

## Factibilidad del uso de la proteína recombinante VP3 de Gumboro en un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA

**Alfonso, A. y Noda, Julia** Dirección de Microbiología, Grupo de Virología Animal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: [abdulahi@censa.edu.cu](mailto:abdulahi@censa.edu.cu)

---

### Resumen

Nuestro objetivo fue demostrar la factibilidad del empleo de la proteína recombinante VP3 del virus de la enfermedad de Gumboro para el desarrollo de un ELISA indirecto que permita detectar anticuerpos específicos a esta proteína. Los sueros positivos se obtuvieron por inoculación experimental. Se empleo el formato de ELISA indirecto y se titularon los reactantes por el método de tablero de ajedrez. Para la realización del ELISA indirecto una placa de 96 pozos fue recubierta con la proteína recombinante VP3 a razón de 5 ug/ml y se emplearon diluciones de suero y conjugado de 1:100 a 1:600 y de 1:12500 a 1:100000 respectivamente. Los resultados arrojaron una excelente diferenciación entre los sueros positivos y negativos en las diferentes diluciones, sobre todo en las diluciones inferiores. Se apreció una disminución progresiva de la densidad óptica del suero positivo con el aumento de las diluciones del mismo y del conjugado, a excepción del negativo, demostrando una reacción específica del analito (IgY) por la proteína VP3. Pudimos determinar que tanto los reactivos, metodología y protocolos seleccionados nos permiten distinguir muy bien entre los sueros positivos reactivos a VP3 y los negativos, demostrándose además que dicho ensayo poseía una tendencia a dar muy poco fondo. Con estos resultados podemos concluir que el uso de la proteína recombinante VP3 de Gumboro es factible para su empleo en el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA.

**Palabras clave:** Gumboro; anticuerpos; ELISA; proteína recombinante; VP3

---

### Abstract

Our objective was to demonstrate the feasibility of the use of the recombinant VP3 protein of the Infectious Bursal Disease Virus for the development of an indirect ELISA for the detection of antibodies against this protein. Positive sera were obtained by experimental inoculation. We use the indirect ELISA. Sera and reactants were titled for the chessboard

method. For the preparation of indirect ELISA, 96-well plate was recovered with the recombinant VP3 protein at 5 ug/ml and dilutions of sera and conjugate of 1:100 to 1:600 and of 1:12500 to 1:100000 respectively were used. The results showed an excellent differentiation among positive and negative sera in the different dilutions, mainly in the lowest. A progressive decrease of the optical density (O.D) in the positive serum was appreciated with the increase of the dilutions of positive serum and the conjugate, exception the negative, demonstrating a specific reaction of the IgY for the protein VP3. It could be determined that so much the reagents, methodology and select protocols allow to differentiate among the positive sera reactive to VP3 and the negatives, being also demonstrated that this rehearsal possessed a tendency to give very little background. With these results it can be concluded that the use of the recombinant VP3 protein of Gumboro is feasible for its use in the development of a type ELISA immunoenzymatic assay.

**Key words:** Gumboro; antibodies; ELISA; recombinant protein; VP3

---

La enfermedad de Gumboro es una enfermedad infecciosa, altamente contagiosa causada por el Virus de la Bursitis Infecciosa Aviar. Afecta clínicamente a pollos jóvenes, sobre todo entre las 3 y 6 semanas de edad, ocasionando diarreas acuosas blanquecinas, anorexia, depresión, plumas erizadas, temblores y postración grave. La lesión más severa en pollos infectados es la atrofia de la bolsa de Fabricio como resultado de la depleción linfoide, debido a la necrosis y la apoptosis celular. Esta lesión causa inmunosupresión, irreversible en pollos infectados antes de las 3 semanas de edad. La morbilidad puede llegar al 100% con una mortalidad variable, en dependencia fundamentalmente de la virulencia de la cepa, el estado inmune y la edad de las aves. Las cepas muy virulentas se caracterizan por alcanzar mortalidades cercanas o superiores al 70%, sin embargo las cepas variantes no causan mortalidad, pero si una severa inmunosupresión (1, 2). Esta enfermedad causa severas pérdidas económicas en la industria avícola en todo el mundo, no solo por la mortalidad que puede llegar a ocasionar, sino también por los cuadros de inmunosupresión que predispone al ave a enfermedades virales, bacterianas y parasitarias y a una mala respuesta vacunal.

