

Utilización del Método de Elisa en la detección directa de antígeno de virus diarrea viral bovina en muestras de suero sanguíneo de bovinos*

Use of an ELISA test in the direct diagnosis of viral antigens of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in bovine blood serum samples.

G. REINHARDT¹, M.V., Dr. med. vet.; C. A. OCHOA¹, M.V.; N. TADICH² M.V., Ph.D.; S. RIEDEMANN¹, T.M., M.V.

¹Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias

²Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, casilla 567, Valdivia, Chile. greinhar@uach.cl

SUMMARY

BVDV is an important virus of cattle worldwide that induces to substantial economic losses in dairy farms. The major source of infection are secretions and excretions of immunotolerant and persistent infected cattle. That condition is acquired during the early gestational period.

The scope of this communication is to inform the use of an ELISA test to detect BVDV persistent infected bovine using blood serum samples in cattle of 9 dairy farms from the Xth. Region of Chile.

The results indicated that 0.3% of the serum samples were positive to the ELISA test, and 33.3% of the dairy herds with persistently infected animals.

It is concluded that this method diagnose persistently infected cattle, and is very easy to manipulate therefore, is possible to test many animals in few hours.

Palabras claves: Diarrea Viral Bovina, ELISA, infección persistente.

Key words: Bovine Viral Diarrhea, ELISA, persistent infection.

INTRODUCCION

Diarrea Viral Bovina (DVB) afecta al ganado bovino y fue descrito por primera vez en Nueva York (EE.UU.), como una gastroenteritis acompañada de diarrea suave, úlceras en mucosa oral y nasal, y abortos en hembras gestantes (Olafson y col., 1946). Años más tarde se describió la Enfermedad Mucosa (EM) en ganado de carne y leche de diferentes edades en Iowa y otros estados de EE.UU., donde también se observaron lesiones ulcerativas a nivel de mucosas y diarrea (Ramsay y Chivers, 1953). Ambos cuadros se deben al mismo agente, el virus Diarrea Viral Bovina (VDBV),

perteneciente al género *Pestivirus* de la familia Flaviviridae (Baule, 2000).

La infección por VDVB se encuentra ampliamente diseminada a través del mundo y aunque la prevalencia de la infección varía entre los diferentes estudios realizados en diversos países, ella tiende a ser endémica en la mayoría de los países con población bovina importante, de modo que el 60-80% del ganado presenta anticuerpos frente al agente y entre el 1 al 2 % está persistentemente infectado (Houe, 1999). En Chile, estudios de seroprevalencia indican porcentajes que varían de 69.2% para la IX Región a 77.8% en la X Región (Reinhardt y col., 1990), y en la Región Metropolitana se informa de prevalencias de 59.7% para el ganado de leche (Celedón y col., 1996), y de 86% para el ganado de carne (Palacios, 1996).

Aceptado: 09.12.2002.

* Financiado por proyecto FONDECYT 1990717.

El diagnóstico definitivo de la enfermedad se realiza tradicionalmente por el aislamiento e identificación del virus mediante su multiplicación en cultivos celulares, lo que habitualmente no presenta mayores dificultades (Dubovi, 1996); sin embargo, la presencia de cepas no citopáticas (ncp) complica la situación y obliga a evidenciarlo mediante técnicas como la inmunofluorescencia o la inmunoperoxidasa (Bezek, 1995), lo que hace que el proceso sea largo e impida un resultado rápido, requiriendo de varios días e incluso semanas para obtener un resultado (Ruth, 1986).

La técnica de ELISA para la detección de antígeno viral se basa en el método “sandwich”, que combina la acción de un anticuerpo de captura unido a una fase sólida y de un anticuerpo detector, marcado con un sistema señalizador como es la peroxidasa, la sensibilidad que presenta este método es equivalente a la del aislamiento viral (OIE, 2000).

Por lo anteriormente planteado, la presente comunicación utiliza el método de ELISA-antígeno para la detección de animales persistentemente infectados en planteles lecheros de la Xª Región de Chile, a partir de muestras de suero sanguíneo, con el propósito de evaluar su uso para el control de esta importante enfermedad en los rebaños de lechería de Chile.

MATERIAL Y METODOS

Para la realización de este estudio se utilizó un total de 9 planteles lecheros de la Xª Región de Chile, elegidos a partir de un trabajo previo que abarcó un total de 50 predios en los que se realizó un estudio serológico para conocer la prevalencia predial de DVB. Los predios seleccionados presentaban seroprevalencias que fluctuaban entre 35 y 85%.

De los 9 planteles seleccionados se recolectaron muestras de sangre a la totalidad de animales negativos al primer muestreo serológico y a todos aquellos mayores de 6 meses que no hubiesen sido muestreados con anterioridad, con el objeto de realizarles un nuevo análisis serológico. Las muestras se colectaron en tubos Venojet a partir de la vena yugular y fueron

enviadas al Instituto de Microbiología donde se procesaron, de modo que se obtuvo el suero que se almacenó en tubos Eppendorf a -30° C hasta su utilización.

