

COMPARACION DE LAS TECNICAS DE INMUNODIFUSION EN GEL AGAR (IDGA) E INMUNOENZIMATICAS (ELISA) EN EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA LEUCOSIS BOVINA ENZOOTICA

H. Guarino[1]
J. Saizar
R. Sienra[2]

RESUMEN

Las técnicas inmunoenzimáticas indirecta y competitiva fueron comparadas con la Idga en el diagnóstico serológico de la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE)

De los 139 sueros procesados, 99 eran negativos y 40 positivos a la prueba de IDGA.

Los resultados obtenidos demuestran una coincidencia global del 91.4% y 91.3% para las técnicas indirecta y por competición respectivamente.

Las técnicas de Elisa poseerían una mayor sensibilidad, dado que más de un 10% de sueros negativos a IDGA resultaron positivos a las mismas.

Se concluye en la utilidad de los métodos comparados y en las ventajas de su aplicación en grandes poblaciones.

INTRODUCCION

La leucosis Bovina Enzoótica (LBE). enfermedad neoplásica maligna del sistema retículo-endotelial, representa uno de los tumores más frecuentes e importantes del ganado bovino (2). La naturaleza infecciosa de la LBE fue sospechada durante muchos años, pero recién en 1969 Miller y col. demostraron la presencia de partículas virales en materiales provenientes de vacas clinicamente afectadas.

A partir de entonces se han logrado importantes avances en relación a las características y propiedades del agente causal, así como de su relación con la enfermedad (2,11).

[1]Centro de Investigaciones Veterinarias "Miguel C. Rubino" Depto. Virología.
[2]Facultad de Veterinaria-Patología de Rumiantes y Suinos.

c.c.4 1

El virus de la LBE es un Oncornavirus tipo C, perteneciente a la familia Retroviridae, que afecta en condiciones naturales exclusivamente a la especie bovina (3, 10, 11). Como consecuencia de la infección, y luego de un largo período de incubación, los animales infectados pueden desarrollar linfocitosis persistente (respuesta benigna) o linfosarcomas (respuesta maligna). NO obstante, la mayoría de los individuos permanecen asintomáticos durante toda su vida, constatándose en ellos tan solo la presencia de anticuerpos específicos (2, 3, 8).

La LBE adquiere su mayor importancia en el ganado lechero, asumiendo un carácter enzoótico, estando ampliamente difundida en todos los países del mundo (2, 5, 9). La detección precoz de los bovinos afectados en forma asintomática constituye el elemento básico del diagnóstico de LBE y posibilita la aplicación de medidas de control y erradicación (3, 6, 9, 10).

El diagnóstico de LBE se realiza casi exclusivamente mediante el empleo de métodos indirectos, destinados a verificar la presencia de anticuerpos específicos generados como consecuencia de la infección (2, 5, 10). Numerosos estudios han permitido establecer las características antígenicas del agente, destacándose la glicoproteína de la cubierta (antígeno gp51) y la proteína interna mayor del virión (antígeno p24-25) (2, 10, 11).

La primera técnica utilizada para individualizar bovinos infectados fue la de Inmuno-Fluorescencia a partir de células fijadas en acetona (3). Posteriormente se empleó la IDGA, que actualmente es el test de rutina en la mayoría de los laboratorios del mundo (1, 3, 4, 5, 10, 13).

La IDGA es una técnica simple y confiable, pero posee limitaciones tanto en sensibilidad como en especifidad. Los antígenos empleados son el p24-25 o el gp51, o la combinación de ambos en forma dual (3, 5, 7). Estudios comparativos efectuados por Gupta & Ferrer (1981) demostraron que el Radioinmunoanálisis (RIA) con antígeno gp es más sensible que el RIA con p24-25 y que la IDGA empleando uno u otro antígeno. Técnicas directas como Inhibición del Sincitio y RIA por competición, evidenciaron similar sensibilidad, aunque la segunda se demuestra más útil para el diagnóstico precoz (5).

