

<b>Comunicación Breve</b>
---------------------------

## DESEMPEÑO DE UN ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE ELECTROTRANSFERENCIA RÁPIDO PARA LA DETECCIÓN DE BOVINOS EXPUESTOS AL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

Ingrid E. Bergmann, Viviana Malirat

*Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)*  
Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

*Se evaluó la efectividad de un ensayo inmunoenzimático de electrotransferencia (EITB) para la detección de anticuerpos contra antígenos de replicación del virus de la fiebre aftosa (VFA) en bovinos expuestos al mismo. El ensayo EITB, que utiliza como sondas serológicas antígenos virales no estructurales producidos por bioingeniería y altamente purificados, se comparó con la prueba tradicional de inmunodifusión en gel de agar (prueba VIAA), que emplea un antígeno asociado a la infección viral parcialmente purificado. Se evaluó la sensibilidad y especificidad de ambas pruebas mediante el estudio de 110 sueros de bovinos naturalmente expuestos, y con comprobado estado de infección, así como de sangrías seriadas de 25 animales infectados experimentalmente, y de 1.899 sueros de animales de regiones libres de FA (1.058 de los cuales provenían de bovinos vacunados sistemáticamente). Además se realizaron estudios en 43 bovinos para evaluar la sensibilidad de estas pruebas para reconocer animales persistentemente infectados. Los resultados indicaron que, comparado con la prueba VIAA, el ensayo EITB es más sensible y específico para detectar bovinos expuestos al VFA, aun durante la infección persistente, y especialmente en regiones con vacunación sistemática. Por lo tanto, se recomienda el uso del EITB como una prueba sensible, segura, rápida y económica para la detección específica de exposición viral en el campo.*

Debido a la habilidad del virus de la fiebre aftosa (VFA) de establecer infección subclínica en bovinos y otros rumiantes (3,6,9,10,15,16,17), el desarrollo de métodos confiables para la detección de actividad viral asintomática en una población animal sería una contribución importante, tanto para los programas de erradicación vigentes en América del Sur cuanto para el comercio internacional de ganado y subproductos de origen animal.

En regiones endémicas donde se realizan programas sistemáticos de vacunación, la identificación de bovinos infectados debe basarse en pruebas capaces de diferenciar los animales infectados de aquellos que están solamente vacunados. Mientras que las vacunas inducen anticuerpos principalmente contra antígenos estructurales, la replicación viral en el hospedador induce, además de anticuerpos contra proteínas estructurales, aquellos correspondientes a las proteínas no estructurales. Así, los animales infectados pueden ser identificados en forma confiable mediante la detección de anticuerpos específicamente inducidos contra antígenos no estructurales y por lo tanto, contra el virus replicativo.

Solicitar separatas al:  
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

El uso del(de los) antígeno(s) asociado(s) a la infección viral (VIAA), formado por una mezcla compleja de proteínas de las cuales la polimerasa 3D es un componente principal, como sonda serológica en una prueba de inmunodifusión en gel de agar (prueba VIAA) (1,7,11,12) constituyó una herramienta valiosa para evaluar el estado de infección en bovinos vacunados.

Debido a la baja sensibilidad de la prueba VIAA, una cantidad considerable de animales expuestos puede dar resultados falso-negativos, especialmente en los estados tardíos de la infección persistente, durante los cuales hay una disminución significativa de los niveles de anticuerpos específicos de infección (4). Esto es especialmente importante en las pruebas para importación y exportación, y para evaluar la actividad viral residual en regiones con programas avanzados de erradicación. Además, resultados VIAA positivos pueden ser inducidos por vacunas actualmente usadas que contienen una elevada concentración de antígenos de VFA impuros, especialmente después de repetidas vacunaciones (2,4,8,14). Esto puede dar un elevado porcentaje de resultados falso-positivos, no aceptable, que interferiría en la evaluación de muestreos seroepidemiológicos, especialmente en poblaciones con baja prevalencia de FA.