El diagnóstico confirmatorio puede ser realizado por serología y en estos momentos se utilizan más frecuentemente los ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA, pero otros métodos incluyen la inmunodifusión en gel de agar, la virus-neutralización, la inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa. Las ventajas de los ELISA para la detección de anticuerpos a Gumboro son su alta sensibilidad, especificidad, rapidez, y el poder testar un gran número de muestras, incluso de forma automática (2). Algunos de estos ELISAs han sido también utilizados para determinar el título de anticuerpos al día

de edad y predecir la edad óptima de vacunación (3). La mayoría de estos ELISAs utilizan virus completo como antígeno de recubrimiento, lo que da lugar que no puedan diferenciar anticuerpos del serotipo 1 y 2 y mucho menor diferenciar animales vacunados de infectados (4), donde precisamente la vacunación es la herramienta primaria usada en la industria avícola para el control de esta enfermedad. Según Fernández (5), las estrategias DIVA del inglés (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) constituyen una de las apuestas más inmediatas en la investigación de vacunas para el ganado en estos momentos.

Nuestro centro, integrado en las investigaciones de vacunas de nueva generación sobre la base la ingeniería genética tiene como proyecto la búsqueda de un candidato vacunal con el empleo de una proteína recombinante para el control de la enfermedad de Gumboro. Previamente se han hecho investigaciones relacionadas con la obtención de proteínas recombinantes con actividad biológica de esta entidad.

Por lo que teniendo en cuenta estas premisas nos dimos a la tarea de iniciar las investigaciones para desarrollar un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA acompañante de esta vacuna con el empleo de la proteína recombinante VP3 que nos permita la detección de anticuerpos a esta proteína con el propósito fundamental de poder diferenciar animales vacunados de infectados y darle el carácter de vacuna DIVA al candidato, como estrategia para el control epizootiológico y futura erradicación de esta enfermedad en el país. Ochoa (6), refiere que los inmunoensayos deben normalizarse y validarse en estadios tempranos del desarrollo de todo candidato vacunal para tenerlos a punto para las ulteriores investigaciones. Por lo que nuestro primer objetivo fue demostrar la factibilidad del empleo de la proteína recombinante VP3 del virus de la enfermedad de Gumboro para el desarrollo de un ELISA indirecto que permita detectar anticuerpos específicos a esta proteína.

Para la realización de este estudio se empleó la proteína recombinante VP3 de Gumboro expresada en *E. coli* como recubrimiento. Este lote fue obtenido en el 2005 en el laboratorio de Biología Molecular de nuestro centro con una pureza de un 90%, purificada por cromatografía de afinidad con iones metálicos, debido precisamente a la ventaja que tiene la misma de poseer una cola de histidina que facilita este proceder. La concentración fue de 0,5mg/ml y por Western-blot se demostró que conservaba su actividad biológica al ser reconocida por un antisuero anti-gumboro de referencia proveniente de la OIE. La misma estaba preservada a -20°C, por lo que 4 años de conservación nos permitirá adicionalmente determinar aproximadamente su aplicabilidad para inmunoensayos después de este período de tiempo.