En los últimos años se han desarrollado métodos Inmunoenzimáticos para el diagnóstico de diversas afecciones, tanto del hombre como de los animales domésticos (14). Dentro de ellos el más difundido es el de Enzima Ligada a un Inmuno Adsorbente, más conocido por la sigla ELISA (13, 14). El desarrollo de anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas, ha permitido sustituir a los policlonales, mejorando así enormemente la especidicidad del ELISA (3, 6, 7, 11).

El diagnóstico serológico de LBE mediante ELISA ha demostrado una elevada especificidad y sensibilidad y puede ser utilizado en forma sistematizada para evaluar objetivamente muestras numerosas (1,7, 8, 13). Además la técnica puede ser aplicada con éxito en suero y leche, tanto en muestras individuales como en mezclas (3, 8, 9).

El objetivo de la presente comunicación es presentar los resultados obtenidos en un estudio comparativo entre dos técnicas comerciales de ELISA en relación a la IDGA, para el diagnóstico de LBE.

MATERIALES Y METODOS

1. Sueros

En el ensayo se evaluaron un total de 139 sueros bovinos, provenientes de un relevamiento sobre LBE, que se encontraban conservados a -18°C en el banco de sueros del Depto. de Virología del C.I.Vet. "Miguel C. Rubino". Los mismos habían sido previamente analizados mediante la técnica de IDGA, considerada como referencia, y clasificados como Positivos (n=33), Débil Positivos (n=7) y Negativos (n=99).

2. Pruebas Diagnósticas

2.1 Inmunodifudión en Gel Agar

Se efectuó en portaobjetos con agar al 0,8% rn buffer Tris-HCI 0,05M, me-

todo convencional, utilizando un kit comercial LEUCOSE TEST[1] con antígeno dual gp51 y p24. Los portaobjetos se incubaron durante 48 hs. a temperatura ambiente (TA), considerándose positivos aquellos sueros que evidenciaron una fuerte línea de precipitación.

2.2 Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)

Se emplearon dos técnicas ELISA diferentes, la indirecta y por competición.

2.2.1 ELISA INDIRECTO

Se utilizó un kit comercial LAB-EASE BLV[2], en microplaca de 96 pocillos, destacándose las principales etapas (Figura 1).

La placa se ofrece ya sensibilizada, con un anticuerpo monoclonal anti gp51 ("de captura"), y el antígeno adsorbido en las filas impares. Las filas pares carecen de antígeno, actuando como controles individuales de cada muestra.

Los sueros problema, así como los positivos y negativos de referencia, fueron adicionados en duplicado (filas par e impar) a la dilución 1:100, e incubados 18-24 hs a 4°C.

Luego de la incubación se agregó anti-IgG1 bovina monoclonal, conjugada con peroxidasa, dejándose I h. a TA.

Entre cada etapa de la técnica, se efectuaron tres lavados con PBS-Tween (PBS-T) al 0,05% pH 7,2.

La lectura se realizó mediante espectrofotómetro automático de microplacas[3], a una longitud de onda de 410-490 nm.

El umbral de positividad fue establecido como el doble del promedio de Densidad Optica (D.O.) del suero control negativo, con un mínimo de 0,400.

2.1.2 ELISA POR COMPETICION

También en este caso se utilizó un kit comercial MONELIFFA LEUCOSE BOVINE[4], cuyas principales características se describen a continuación (Figura 2).

La microplaca de 96 pocillos se ofrece previamente sensibilizada con el antígeno gp51 del virus de LBE.

Las muestras a analizar, así como los controles positivos y negativos, se diluyen 1:10 y adicionan en duplicado, incubándose durante 18-24 hs a 4°C.

El anticuerpo monoclonal anti-gp51 conjugado a la peroxidasa es agregado, permaneciendo la placa a TA durante 1H.

El sustrato adicionado a cada muestra consiste en TMB (tetrametil bencidina), deteniéndose la reacción con ácido sulfúrico 4N.

Entre cada etapa de la técnica se efectuaron tres lavados con PBS-T 0,05% pH 7.2.

La lectura se efectuó en forma similar a la técnica anterior, a una longitud de onda de 450-630 nm.

