

**APLICACION DE LA TECNICA INMUNOENZIMATICA (ELISA)
PARA EL DIAGNOSTICO DE LOS VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA Y
ESTOMATITIS VESICULAR EN COMPARACION CON LA
PRUEBA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO**

*M.P.D. Gomes¹, M.S. Söndahl¹, M.A. Martins¹,
R. Casas Olascoaga¹, A. Alonso F.¹*

RESUMEN

Se ha comparado la técnica inmunoenzimática (ELISA) "sandwich" indirecta con la prueba de fijación del complemento 50% (FC₅₀) para detectar los serotipos O, A y C del virus de la fiebre aftosa (VFA) y New Jersey (NJ) e Indiana (IND) del virus de la estomatitis vesicular (VEV). Para las cepas O, A, C e IND se usaron antisueños polivalentes como detectores y para las cepas NJ fueron utilizados antisueños monovalentes. La prueba de ELISA mostró ser un procedimiento más satisfactorio para identificar VFA y VEV en muestras de epitelios de animales afectados por enfermedad vesicular.

INTRODUCCION

El virus de la fiebre aftosa (VFA) es un Picornavirus que ocasiona una enfermedad vesicular en animales de pezuña hendida. El virus de la estomatitis vesicular (VEV) es un Rhabdovirus que también produce una enfermedad vesicular en equinos, bovinos y porcinos. El VFA tiene siete tipos serológicos distintos y de éstos los serotipos O, A y C, incluyendo varios subtipos son prevalentes en América del Sur (2). La EV es producida por los serotipos NJ e IND, que incluye los subtipos IND-1, IND-2 e IND-3 (8). Los serotipos NJ e IND son identificados

en las áreas endémicas de EV (sur de los Estados Unidos de América, México, América Central, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela). El subtipo IND-2 es aislado esporádicamente en Argentina y Brasil y el subtipo IND-3 solo en Brasil. Ambas enfermedades son clínicamente indistinguibles en bovinos y porcinos (6).

La tipificación de los VFA y VEV en América del Sur se realiza por la prueba de fijación del complemento 50% (FC₅₀) usando antisueños poli y monovalentes (1). La técnica inmunoenzimática (ELISA) ha probado ser más eficiente que la prueba convencional de FC para identificar VFA (9, 12) y VEV (10).

En este estudio se compara el uso de antisueños polivalentes en las pruebas de ELISA y FC₅₀ para identificar los serotipos O, A y C del VFA y NJ e IND del VEV prevalentes en América del Sur.

MATERIALES Y METODOS

Muestras de campo y de referencia: Fueron reexaminadas un total de 291 muestras de epitelio de bovinos, equinos y porcinos, enviadas al Laboratorio de Referencia para las Américas/Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA) por los países de las Américas del Sur y Central entre 1952 y 1989 y conservadas a -20°C en solución buffer fosfato (PBS) con 50% de glicerina. Las muestras fueron reexaminadas por FC₅₀ y analizadas por primera vez por la prueba de ELISA. Para el examen se preparó una suspensión de 20% en PBS de las muestras epiteliales.

Las suspensiones de cultivos de células BHK (11) infectadas por VFA y VEV del cepario de

¹ Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA, HPV/OPS/OMS), Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

PANAFTOSA (2, 3) que incluían: 29 del tipo O; 60 del tipo A; 21 del tipo C; 4 del tipo NJ; 4 del subtipo IND-1; 5 del subtipo IND-2 y 4 del subtipo IND-3 también fueron examinadas por las pruebas de ELISA y de FC₅₀.

Antisueros para las pruebas de ELISA y de FC₅₀: Antisueros de conejo para captura en ELISA fueron preparados por la inoculación de antígeno 146S inactivado de los VFA O₁ Campos-Br/58, A₂₄ Cruzeiro-Br/55 o C₃ Indaial-Br/71 obtenidos en células BHK. Para los antisueros de VEV, los animales fueron inmunizados con los subtipos NJ Costa Rica/66, IND-1 Costa Rica/72, IND-2 Ribeirão-Br/79 o IND-3 Agulhas Negras-Br/86 pasados en células IBRS-2 (7). Las inmunizaciones fueron realizadas de acuerdo con el método descrito (12). El suero de captura para los serotipos IND fue una mezcla de los sueros monovalentes de conejo IND-1, IND-2 e IND-3, mientras que los sueros de captura para los serotipos O, A, C y NJ fueron antisueros monovalentes de conejo.