Para superar las limitaciones mencionadas, el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa desarrolló un ensayo inmunoenzimático de electrotransferencia (EITB) seguro, rápido, de bajo costo y simple ejecución, capaz de identificar animales con infección persistente, independiente de su estado de vacunación (4,13). Usando solo una pequeña cantidad de suero, este ensayo permite detectar anticuerpos contra los polipéptidos 3A, 3B, 2C, 3D y 3ABC producidos por el virus durante su replicación en el hospedador. Utilizando este método se demostró la eliminación de resultados falso-negativos obtenidos mediante la prueba VIAA en sueros con títulos bajos, así como de resultados falso-positivos de la prueba VIAA, ocasionados por la reactividad de sueros de animales vacunados (4).

El objetivo de este estudio fue extender trabajos anteriores sobre sensibilidad, especificidad y confiabilidad del EITB para detectar animales positivos al VFA, incluyendo aquellos

infectados subclínicamente, independiente de su estado de vacunación.

El ensayo utiliza como sondas serológicas un conjunto de antígenos virales no estructurales obtenidos por técnicas de ADN recombinante, purificados hasta homogeneidad electroforética (13). Una mezcla de 20 ng/mm de cada una de las proteínas no estructurales del VFA, 3A, 3B, 2C, 3D y 3ABC se resuelve por electroforesis en un gel de poliácridamida al 12,5% y se transfiere a membranas de nitrocelulosa. Las reacciones inmunoenzimáticas se realizan de acuerdo con lo descrito (13). El ensayo es utilizado como una prueba de *screening* en una única dilución. Como alternativa se puede obtener información semicuantitativa a través de la titulación de los sueros reaccionantes.

Para cada hoja de nitrocelulosa que define un gel transferido se deben incluir duplicados de los sueros controles. Estos sueros controles primarios incluyen: a) un control positivo proveniente de un *pool* de sueros de animales comprobadamente infectados; b) un control positivo débil proveniente de un *pool* de sueros de animales que mostraron un nivel de anticuerpos igual al más alto registrado por EITB en regiones de muy bajo riesgo epidemiológico (tres años después del último brote); c) un control límite (*cut-off*) proveniente de un *pool* de sueros con la máxima reactividad observada por EITB en animales de regiones libres de FA, sin vacunación; d) un control negativo proveniente de un *pool* de sueros de animales en regiones libres de FA, sin vacunación.

Para que el ensayo sea válido, las tiras con los sueros controles positivos, débilmente positivos y los *cut-off* deben mostrar reacción con todos los antígenos, mientras que las tiras de suero control negativo no deben mostrar ninguna reactividad. Una muestra se considera EITB negativa si todas las bandas de proteína viral están por debajo de la reactividad del control *cut-off*, o si un máximo de dos líneas de antígenos están por encima del nivel del control *cut-off*. Una muestra se considera EITB positiva si los cinco antígenos muestran reactividad igual o superior al nivel del control *cut-off*. Una muestra es indeterminada si los criterios para positivo o negativo arriba mencionados no son alcanzados.

La sensibilidad fue estimada por la evaluación de 110 sueros de animales involucrados en brotes de campo y comprobadamente infectados, recolectados 20 días después del apareamiento de la enfermedad. Como se ve en el cuadro 1, el EITB identificó correctamente todos los sueros de los bovinos infectados como positivos. También se muestra una comparación con los resultados obtenidos por la prueba VIAA. Solo 88 de estos sueros fueron positivos por la prueba VIAA. La población positiva al VFA también incluyó 10 bovinos vacunados y 15 sin vacunar que fueron inoculados con VFA. Los sueros antes de la inoculación fueron negativos por ambas pruebas, VIAA y EITB, pero a los 14 días posinoculación todos los sueros dieron resultados EITB positivos, independiente de la vacunación. En este caso, todas las muestras fueron VIAA positivas, aunque con títulos de 10 a varios miles de veces más bajos que los obtenidos por el método EITB. Estos resultados indican que la sensibilidad del EITB, usando el nivel de *cut-off* mencionado, es de 100%.