Para establecer la positividad de la muestra se utilizó un suero control negativo, correspondiente a una población libre de la enfermedad. Mediante un análisis de varianza se determinó el porcentaje de competición estableciéndose como positivos aquellos iguales o superiores al 30%.

---

[1]Rhone-Merieux, Lyon, Francia
[2]Norden Laboratories, Lovain-la Nueve, Bélgica
[3]Dynatech MR-600, USA
[4]Rhône-Merieux, Lyon, Francia

RESULTADOS

En el estudio serológico efectuado, los resultados se presentan en forma comparativa, tomando como base la IDGA.

1. Relación entre IDGA y Método Indirecto de ELISA

Sobre 139 sueros procesados, existió coincidencia en 127, lo que represen el 91,4%. Debe destacarse que la totalidad de los sueros positivos a IDGA lo fueron al método de ELISA. La mayor discrepancia se presentó en las muestras negativas a IDGA. donde se detectaron 11,2% de positivos a ELISA (Tabla 1). En el caso de sueros debilmente positivos a la técnica de referencia, solo uno fue negativo al ELISA.

Tabla 1. Estudio comparativo entre IDGA y ELISA indirecto en el diagnóstico serológico de LBE

GEL DIFUSION	ELISA INDIRECTO Positivo	Negativo	TOTAL	COINCIDENCIA (%)
Negativo	11	88	99	88,8
Debil positivo	6	1	7	85,7
Positivo	33	-	33	100
TOTAL	50	89	139	91,4

2. Relación entre IDGA y Método de ELISA por Competición

Por esta técnica se procesaron 103 sueros incluídos en el ensayo anterior, obteniendose una coincidencia global del 91.3% en relación a la IDGA. Al igual que con la otra técnica, la totalidad de los sueros positivos a IDGA lo fueron a ELISA. En este caso se observó una situación similar con las muestras debilmente positivas. La discrepancia se presentó en el caso de los sueros negativos, ya que el 14% de ellos se evidenciaron positivos al ELISA (Tabla 2)

Tabla 2. Estudio comparativo entre IDGA y ELISA por Competición en el diagnóstico serológico de LBE.

GEL DIFUSION	Positivo	Negativo	TOTAL	COINCIDENCIA (%)
Negativo	9	64	73	85,9
Debil positivo	5	-	5	100
Positivo	25	-	25	100
TOTAL	39	64	103	91,3

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados del presente ensayo evidencian la existencia de una elevada concordancia entre los resultados obtenidos mediante las técnicas inmunoenzimáticas evaluadas y la IDGA. Ambos métodos de ELISA, idirecto y por competición, detectaron un porcentaje superior al 10% de sueros positivos que habían resultado negativos frente al test de referencia. La presencia de falsos negativos constituye una de las limitantes de mayor importancia de la IDGA (8,13).

Las diferencias entre el ELISA y la IDGA concuerdan con las observadas por Maris y col. (1983), en un estudio que incluyó 545 sueros. Discrepancias algo inferiores entre ambos métodos han sido comunicadas por otros investigadores: 7,6% (Todd y col., 1980) y 4,6% (Beherens, 1982). En contraposición con lo verificado en otros estudios no existieron muestras positivas a IDGA y negativas al ELISA (13).
Sueros considerados falso-negativos al IDGA pueden atribuirse a diversas causas. Por una parte existiría mayor sensibilidad de las técnicas de ELISA, capaces de detectar anticuerpos anti-LBE mas precozmente que la IDGA (3, 5, 7, 9). Por otra parte, en el ELISA pueden existir partículas antigénicas que no se encuentran en el caso de la IDGA (13).

La elevada sensibilidad de las técnicas inmunoenzimáticas queda evidenciada por la positividad observada en sueros altamente diluídos, tal como fue evidenciado en el presente ensayo. Ello posibilita el empleo del ELISA no solo en muestras individuales de suero o leche sino también a partir de mezclas (3,7,8,9,13), posibilitando el crecimiento de establecimientos o rodeos.