Los anticuerpos detectores para los serotipos O, A, C e IND usados en las pruebas de ELISA y FC₅₀ fueron antisueros polivalentes producidos en cobayos con virus infeccioso adaptado a esta especie. El esquema de inmunización fue semejante al descrito previamente (4).

Para la preparación de antisueros polivalentes se usaron las siguientes cepas: para el tipo O, O₁ Campos-Br/58, O₁ Caseros-Br/67, O₂ Brescia-Italia/47, O₃ Venezuela/51, O₆ UK/24, O₈ Bahia-Br/60, O Magdalena-Col/78, O MS-Br/80 y O RS-Br/80; para el tipo A, A₅ Westerwald-Ger/48, A₂₄ Cruzeiro-Br/55, A₃₂ Venezuela/70, A-79 Argentina/79, A Esteller-Ven/80, A-81 Arg/81, A-84 SC-Br/84, A Col/84 y A-85 Col/85; para el tipo C, C₁ Noville-Smith/65, C₂ Pando-Uru/44, C₃ Resende-Br/55, C₃ Indaial-Br/71, C₃ Arg/85, C₄ T.del F.-Arg/66 y C₅ Arg/69; y para el tipo IND, IND-1 Costa Rica/72, IND-2 Ribeirão Preto-Br/79 e IND-3 Agulhas Negras-Br/86.

El anticuerpo detector para el tipo NJ fue el antisuero monovalente producido en cobayo con la cepa NJ Costa Rica/66, usando la misma metodología arriba descrita.

Todos los sueros fueron inactivados a 56°C

durante 30 minutos, fraccionados en volúmenes de 2 ml y almacenados a -20°C.

Prueba de FC₅₀: Se empleó la prueba de FC₅₀ en tubo usada por PANAFTOSA para la tipificación de los VFA y VEV. Resumiendo: antisueros polivalentes O, A, C e IND de cobayo y monovalente NJ fueron usados en la dilución conteniendo 2,5 unidades fijadoras de complemento 50% contra los virus homólogos O₁ Campos-Br/58, A₂₄ Cruzeiro-Br/55, C₃ Indaial-Br/71, NJ Costa Rica/66 e IND-1 Costa Rica/72, respectivamente. Las unidades hemolíticas 50% de complemento para cada antígeno fueron determinadas previamente por titulación del complemento contra los antígenos.

Los antígenos fueron usados en la suspensión original. Se utilizaron volúmenes de 200 µl de suero, antígeno y complemento y, después de una incubación a 37°C durante 30 minutos, se adicionaron 400 µl de sistema hemolítico con una densidad óptica (DO, 545 nm) de 0,66. La mezcla fue incubada durante 30 minutos a 37°C. Después los tubos fueron centrifugados y se determinó el grado de reacción por la medición de la DO. Muestras con DO de 20% o más baja para un antisuero, en comparación con los otros antisueros y el suero control, fueron consideradas positivas para el tipo correspondiente.

Prueba de ELISA: Usamos la siguiente prueba de ELISA "sandwich" indirecta basada en el método descrito para diagnóstico del VFA (12):

a) A placas de ELISA se añadieron 100 µl de dilución óptima, en tampón de carbonato/bicarbonato, pH 9,6, de antisuero y suero normal de conejo y se mantuvieron en incubación a 4°C durante la noche. A continuación, las placas fueron bloqueadas con 1% de ovoalbúmina en PBS durante 1 h a 24-25°C.

b) Los antígenos fueron examinados en volúmenes de 50 µl de la suspensión original y dejados para reaccionar durante 1 h a 37°C en un vibrador.

c) Se adicionó sucesivamente los sueros de cobayo y el conjugado en volúmenes de 50 µl de la dilución óptima y se incubó a 37°C durante 30 minutos en un vibrador.

d) Se adicionó el sustrato de OPD al volumen de 50 μ l. La reacción se realizó durante 15 minutos a 24-25°C y fue detenida por acidificación.

e) La DO fue leída a 492 nm en un fotómetro Flow Multiskan. Los antígenos, sueros de cobayo y conjugado fueron diluidos en PBS con 0,05% de Tween-20, 1% de ovoalbúmina, 2% de suero normal de conejo, y 2% de suero normal de bovino. Las placas fueron lavadas cuatro veces entre cada paso con PBS con 0,05% de Tween-20. Las muestras con DO de 20% o más alta para un antisuero, en comparación con los otros antisueros y el suero control, fueron consideradas positivas para el tipo correspondiente.

