

## Influencia de las condiciones de incubación en la detección de anticuerpos contra el Virus de la Leucosis bovina por ELISA

Marina Lomónaco\*, Cecilia Martínez, Irene Álvarez, Gerónimo Gutiérrez, Romina Politzki y Karina Trono

\*Instituto de Virología, CICVyA-INTA (1686) Hurlingham, Bs. As.

(Recibido 27-03-2012; Aceptado: 04-12-2012)

\*Correo electrónico: mlomonaco@cnia.inta.gov.ars.

Los resultados de este trabajo fueron presentados en forma preliminar en el X Congreso Argentino de Virología: Buenos Aires. 26-29 de septiembre de 2011.

No existe conflicto de intereses.

### Palabras clave

Virus de la leucosis bovina, anticuerpos, ELISA, especificidad, temperatura.

### RESUMEN

En este trabajo se modificaron las condiciones de incubación del ensayo de ELISAp24 que detecta anticuerpos contra el Virus de la Leucosis bovina, con el propósito de evaluar si se reduce el número de resultados falsos y en consecuencia la factibilidad de usarlo con fines diagnósticos confirmatorios, ya que fue desarrollado y validado en nuestro laboratorio para el análisis y monitoreo de seroprevalencia a nivel rodeo y/o para tamizaje de muestras individuales. Se analizaron 128 muestras de suero pertenecientes a 2 rodeos infectados naturalmente de distinto sistema productivo y prevalencia individual, utilizando las condiciones estándar (20-25°C-30 minutos) y las modificadas (4-8°C-16-24hs). Los resultados evidencian que las condiciones modificadas no sólo mejoran la capacidad de detección de individuos infectados, sino que disminuyen el número de resultados falsos positivos. Estos hallazgos evidencian la factibilidad de utilizar el ensayo de ELISAp24 como método confirmatorio, y abren camino hacia la realización de un protocolo integral de validación para evaluar su performance diagnóstica, ya que la mejora independiente de la sensibilidad y la especificidad resulta de importancia crítica cuando se utiliza un ensayo para determinar el estado sanitario individual.

### Keywords

Bovine leukemia virus, Antibodies, ELISA, specificity, temperature.

### SUMMARY

**Influence of the incubation conditions on the detection of antibodies to bovine leukemia virus by ELISA.**

The p24ELISA assay has been developed in our laboratory for screening, seroprevalence analysis and/or surveillance of Bovine Leukemia Virus natural infection. In this work we modified the incubation conditions of the p24ELISA, with the final purpose to evaluate if the total number of false results can be reduced. We analyzed 128 samples from cattle of two herds naturally infected, an artificial insemination center and a commercial dairy farm using the previously defined (20-25°C-30min) and the modified (4-8°C-16-24hs) incubation conditions. The results show that the modified conditions not only improve the sensitivity but also the specificity of detection, since not only the number of false negative but also false positive results can be reduced. This evidence permits to lucubrate about the factibility to use the p24ELISA system for confirmatory diagnosis, and show the importance to follow up a complete validation protocol to finally evaluate the diagnostic performance of the assay. This is important since the independent modification of sensitivity and specificity is critical when some assay is used for confirmatory diagnosis.

### Introducción

La presencia de anticuerpos en sangre constituye un marcador de la infección con el Virus de la leucosis bovina o VLB, un retrovirus B-linfocitotrópico que genera una respuesta inmune persistente en los animales infectados, especialmente contra las proteínas virales gp51 de la envoltura y p24 de la cápside<sup>2</sup>. La prueba diagnóstica de inmunodifusión en gel de agar o IDGA es la más utilizada en nuestro país debido a su excelente especificidad, buena sensibilidad, bajo costo y facilidad de ejecución. Su desventaja prin-

cipal consiste en la subjetividad en la lectura, que se traduce en la obtención de resultados erráticos y/o inconclusos, y provoca en el veterinario o propietario, la decisión de utilizar un método alternativo, sobre todo con animales de alto valor económico, cuyo destino o el de sus sub-productos, es la comercialización.

En nuestro laboratorio se desarrolló un ensayo de ELISA para detectar anticuerpos contra la proteína p24 de la cápside viral (ELISA p24), para el uso en tamizaje individual o en el análisis de prevalencia y/o vigilancia epidemiológica de rodeos<sup>3</sup>. Este ensayo de-

mostró tener una buena performance comparativa con la prueba de IDGA, con un 98% y 87.4% de sensibilidad y especificidad, respectivamente. Estos porcentajes, aceptables para el propósito para el que fue desarrollado, no resultan óptimos para utilizarlo en situaciones de diagnóstico confirmatorio, donde el parámetro más apreciado es la especificidad. En este trabajo, se modificaron las condiciones de incubación de la muestra en el ensayo de ELISAp24, con el objetivo de analizar si se reduce el número de falsos resultados.