Se utilizó la técnica de ELISA tanto para el análisis serológico como para el diagnóstico de antígeno de VDVB.

Para el análisis de anticuerpos se utilizó un kit comercial contra VDVB (Chekit-BVD-Sero*), cuyas microplacas se encuentran sensibilizadas con antígeno, los pocillos pares con un antígeno control y los impares con antígeno VDVB inactivado.

Para el análisis de antígeno se utilizó igualmente un kit comercial (Chekit-BVD-virus-II*) el que detecta la glicoproteína estructural E^{ms} del virus Diarrea Viral Bovina en muestras de suero o plasma sanguíneos.

Luego de las incubaciones y lavados correspondientes se realizó la lectura de las microplacas en un espectrofotómetro Multiskan MK II a una longitud de onda de 405 nm y que interpreta la intensidad del color de la reacción provocada por el cromógeno.

Para la interpretación de los resultados se realizó un cálculo que consistió en el promedio de la densidad óptica de los duplicados de cada suero problema, a las que se les restó el promedio del control negativo. Este promedio corregido se dividió por el promedio del control positivo también corregido, ya que igualmente se le restó el valor promedio del control negativo y el resultado se multiplicó por 100 para obtener un porcentaje, tal como se explica en la formula:

$$\text{Valor porcentual} = \frac{\text{DO muestra} - \text{DO ctrl. Negativo}}{\text{DO ctrl. positivo} - \text{Do ctrl.- negativo}} \times 100$$

En el caso de la prueba serológica, los valores menores de 30% se consideraron negativos, los que se encontraban entre 30 y 40% se consideraron dudosos y todos aquellos mayores de 40% resultaron positivos. Las muestras dudosas se repitieron para clasificarlas finalmente como positivas o negativas definitivas.

* Laboratorio Dr. Bomelli AG. Suiza

En el caso de la prueba de determinación de antígeno, los valores menores de 20% se consideraron negativos, los que se encontraban entre 20 y 30% eran dudosos y los mayores de 30% fueron positivos. Del mismo modo que en la prueba serológica las muestras dudosas se repitieron para clasificarlas definitivamente en negativas o positivas.

RESULTADOS Y DISCUSION

A partir de los 9 planteles lecheros seleccionados se analizó un total de 878 muestras de sueros que correspondían a animales negativos a pruebas serológicas anteriores y a los que habían llegado a la edad de 6 meses, para determinar aquellos negativos a los que se les realizaría la prueba de ELISA-antígeno para determinar los probables animales virémicos persistentes (PI).

En el cuadro 1 se entregan los resultados obtenidos tanto con el método de ELISA-anticuerpo como con el método de ELISA-antígeno, este último repetido en aquellos animales que resultaron positivos a la primera prueba de antígeno luego de un lapso no inferior a 3 semanas, a fin de constatar la persistencia viral.

De las 878 muestras de suero analizadas mediante la prueba de ELISA-anticuerpo,

resultaron 543 positivas, los que representa un 61.8% del total analizado con prevalencias prediales que fluctuaron entre 24% y 94% que indican la alta presencia de la infección con el VDVB en la mayoría de los planteles analizados.

En los 335 animales sin respuesta de anticuerpos se procedió a la realización de la prueba de ELISA-antígeno, con los resultados que se entregan en el cuadro 1 y que indican que en el primer muestreo 5 animales de diferentes planteles resultaron positivos, esto es infectados con el agente viral, lo que corresponde a 0.6% del total de los animales muestreados y el 55.6% de los planteles estudiados.

Para considerar un animal persistentemente infectado debe repetirse la prueba de ELISA-antígeno a lo menos con 3 semanas de diferencia, situación que se efectuó con todos aquellos animales que resultaron positivos en el primer muestreo y que correspondieron a 5, realizada la segunda prueba sólo 3 de ellos continuaban positivos y por lo tanto eran animales PI definitivos, en cambio los 2 restantes habrían presentado una infección aguda transitoria en el momento de la realización de la primera prueba de ELISA-antígeno, situación esperable en nuestros planteles toda vez que en un estudio realizado por Celedón y col. (1997), en 33 animales sospechosos de enfermedad clínica de

CUADRO 1. Resultados de pruebas de ELISA-anticuerpo y ELISA-antígeno por predio y muestras de animales mayores de 6 meses negativos a exámenes previos.

Results of ELISA-antibody and ELISA-antigen in herds and in samples of cattle older than 6 month negative to prior examination.