La disposición de los reaccionantes en la placa para la tipificación del VFA y del VEV se muestra en la Figura 1.

RESULTADOS

Muestras de referencia: Suspensiones de células BHK de 110 VFA y 17 VEV del cepario de PANAFTOSA fueron examinadas por ELISA y FC_{50} para comparar la capacidad de ambos métodos de identificar las cepas más importantes del VEV y del VFA aisladas en América Central y del Sur entre 1944 y 1989. El Cuadro 1 muestra que la técnica de ELISA proporcionó resultados positivos en los 127 materiales examinados, mientras que la prueba de FC_{50} no detectó virus en la muestra C Leticia-Col/70.

CUADRO 1. Resultados de tipificación obtenidos por las pruebas de ELISA y FC_{50} en suspensión de células BHK infectadas con VFA y VEV del cepario de PANAFTOSA

Tipo de virus	Nº de cepas	Resultados positivos	
		ELISA	FC_{50}
O	29	29	29
A	60	60	60
C	21	21	20
NJ	4	4	4
IND	13	13	13
Total	127	127	126

FIGURA 1. Disposición de los reaccionantes en placas para la tipificación de VFA y VEV por la prueba de ELISA "sandwich" indirecta

Suero conejo/cobayo												
	O	A	C	NJ	IND	N	O	A	C	NJ	IND	N
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			TS		1				TS			5
C												
D				TS		2				TS		6
E												
F				TS		3	O	A	C	NJ	IND	Sin Ag
G												
H				TS		4						Sin Ag

N = Suero normal.

TS= Muestra de prueba.

Ag= Antígeno.

Muestras de campo: Un total de 291 suspensiones de muestras de epitelio de bovinos, equinos o porcinos afectados por enfermedad vesicular fueron examinadas por ELISA o FC_{50} . La técnica de ELISA obtuvo resultados positivos en 67,4% (196/291), mientras que por la prueba de FC_{50} solo se tipificó virus en 54,0% (157/291) de las mismas muestras. Todas las muestras positivas por FC_{50} también lo fueron por la técnica de ELISA.

Hubo completa concordancia entre los resultados de tipificación obtenidos por los dos métodos.

DISCUSION

Puesto que la FA y la EV no pueden ser diferenciadas solo por los síntomas clínicos presentados por los bovinos o porcinos afectados, la identificación laboratorial del agente involucrado es esencial para el diagnóstico. El mejoramiento de las técnicas en este campo es, por lo tanto, de gran importancia para ayudar a los programas de prevención, control y erradicación de las enfermedades vesiculares.

La técnica de ELISA mostró mayor sensibilidad que la FC convencional cuando se compararon en la identificación del VFA (9, 12) y del VEV (10) usando antisueros monovalentes. Los antisueros polivalentes fueron más eficientes que los antisueros monovalentes para detectar el VFA por la prueba de FC₅₀ (4). Este aspecto fue investigado por ELISA examinando 418 muestras de referencia y de campo del VFA y del VEV. Ambas pruebas mostraron efectividad similar para identificar muestras pasadas en células BHK (Cuadro 1: muestras de referencia). Sin embargo, cuando se examinaron muestras epiteliales de campo de VFA y VEV (Cuadro 2), la técnica de ELISA proporcionó consistentemente más resultados positivos.

reacciones las hemos relacionado con los epítomos comunes que las partículas 146S de las cepas del VFA poseen. Sin embargo, estas reacciones cruzadas no dieron lugar a resultados falsos positivos.

La técnica de ELISA realizada con antisueros polivalentes probablemente probará ser muy satisfactoria para apoyar los programas de prevención, control y erradicación de la FA y EV.

AGRADECIMIENTOS

Los autores son muy agradecidos a Carlos Alberto Senna y Jorge Sebastião dos Santos por su excelente asistencia técnica, y a la Srta. Carla Prete Gonçalves por la mecanografía del trabajo.