Sin embargo continúa la pregunta sobre la sensibilidad de la prueba de EITB para reconocer animales persistentemente infectados por VFA en los estados tardíos de la infección, durante los cuales los títulos de los sueros serían bastante bajos, y el estado de infección del animal es difícil de evaluar con seguridad (4) por los procedimientos disponibles en el presente (5). Con este propósito se realizaron estudios en un grupo de 15 animales no vacunados, infectados experimentalmente, y mantenidos en aislamiento por dos años. Se tomaron muestras seriadas de fluidos esofágico-faríngeos (EF) y de sangre a intervalos de 15 ó 30

días. Los resultados indican que la prueba EITB es adecuada para detectar, consistentemente, anticuerpos del VFA persistentes en los estados tardíos de la infección, durante los cuales los resultados de la prueba VIAA ya no fueron positivos, y el virus no fue recuperado de fluidos EF, o solo lo fue ocasionalmente. El cuadro 2 muestra los datos de 4 de los 15 animales estudiados. Conclusiones similares fueron deducidas de un grupo de ocho bovinos vacunados infectados experimentalmente y otro de 20 animales infectados naturalmente y sometidos a vacunación sistemática (datos no mostrados).

El hecho de que varios animales estudiados mantenían seropositividad por EITB, aun después de los 350 días del último aislamiento de VFA (ejemplos en los animales A y D, cuadro 2), indica que los anticuerpos contra los antígenos de replicación persisten por más tiempo que el virus en la región EF, por lo menos cuando se aplican los métodos actualmente en uso. Por lo tanto, la prueba EITB permite la detección de animales con previa exposición al VFA con mayor sensibilidad. En contraposición, la prueba VIAA ya se torna negativa, aun en tiempos en que el virus todavía puede ser recuperado frecuentemente de fluidos EF (cuadro 2).

Se evaluó la especificidad en un grupo de sueros de bovinos de regiones libres de FA, como El Salvador, Panamá, Chile, la Patagonia argentina y Uruguay, así como en sueros de bovinos seleccionados para las pruebas de potencia de vacunas. Los resultados de este estudio se presentan en el cuadro 3 y muestran que no se observaron sueros positivos por EITB. Sin embar-

**CUADRO 1. Resultados del EITB y de la prueba VIAA en bovinos positivos al VFA**

Animales positivos al VFA	Total sueros	Prueba VIAA		EITB	
		(+)	(-)	(+)	(-)
Naturalmente infectados	110	88	22	110	0
Experimentalmente infectados (vacunados)	10	10	0	10	0
Experimentalmente infectados (sin vacunar)	15	15	0	15	0

**CUADRO 2. Frecuencia de determinaciones positivas por recuperación de virus (EF), pruebas VAA y EITB durante el curso de infecciones persistentes**

Bovino	Días posinfección														
	Hasta 150			150-300			300-450			450-600			600-750		
	EF	VIAA	EITB	EF	VIAA	EITB	EF	VIAA	EITB	EF	VIAA	EITB	EF	VIAA	EITB
A	4/11*	10/11	11/11	3/10	10/10	10/10	1/5	0/5	5/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	5/5
B	10/11	10/11	11/11	5/10	10/10	10/10	2/5	0/5	5/5	1/5	0/5	5/5	1/6	0/6	6/6
C	8/11	10/11	11/11	2/10	9/10	10/10	1/5	0/5	5/5	1/5	0/5	5/5	2/5	0/5	5/5
D	7/11	10/11	11/11	4/10	8/10	10/10	2/5	0/5	5/5	1/5	0/5	5/5	0/5	0/5	5/5

\* Número de positivos/Número de determinaciones totales.

**CUADRO 3. Especificidad del EITB y de la prueba VAA**

Región libre de FA	Total sueros	Interpretación de EITB			Prueba VAA	
		Positivo	Indeterminante	Negativo	Positivo	Negativo
Sin vacunación	841	0	2	839	0	841
Con vacunación (< 2 años)	517	0	2	515	21	496
Con vacunación (> 2 años)	541	0	6	535	36	505

go, algunos de estos sueros dieron reactividad indeterminada, aunque débil. Los valores de especificidad por EITB fueron 99,8% en las áreas libres sin vacunación, 99,6% y 98,9% para los animales con menos o más de dos años de edad, respectivamente, en las áreas libres con vacunación. Al contrario, la prueba VIAA dio una especificidad mucho más baja, especialmente en las regiones con vacunación sistemática (95,9% y 93,3% en animales con menos o más de dos años de edad, respectivamente). Esto probablemente resulta de la interferencia de las vacunas, que bajo los programas actuales de inmunización utilizan antígenos concentrados.