Se empleó como soporte sólido placas Nunc tipo MaxiSorp de 96 pozos. El suero positivo fue obtenido en pollos SPF provenientes del CENPALAB de 10

semanas de edad inoculados con la cepa cubana de referencia BF8 a una dosis de  $10^3$  DIEP/200ul/ave vía oculo-nasal y una segunda dosis 2 semanas posteriores con desangrado final a la tercera semana, 21 días posteriores a la primera inoculación. Como suero negativo se utilizó el obtenido previo al programa de inmunización. Estos sueros, tanto el positivo como el negativo fueron testados para Gumboro, Reovirus y Anemia infecciosa aviar utilizando los ELISAs comerciales IDEXX para estas entidades y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A pesar que los animales son SPF se testaron para Reovirus y Anemia infecciosa aviar porque son las principales entidades virales que más probabilidad tienen de circular en poblaciones aviares, de acuerdo a Rodríguez (7). Estos sueros también fueron testados por seroneutralización, pero solo para Gumboro. El conjugado empleado fue una anti-IgY peroxidasa en conejo proveniente de SIGMA con un título de 1:25000. Este conjugado fue previamente prediluido con una solución preservante 1:250 con el objetivo de aumentar su rendimiento y disminuir la variabilidad inter-ensayo. El sustrato empleado para la peroxidasa fue el 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) y como solución paralizadora ácido sulfúrico 0,5M. La lectura se realizó en espectrofotómetro SUMA a 450 nm de longitud de onda. La solución de lavado empleada fue PBS-Tween 20 al 0,05% y como bloqueo PBS con suero de curiel al 5%. Se realizaron 3 lavados por paso, con 100ul por pozo para los reactantes y 240ul para el lavado, excepto durante el paso de bloqueo. Se utilizó el formato ELISA indirecto recubriendo la placa con la VP3 recombinante a razón de 5ug/ml (0,5ug/pozo) con absorción toda la noche (16 horas) a 4°C en atmósfera húmeda. Se bloqueo con 150ul/pozo por 1 hora a 37°C. El procedimiento utilizado fue el ensayo de titulación en tablero de ajedrez del suero y del conjugado. Se aplicaron las diluciones (1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500 y 1:600) del suero control positivo y negativo bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad. Las diluciones de conjugado empleadas fueron 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400 que teniendo en cuenta la pre-dilución 1:250 comentada previamente representa (1:12500, 1:25000, 1:50000 y 1:100000) lo que da la medida del trabajo con altas diluciones de conjugado. Igualmente se incubó 1 hora a 37°C. Este experimento se repitió en 3 ocasiones con el objetivo de verificar la repetibilidad del ensayo.

El suero negativo demostró ser no reactivo a Reovirus, Anemia y Gumboro por ELISA en los animales pre-inoculados, igual que para Gumboro por sero-neutralización. El suero positivo resultó igualmente negativo a Reovirus y Anemia y positivo a Gumboro por ELISA como se preveía, con un título de 1:6832. Fue igualmente positivo a Gumboro por seroneutralización, pero en este caso no se tituló. La obtención de estos sueros a partir de una colonia de animales SPF y el demostrarse por ELISA que eran negativos a dos de las principales entidades virales que tienden a contaminar las colonias de aves SPF como son el Reovirus y la Anemia infecciosa aviar, debido a su transmisión vertical, demuestra que tanto el suero positivo como el negativo pueden ser considerados para futuros análisis como sueros controles después de completados los ensayos de