En un estudio realizado en Bélgica mediante técnica indirecta de ELISA en mezcla de suero, Mammerickx y col. (1985), detectaron 380 rodeos infectados sobre un total de 26.284 sueros analizados. Los mismos sueros evaluados por IDGA permitieron identificar tan solo la mitad de los establecimientos positivos (9). Las técnicas de ELISA pueden llegar a detectar anticuerpos en mezclas de sueros altamente diluídas, aún con una taza de infección menor al 1% (3).

El carácter objetivo, su simplicidad y rapidez, hacen que en la actualidad el ELISA represente en método de elección para el trabajo con muestras numerosas, dentro de programas de control o erradicación de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

A Laboratorios Interifa S.A. y al Dr. L. Ganzo del Laboratorio Pasteur, por el aporte de los reactivos indipensables para la realización del presente ensayo. A la Sra. Gladys González por su colaboración en el procesamiento de las muestras en el laboratorio.

SUMMARY

Indirect and competitive ELISA tests were compared with the agar gel inmunodiffusion test (AGIT) in the serologic diagnosis of Enzootic Bovine Leukemia (EBL).

From the 139 sera tusted, 99 were negative and 40 positive to the AGIT test.
Results obtained indicate a global coincidence of 91.4% and 91.3% for the indirect and competitive ELISA tests respectively.

These tests might have more sesitivity as more than 10% of the sera negative by the AGIT were positive to both. The usefulness of tests compared is confirmed, as well as the advantages of their application in large in large cattle populations.

BIBLIOGRAFIA

1. BEHRENS, F. Comparative studies on the Enzime Linked Immunodiffusion test in the diagnosis of the Enzootic Bovine Leukosis. Fourth Int. Symp. BL 1982 p. 173-185.

2. FERRER, G. Bovine lymphosarcoma. Pract. Vet. 2:235-241,1980.

3. FLORENT, G. et al. Detection of antibodies to bovine leukemia virus in bovine milk samples with an ELISA involving two monoclonal Ab. Vet. Microbiol. 18:89-93, 1988.

4. GUPTA, P. y col. A critical comparison of the virus nuetralization radioimmunoprecipitation and immunodiffusion tests for the serological diagnosisof BlV infection. Ann. Rech.Vet. 9:683-688,1978.

5. GUPTA? P. y col. Comparison of various serological and direct methods for the diagnosis of BLV infection in cattle. Int.J. Cancer 28:178-184, 1981

6. LETESSON, J.J. et all Production d'anticorpsmonoclanaux specifiques d'isotipes d'immunoglobulines bovines. Ann.Med. Vet. 129:131:141. 1985.

7. MARIS, P. et al. Leucose bovine enzootique. Application de la technique ELISA a la detection des anticorps Comps. Comp. Immun. Micro. Infect. Dis 6:45-50, 1983.

8. MAMMERICKX, M. y col. Le diagnostique du la leucose bovine enzootique a l'aide d'un test immuno-enzymatique (ELISA) impliquant un anticorps monoclonal. Ann Méd. Vét. 128:55-63, 1984.

9. MAMMERICKX, M. y col. A rapid detection of bovine leukemia virus infection in a large cattle population with an EISA performed onppooled sera grouped by herd. Zbl. Vrt. Mrd. 32:601-608, 1985.

10. McDONALD, H. et al. Isolation and characterization of an antigen of the bovine C-type virus. Cancer Res. 36: 1251-1257, 1976.

11 MILLER, J.M., et al . Virus like particles in phytohemagglutinin stimulated lymphocite cultures with reference to bovine lymphosarcoma. J. NALT Cancer Inst. 43:1297-1305, 1969.

12. PORTETELLE, D. y col. Use of monoclonal antibody in an ELISA test for the detection of antibodies to bovine leukemia virus.J. Viro. Meth. 6:19-29, 1983.

13. TODD, D. y col. An enzyme linked immunosorbent assay for enzootic bovine leukosis antibodies. Vet. Rec. 107:124-126, 1980.

14. VOLLER, A. et al. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: theory and practice. Bull. Wld Health Org. 53:55-56, 1976.