## Materiales y métodos

Se trabajó con muestras de 2 rodeos de distintos sistemas productivos naturalmente infectados con BLV: un centro de inseminación artificial (CIA, n=78, correspondientes al plantel completo de machos donantes de semen), y un tambo comercial (TC, n=50, correspondientes al 20% del total de vacas en ordeño). El CIA realiza monitoreos bianuales del estado de infección desde hace más de 10 años, y el TC se encuentra

enrolado en un proyecto de análisis de carga proviral de VLB concurrente en nuestro laboratorio, utilizándose en este trabajo las mismas muestras.

Se recibieron muestras de sangre con y sin anticoagulante. Todas las muestras de suero se analizaron por IDGA comercial (Synbiotics, Francia), aprobado por SENASA y por ELISA p24. Se utilizó el ELISAp24 en condiciones estándar (20-25°C durante 30 minutos) y modificadas (4-8°C durante 16-24hs) con el objetivo de evitar la

unión inespecífica de componentes del suero con algún componente del sistema. Con algunas muestras seleccionadas, se realizó un ensayo de ELISA comercial que detecta anticuerpos frente a la proteína viral gp51 (VMRD Inc., USA). La detección de provirus en sangre se realizó por PCR anidada (nPCR) y la cuantificación relativa de la carga proviral se realizó por PCR en tiempo real (RT-PCR), según fue reportado por Gutiérrez y col.<sup>4</sup>

**Tabla 1.**  
Prevalencia de seroreactores en los rodeos en estudio.

Establecimiento	IDGA	Elisa p24 estándar
CIA	19.2 %	26.5 %
TC	78%	66%

**Tabla 2.**  
Resultados de ELISAp24 en ambos rodeos en estudio, en condiciones estándar y modificadas.

		Incubación en condiciones estándar					
		CIA			TC		
		Pos	Neg	Total	Pos	Neg	Total
Incubación en condiciones modificadas	Pos	17	4 <sup>B</sup>	21	33	8 <sup>B</sup>	41
	Neg	10 <sup>A</sup>	47	57	0 <sup>A</sup>	9	9
	Total	27	51	78	33	17	50

Pos: nº de reactores positivos; Neg.: nº de reactores negativos; A-B indican subgrupos referidos en el manuscrito

**Tabla 3.**  
**Análisis de las muestras discordantes entre ambas condiciones de incubación.**

Rodeo	Muestra	Condiciones estándar		Condiciones modificadas		IDGA	ELISA gp51	nPCR	Carga proviral	
		Resultado	Reactividad (%)	Resultado	Reactividad (%)					
CIA <sup>A</sup>	798	+	25.38	- 1	6.16 -		-	-	nr	
	834	+	25.38	-	13.25	-	-	-	nr	
	824	+	26.57	-	16.92	-	-	-	nr	
	810	+	27.55	- 1	5.96 -		-	-	nr	
	823	+	27.87	-	11.57	-	-	+	nr	
	821	+	31.72	-	8.54 -		-	+	nr	
	688	+	33.51	-	11.55	-	-	-	nr	
	827	+	41.11	-	9.5	-	-	-	nr	
	791	+	45.6	-	6.45 -		-	-	nr	
	805	+	61.06	-	4.54 -		-	-	nr	
CIA <sup>B</sup>	480	- 1	4.45 +		25.51	+	++		nr	
	616	- 1	7.25 +		27.85	-	-	-	nr	
	816	- 2	1.15 +		25.38	-	-	+	nr	
	611	- 2	4.94 +		26.22	-	-	-	nr	
TC <sup>B</sup>	C20342	-	5	.1 +	2	7.7	-	+	-	Ind
	A2480	-	3	.3 +	2	8.01 +		+	+	Ind
	C3541	-	2	0.1	+	32.26	+	+	+	Ind
	A2337	-	9	.7 +	3	2.76 -		+	+	Baja
	A2396	-	4	.3 +	3	3.37 +		+	-	Ind
	C20229	-	1	4.9	+	37.06	+	+	+	Ind
	C10396	-	1	8.4	+	44.69	+	+	-	Ind
	E3424	-	2	1.2	+	62.26	+	+	-	Ind

Reactividad: < 25%: negativo; 25-100%: baja; >100%: alta.

Ind: carga proviral indetectable (<1 célula infectada / 5000 células no infectadas); Baja: carga proviral baja (entre 1/100 y 1/5000 células infectadas/no infectadas).