Predio	Muestra total	Animales seropositivos		Animales Seronegativos		1° Muestreo ELISA-Ag.		2° Muestreo ELISA-Ag.	
						Prtje.	Prtje.		
1	144	76	52.8%	68	47.2%	1	0.7	1	0.7
2	98	92	93.9%	6	6.1%	1	1.0	1	1.0
3	185	93	50.3%	92	49.7%	0			
4	53	24	45.3%	29	54.7%	0			
5	63	51	81.0%	12	19.0%	1	1.6	0	
6	117	99	84.6%	18	15.4%	1	0.9	1	0.9
7	80	19	23.8%	61	76.2%	0			
8	60	33	55.0%	27	45.0%	0			
9	78	56	71.8%	22	28.2%	1	1.3	0	
Total	878	543	61.8%	335	38.2%	5	0.6	3	0.3

BVD pudo aislar la cepa viral en 23 de ellos, lo que indica la alta diseminación de la enfermedad.

Con esos resultados la prevalencia a nivel de toda la muestra analizada alcanzó sólo a un 0.3%, variando entre los predios positivos entre 0.7% y 1% y la prevalencia predial fue de un 33.3%.

Los resultados obtenidos indican que la presencia de animales PI son una fuente importante en la diseminación de la infección con VDVB a nivel intrapredial, ya que en aquellos planteles con presencia de dichos animales la prevalencia de animales con anticuerpos fue siempre superior al 50% como se puede observar en el cuadro 1. Por otra parte, si bien el porcentaje de prevalencia de animales PI, considerando que la muestra total es baja (0.3%), y menor de lo que describe la literatura internacional consultada, donde se manifiesta que esos valores fluctúan entre 0.5 y 2.0% (Houe, 1999) y los estudios realizados en países como Suecia, con un 1.3% (Alenius y col., 1986), Dinamarca con un 1.4% (Houe y Meyling, 1991), en Alemania un 2.1% (Frey y col., 1996), Suiza con un 0.9% (Braun y col., 1998), y Bélgica con un 0.8% (Schreiber y col., 1999), se explica fundamentalmente por el hecho de que este estudio formó parte de un proyecto que se viene realizando desde hace 3 años y que se han estado eliminando animales PI en estos predios con anterioridad, pero usando otros métodos de diagnóstico. Por otra parte, influye también la alta proporción de terneros que se remueven de los planteles luego de su nacimiento (Rüfenacht y col., 2000), la tasa de mortalidad de los terneros PI que alcanza al 50% durante el primer año de vida (Baker, 1987) y por último el hecho de que esos animales sean removidos del rebaño debido a su escaso rendimiento (Rüfenacht y col., 2000).

Este estudio permitió también el análisis de la prevalencia de rebaños con animales PI, la que correspondió a un 33.3%. En relación con este resultado puede manifestarse que sólo existen algunos pocos estudios al respecto en la literatura internacional, es así como en Dinamarca informan de 10 rebaños de 19, lo que corresponde a un 53%, en EE.UU., en 3 de 20 rebaños (15%), en Alemania, 149 rebaños de 329

con un 45% y por último Australia que informa 7 rebaños de entre 21, lo que representa un 33% (Houe y Meyling, 1991; Houe y col., 1995; Frey y col., 1996; Bock y col., 1997). Del mismo modo, Bitsch y Ronsholt (1995), en Dinamarca, al estudiar la enfermedad en estanques de leche de 16.113 rebaños lecheros estimaron que el 39% de los planteles tendrían animales PI. Esos resultados coinciden en general con los nuestros y reafirman la necesidad de la búsqueda de estos animales que eliminan el agente en forma continua y en gran intensidad.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que el ELISA-antígeno utilizado en este estudio identifica individuos PI en una cantidad grande de animales, lo que indica que pueden realizarse análisis en poblaciones ganaderas de tamaño importante en forma rápida y sencilla, de manera que se podría implementar un sistema de control de la enfermedad a nivel predial con evidentes ventajas sobre otros métodos más engorrosos como el cultivo, aislamiento e identificación del virus en cultivos de células.

RESUMEN

El virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es un agente infeccioso importante del ganado bovino y está distribuido ampliamente en el mundo, produciendo pérdidas económicas sustanciales en la producción pecuaria.

La principal fuente de contagio de los animales susceptibles está en las secreciones y excreciones de los animales infectados persistentes e inmunotolerantes (PI), condición que se produce en la etapa gestacional, específicamente antes de los 120 días de preñez, período en que el sistema inmune del embrión aún no se desarrolla adecuadamente.

El propósito de este estudio fue aplicar la utilización de un método inmunoenzimático (ELISA-antígeno) para detectar la presencia de animales PI en planteles lecheros de la Xª Región de Chile, a partir de muestras de suero sanguíneo. Para ello se examinaron 335 sueros de bovinos provenientes de 9 predios.