CUADRO 2. Resultados de tipificación obtenidos por las pruebas de ELISA y FC₅₀ en suspensiones originales de muestras de epitelios de animales afectados por fiebre aftosa (FA) o estomatitis vesicular (EV)

Muestras			Tipo de virus					
Origen	Número	Prueba	O	A	C	NJ	IND	Neg.
VFA	201	ELISA	37	61	17	0	0	86
VFA	201	FC ₅₀	30	42	13	0	0	116
VEV	90	ELISA	0	0	0	72	9	9
VEV	90	FC ₅₀	0	0	0	63	9	18

El elevado porcentaje de resultados positivos obtenido en suspensiones de células BHK con las dos pruebas se relacionó con la mayor concentración de antígeno en suspensiones de BHK que en muestras epiteliales, junto con el más amplio espectro de los antisueros polivalentes para identificar virus heterólogos cuando comparado con antisueros monovalentes (4).

El amplio espectro de los antisueros polivalentes como anticuerpos detectores (4) y la elevada sensibilidad de la técnica de ELISA (9, 10, 12) aumentan la posibilidad de identificar virus directamente de muestras epiteliales, principalmente de cepas diferentes que a menudo aparecen en el campo en los serotipos O, A y C del VFA (2) e IND del VEV (3, 8).

La prueba de ELISA mostró algunas reacciones cruzadas, especialmente entre los serotipos O y C del VFA (resultados no mostrados). Estas

REFERENCIAS

1. ALONSO FERNANDEZ, A. Manual de diagnóstico de laboratorio de las enfermedades vesiculares. Rio de Janeiro, PANAFOSA, 1986. (Ser. Man. Didáct., 15).
2. ALONSO FERNANDEZ, A., CASAS OLASCOAGA, R., ASTUDILLO, V.M., SÖNDAHL, M.S., GOMES, I., VIANNA FILHO, Y.L. Actualización de cepas del virus de la fiebre aftosa de importancia epidemiológica en América del Sur. Updating of foot-and-mouth disease virus strains of epidemiological importance in South America. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 53:3-10, 11-18, 1987.
3. ALONSO FERNANDEZ, A., SÖNDAHL, M.S. Caracterización antigénica e inmunogénica de varias cepas del serotipo Indiana de estomatitis vesicular aisladas en Brasil. Antigenic and immunogenic characterization of various strains of the Indiana serotype of vesicular stomatitis isolated in Brazil. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 51:23-26, 27-30, 1985.

4. ALONSO FERNANDEZ, A., SÖNDAHL, M.S., FERREIRA, M.E.V. Preparación de un suero polivalente para el diagnóstico del virus de la fiebre aftosa por fijación del complemento. Preparation of a polyvalent antiserum for diagnosis of foot-and-mouth disease virus by complement fixation. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 47-49:3-6, 7-10, 1983.
5. ASTUDILLO, V.M., ESTUPIÑAN, J., ROSENBERG, F., SILVA, A.J.M., DORA, J.F.P. Vesicular stomatitis in South America: description of data taken from the continental vesicular disease surveillance system. In: Proceedings of an International Conference on Vesicular Stomatitis. Mexico City, Mexico, 1984. p.23-83.
6. COTTRAL, G.E. Diagnosis of bovine vesicular disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 161:1293-1298, 1972.
7. De CASTRO, M.P. Behaviour of the foot-and-mouth disease virus in cell cultures: susceptibility of the IBRS-2 cell line. *Arch. Inst. Biol.*, S.Paulo, 31:63-78, 1964.
8. FEDERER, K.E., BURROWS, R., BROOKSBY, J. B. Vesicular stomatitis virus: the relationship between some strains of the Indiana serotype. *Res. Vet. Sci.*, 8:103-117, 1967.
9. FERRIS, N.P., DAWSON, M. Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth disease and swine vesicular disease. *Vet. Microbiol.*, 16:201-209, 1988.
10. FERRIS, M.P., DONALDSON, A.I. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis for the vesicular stomatitis virus antigen. *Vet. Microbiol.*, 18:243-258, 1988.
11. McPHERSON, I.A., STOKER, M.G.P. Polymer transformation of hamster cell clons. An investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*, 16:147-151, 1962.
12. ROEDER, P.L., Le BLANC SMITH, P.M. Detection and typing of foot-and-mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Res. Vet. Sci.*, 43:225-232, 1987.