Los campos sombreados indican falsos resultados.

nPCR: PCR anidada; nr: no realizado, IDGA (Inmunodifusión en gel de agar); +: positivo, -: negativo

## Resultados y discusión

La prevalencia de anticuerpos por IDGA y ELISA p24 en ambas condiciones de incubación se puede observar en la Tabla 1. La Tabla 2 muestra los resultados comparativos del ELISA p24 en las 2 condiciones de incubación. En el rodeo CIA la concordancia de resultados entre ambas condiciones de incubación fue del 82 %. En este rodeo, 10 muestras cambiaron de estatus de positivo a negativo y 4 muestras de negativo a positivo (tabla 2, subgrupos A y B), cuando se modificaron las condiciones de incubación. Los resultados de IDGA y de ELISA comercial coincidieron con

los obtenidos en condiciones modificadas de incubación en 11 de las 14 muestras discordantes (Tabla 3). El ensayo de PCR permitió confirmar el estatus de infectado del animal 480. Entre las otras muestras discordantes, el ensayo de PCR no fue suficiente para definir la situación sanitaria real. En el rodeo CIA el cambio en las condiciones de incubación impactó en la especificidad relativa con los ensayos de IDGA y ELISA comercial, ambos aprobados por SENASA. En condiciones estándar de incubación, se hubieran declarado resultados falsos en 11 animales, 10 falsos positivos (CIA subgrupo A completo) y 1 falso negativo (muestra 480

subgrupo B), mientras que utilizando condiciones modificadas el número de falsos se redujo a 3 (muestras 616, 816 y 611). En el rodeo TC el cambio en las condiciones de incubación impactó en forma inversa. La concordancia de resultados entre ambas condiciones fue similar que en el rodeo CIA (84%). Sin embargo, en este caso se detectó un número mayor de animales positivos utilizando las condiciones modificadas (41 vs 33). Los resultados obtenidos con los sueros discordantes incubando en condiciones modificadas coincidieron con los obtenidos por IDGA y ELISA comercial en 6/8 y 8/8 muestras, respectivamente (Tabla 3).

En este caso, el cambio en las condiciones de incubación fue evidente en la sensibilidad, ya que se confirmaron como infectados entre 6 y 8 animales que hubieran sido declarados como negativos en condiciones estándar de incubación. La nPCR pudo confirmar el estatus de infectado en 4 de estos animales. Todos ellos tenían una carga proviral en sangre indetectable o baja (menos de 1% de células infectadas o aleucémicos). Todos los sueros discordantes se asociaron con niveles bajos de reactividad por ELISAp24 cuando reaccionaron con resultado positivo, con valores de reactividad cercanos al punto de corte (25%), alejados del suero positivo débil de placa (100%), y considerados dentro de la zona gris del ensayo de ELISAp24 descrito por Gutiérrez y *col.*<sup>3</sup> (Tabla 3). Esta reactividad baja puede estar conferida por una bajo nivel de provirus circulante y/o ser un resultado inespecífico.

Los resultados de este trabajo muestran que el cambio de temperatura y tiempo de incubación de las muestras afecta los resultados del ELISAp24 y evidencian un impacto diferente en los dos rodeos analizados, cuando se realiza un análisis comparativo con la prueba de utilización masiva en nuestro país, el IDGA. Si bien el número de animales y de rodeos no es suficiente para concluir sobre la performance diagnóstica del ensayo de ELISAp24, y constituye un sesgo importante para el análisis integral, los resultados muestran en forma objetiva que la reducción de la temperatura y el aumento del tiempo de incubación de las muestras, mejora el diagnóstico en situaciones individuales. Este hallazgo coincide con lo descrito en diversas pruebas donde se detectan complejos de unión antígeno-anticuerpo<sup>7</sup>, y que incluye a los ensayos de ELISA<sup>1,6</sup>. Las bajas temperaturas junto con el extenso tiempo de incubación, estarían aumentando la fuerza específica de unión y favoreciendo el equilibrio entre los anticuerpos presentes en la muestra y el antígeno p24 pegado a la placa, y asimismo, desfavoreciendo la unión de moléculas