Los resultados obtenidos indican que el 33.3% de los planteles analizados presentaron

algún animal PI y que a nivel de prevalencia intrapredial, ella varió entre 0.7 y 1.0%.

Se concluyó que el método utilizado permite detectar animales PI en forma rápida y sencilla, pudiendo utilizarse en gran cantidad de muestras.

BIBLIOGRAFIA

- ALENIUS, S., S. O. JACOBSEN, E. CAFARO. 1986. Frequency of bovine viral diarrhoea virus infections in Sweden among heifers selected for artificial insemination. *Proc. World Congr. Diseases of cattle*. 14: 204-207
- BAKER, J. C. 1987. Bovine viral diarrhoea virus: A review. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 190: 1449-1458.
- BAULE, C. 2000. Molecular characterization of bovine viral diarrhoea virus, an important pathogen of cattle. *Acta Univ. Agric. Sueciae*. 95: 9-38.
- BEZEK, D. M. 1995. Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection: Individual and herd diagnosis. *Comp. Cont. Educ. Prac. Vet.* 17: 57-63.
- BITSCH, V., L. RØNSHOLT. 1995. Control of bovine viral diarrhoea virus infection without vaccines. *Vet. Clin. North. Am.: Food Anim. Pract.* 11: 627 - 640.
- BOCK, R. E., B. J. RODWELL, M. MCGOWAN. 1997. Detection of calves persistently infected with bovine pestivirus in a sample of dairy calves in south-eastern Queensland. *Aust. Vet. J.* 75: 656-659.
- BRAUN, U., M. SCHÖMANN, F. EHRENSPERGER, M. HILBE, D. BRUNNER, K. D. C. STÄRK, T. GIGER. 1998. Epidemiology of bovine virus diarrhoea in cattle on communal alpine pastures in Switzerland. *J. Vet. Med.* 45: 445-452.
- CELEDÓN, M. O., C. VARGAS, A. SALINAS, A. CASANAV, L. IBARRA, P. BERRÍOS. 1996. Prevalencia serológica para el virus de la diarrea viral bovina y de la rinotraqueítis infecciosa bovina en ganado lechero de la Región Metropolitana de Chile. *Av. Cs. Vet.* 11: 22-27.
- CELEDÓN, M. O., L. ROCO, G. QUINTEROS, M. SANTIBÁÑEZ, P. BERRÍOS. 1997. Puesta en evidencia del virus diarrea viral bovina en bovinos clínicamente afectados. *Arch. Med. Vet.* 29: 189-195.
- DUBOVI, E. J. 1996. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet. Med.* 91: 867-872.
- FREY, H. R., U. FLEBBE, B. LIESS. 1996. Prävalenz und klinische Symptomatik persistenter BVD-virusinfektionen in Rinderbeständen Niedersachsens. *Prakt. Tierarzt.* 77: 49-52.
- HOUE, H., A. MEYLING. 1991. Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Prev. Vet. Med.* 11: 9-16.
- HOUE, H., J. C. BAKER, R. K. MAES, H. WURYASTUTI, R. WASITO, P. L. RUEGG, J. W. LLOYD. 1995. Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in 20 dairy herds in two counties in central Michigan and comparison of prevalence of antibody-positive cattle among herds with different infection and vaccination status. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7: 321-326.
- HOUE, H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64: 89-107.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SALUD ANIMAL. OIE. 2000. Manual of standards for diagnostic test and vaccines. 4th Ed. OIE, Paris, Francia.
- OLAFSON, P., A. D. MacCALLUM, F. H. FOX. 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* 36: 205-213.
- PALACIOS, L. R. 1996. Prevalencia serológica para el virus de la diarrea viral bovina en ganado de carne en predios de la Región Metropolitana. Memoria de título, Med. Vet. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
- RAMSEY, F. K., W. H. CHIVERS. 1953. Mucosal disease of cattle. *Nort. Am. Vet.* 34: 629-633.
- REINHARDT, G., S. RIEDEMANN, S. ERNST, M. AGUILAR, R. ENRIQUEZ, J. GALLARDO. 1990. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea/mucosal disease in southern Chile. *Prev. Vet. Med.* 10: 73-78.
- RÜFENACHT, J., P. SCHALLER, L. AUDIGÉ, M. STRASSER, E. PETERHANS. 2000. Prevalence of cattle infected with bovine viral diarrhoea virus in Switzerland. *Vet. Rec.* 147: 413-417.
- RUTH, G. R. 1986. Bovine viral diarrhoea: A difficult infection to diagnose. *Vet. Med.* 81: 870-874.
- SCHREIBER, P., F. DUBOIS, F. DREZE, N. LACROIX, B. LIMBOURG, P. COPPE. 1999. Prevalence of bovine virus diarrhoea virus infection in Belgian white blue cattle in southern Belgium. *Vet. Quart.* 21: 28-32.