Además, como ya se informó (4), la respuesta de sueros de animales infectados con virus bovinos a ARN (diarrea viral bovina, lengua azul, coronavirus bovino, peste bovina, estomatitis vesicular, fiebre efímera del bovino) o virus a ADN (estomatitis papular bovina, rinotraqueitis infecciosa bovina, herpes bovino tipo 2, fiebre catarral maligna) indicaron falta de reactividad cruzada.

Se obtuvieron resultados satisfactorios de variabilidad inter e intraensayo cuando se evaluó la reproducibilidad de la prueba utilizando muestras débilmente positivas.

La alta especificidad y sensibilidad del método, así como su simple y rápida ejecución, bajo costo, y fácil implementación, que permite el estudio de varias muestras, lo hace adecuado para seleccionar animales durante las pruebas para importación y exportación así como para la realización de encuestas seroepidemiológicas en gran escala. En regiones con vacunación sistemática es especialmente importante, pues la evaluación precisa de la actividad viral es una contribución esencial para la decisión de continuar o suspender la vacunación.

## REFERENCIAS

- ALONSO FERNÁNDEZ, A., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., ROSENBERG, F. El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa./The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 17-18:17-22, 1975.
- ALONSO, A., GOMES, I., BAHNEMANN, H.G. La inducción de anticuerpos anti-VIAA en bovinos vacunados y revacunados con vacuna inactivada antiaftosa./The induction of antibodies against VIAA in cattle vaccinated and revaccinated with inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 54:51-54, 1988.
- AUGÉ DE MELLO, P., HONIGMAN, M.N., FERNÁNDEZ, M.V., GOMES, I. Further information on the survival of modified foot-and-mouth disease virus in cattle. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 73:489-505, 1970.
- BERGMANN, I.E., AUGÉ DE MELLO, P., NEITZERT, E., BECK, E., GOMES, I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am. J. Vet. Res.*, 54(6):825-831, 1993.
- BERGMANN, I.E., MALIRAT, V. Enfoques moleculares para el diagnóstico en laboratorio de la infección persistente con el virus de la fiebre aftosa: Revisión./Molecular approaches to laboratory diagnosis of persistent foot-and-mouth disease virus infection. A review. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 59:153-177, 1993.
- BURROWS, R. Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *J. Hyg.*, 64:81-90, 1966.
- COWAN, K.M., GRAVES, J.H. A third antigenic component associated with FMD infection. *Virology*, 30:528-540, 1966.
- DAWE, P.S., PINTO, A.A. Antibody response to type specific and "virus infection associated" (VIA) antigens in cattle vaccinated with inactivated polyvalent FMD virus in northern Malawi. *Br. Vet. J.*, 134:504-511, 1978.
- HEDGER, R.S. The isolation and characterization of foot-and-mouth disease virus from clinically normal herds of cattle in Botswana. *J. Hyg.*, 66:27-36, 1968.
- KAADEN, O.R., EISSNER, G., BOHM, H.O. Untersuchungen über Maul- und Klauenseuche (MKS)-Virusdauerasscheider bei vakzinieren und experimentell infizierten Rindern. *Zbl. Vet. Med. B.*, 17:485-496, 1970.
- LOBO, C.A., HANSON, R.P., GUTIÉRREZ, A., BELTRÁN, L.E. Serological detection of natural FMD infection in cattle and pigs. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 85:1075-1104, 1976.
- MeVICAR, J.W., SUTMÖLLER, P. FMD: The agar gel diffusion precipitin test for antibody to

- virus-infection associated (VIA) antigen as a tool for epizootologic surveys. *Am. J. Epidemiol.*, 92: 273-278, 1970 .
13. NEITZERT, E., BECK, E., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., BERGMANN, I.E. Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infections. *Virology*, 184:799-804, 1991.
  14. PINTO, A.A., GARLAND, A.J.M. Immune response to virus-infection-associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth disease virus inactivated by formalin or acetylenimine. *J. Hyg.*, 82:41-50, 1979.
  15. SUTMÖLLER, P., GAGGERO, A. Foot-and-mouth disease carriers. *Vet. Rec.*, 77:968-969, 1965.
  16. SUTMÖLLER, P., McVICAR, J.W., COTTRAL, G.E. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 23:227-235, 1968.
  17. VAN BEKKUM, J.G., FRENKEL, H.S., FREDERIKS, H.H.J., FRENKEL, S. Observation on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, 84:1159-1164, 1959.
-