no relacionadas, que provocan la respuesta inespecífica o background<sup>5</sup>. Este efecto sería el responsable de los dos hallazgos observados en este trabajo, ya que además de favorecer la unión específica, como sucede en el rodeo CIA, las condiciones modificadas estarían favoreciendo la unión de pequeñas cantidades de anticuerpos presentes en la muestra, que encontrarían el equilibrio de unión con el antígeno, como sucede en los animales del rodeo TC, donde aumenta la detección de animales infectados, y donde particularmente, se pudieron detectar 8 animales más como infectados, 6 de ellos declarados como positivos por IDGA y todos por ELISA comercial. Este efecto se puso en evidencia en los resultados crudos del ensayo, ya que se observó que la distribución de frecuencias de reactividades es más estrecha en condiciones modificadas que en condiciones estándar, debido a que la absorbancia cruda es más baja en los sueros de alta reactividad y más alta en los de baja reactividad, en comparación con las condiciones estándar de incubación (no mostrado). En este contexto es interesante el hecho de que algunos kits comerciales de ELISA proponen en forma aleatoria la utilización de 2 o más condiciones de incubación de las muestras, por lo que debería tenerse en cuenta de qué manera modifican la precisión diagnóstica las distintas opciones, debido a que según nuestra evidencia, los resultados podrían ser diferentes en las distintas condiciones de ensayo.

Considerando los resultados en forma conjunta, y teniendo en cuenta el análisis comparativo con la prueba de IDGA, se eliminaron 19 resultados falsos, 11 positivos y 8 negativos, en los rodeos CIA y TC, respectivamente, un 14.84% (19/128) del total de muestras analizadas. Debido a que el ensayo de nPCR no puede ser considerado para la confirmación del estatus sanitario, ya que tiene una sensibilidad diagnóstica inferior a los ensayos serológicos ya reportada<sup>3</sup>, la confirmación se realizó con un ELISA comercial, y los resulta-

dos del ensayo de nPCR se consideraron complementarios para re-afirmar la condición de animal infectado, como sucedió en ambos establecimientos, con las muestras positivas por IDGA pero negativas por ELISAp24. Una de las opciones para modificar la performance diagnóstica de un ensayo de ELISA es la de modificar el punto de corte, dependiendo de la necesidad de favorecer la sensibilidad o especificidad de la prueba en cuestión. Sin embargo, cuando se intentó esta estrategia con el ELISAp24 resultó imposible mejorar los resultados, debido a que la mejora en la sensibilidad resultaba en detrimento de la especificidad del sistema (no mostrado), a diferencia de lo obtenido en este trabajo, donde se observa que ambos parámetros se modifican en forma independiente al cambiar las condiciones de incubación. La evidencia obtenida indica que el estatus sanitario de los animales se estimaría mejor utilizando las condiciones de incubación modificadas, lo que redundaría en una ventaja en la performance diagnóstica del ensayo de ELISAp24, principalmente en animales con bajos niveles de respuesta humoral y baja carga proviral. En este contexto, la realización de un protocolo completo de validación resultaría importante para agregar valor a una herramienta útil en el campo del diagnóstico. Esto cobra importancia cuando se trata de confirmar el estatus sanitario de animales en los cuales la caracterización precisa resulta crítica, no sólo en términos sanitarios sino de valor agregado para la comercialización nacional e internacional. Asimismo, debería analizarse la posibilidad de aplicar un algoritmo diagnóstico para la confirmación de la infección con VLB debido a que según nuestros resultados y otros reportados, ningún ensayo disponible hasta el momento es capaz de detectar con precisión absoluta el estado de infección, por lo que debería considerarse la combinación de métodos, como sucede con otras enfermedades virales, para definir la situación con el menor margen de error.

## Bibliografía

1. **Cay AB, Van der Stede Y.** Influence of the incubation temperature and the batch components on the sensitivity of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect Aujeszky's disease virus glycoprotein E (gE). *Rev Sci Tech.* 2010; 29 (3): 565-71.
2. **Florins A, Gillet N, Asquith B, Boxus M, Burteau C, Twizere JC, et al.** Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Front Biosci.* 2007; 12: 1520-31.
3. **Gutiérrez G, Alvarez I, Politzki R, Lomónaco M, Rodríguez S, Dus Santos MJ et al.** Accurate detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. *Vet Microbiol* 2009; 137 (3-4): 224-34.
4. **Gutiérrez G, Alvarez I, Politzki R, Lomónaco M, Dus Santos MJ, Rondelli F et al.** Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet Microbiol* 2011; 151 (3-4): 255-63.
5. **Lipschultz CA, Yee A, Mohan S, Li Y, Smith-Gill SJ.** Temperature differentially affects encounter and docking thermodynamics of antibody-antigen association. *J Mol Recognit* 2002; 15 (1): 44-52.
6. **Parkash O, Kumar A, Arora ML.** Low temperature incubation improves the performance of anti-phenolic glycolipid-I antibody detecting ELISA in leprosy patients. *J Med Microbiol* 2007; 56 (Pt 3): 438-40.
7. **Reverberi R, Reverberi L.** Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus* 2007; 5 (4): 227-240.