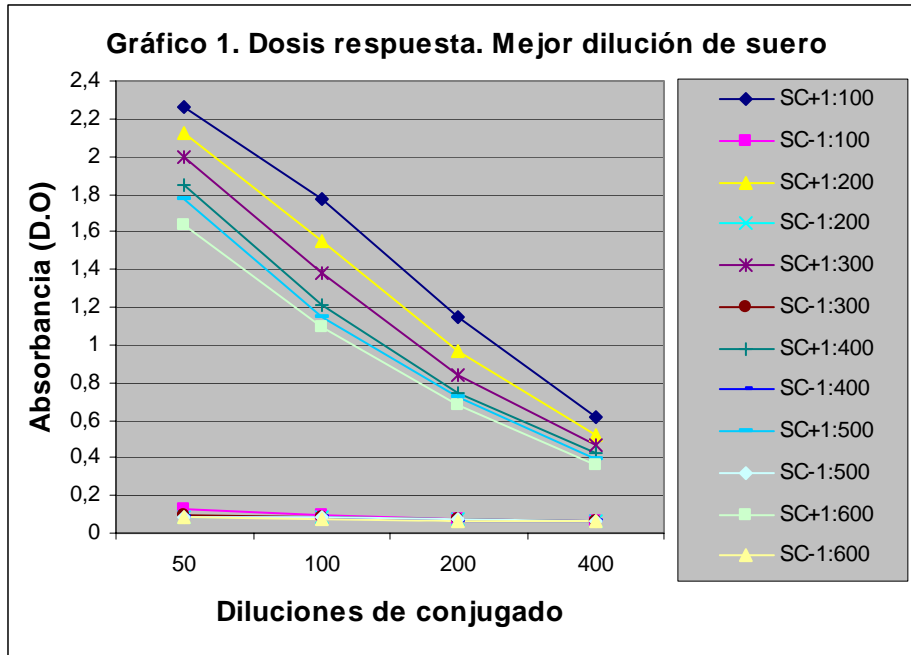
repetibilidad preliminar con diferentes sueros que contengan diferentes títulos de anticuerpos (8). Según la OIE (9), los controles negativos deben carecer de exposición o infección con el agente en cuestión, al contrario de los controles positivos que si deben haber sido expuestos o infectados con dicho agente que se quiere diagnosticar.

**Tabla 1:** Titulación en tablero de ajedrez para ELISA indirecto con diluciones de suero y conjugado.

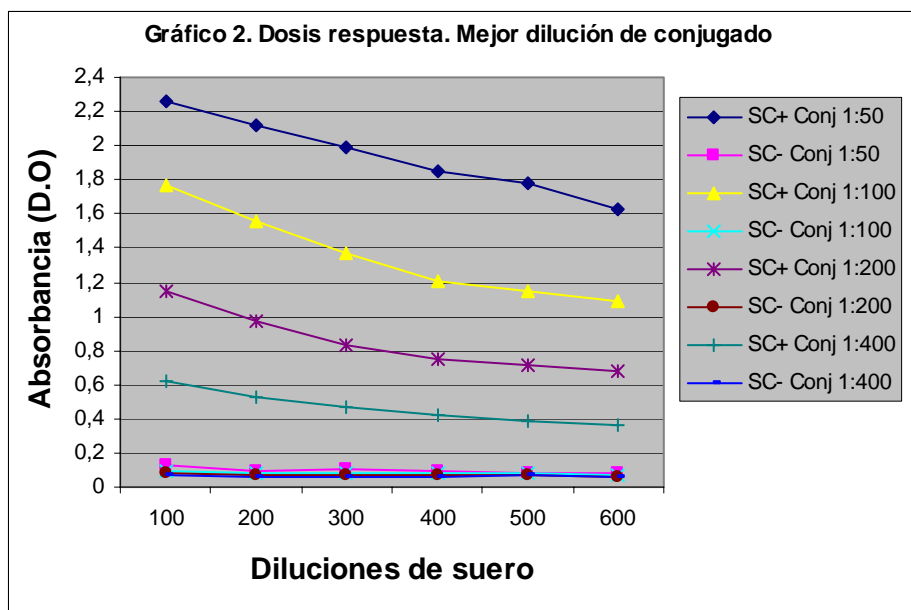
	Diluciones de suero														
	1:100		1:200		1:300		1:400		1:500		1:600				
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
<b>A</b>	2,295	0,131	2,151	0,087	2,029	0,096	1,9	0,085	1,793	0,08	1,603	0,079	<b>1:50</b>	<b>Diluciones de conjugado</b>	
<b>B</b>	2,233	0,133	2,093	0,089	1,956	0,104	1,805	0,092	1,755	0,086	1,663	0,085			
<b>C</b>	1,774	0,099	1,557	0,084	1,377	0,085	1,234	0,083	1,156	0,082	1,099	0,077	<b>1:100</b>		
<b>D</b>	1,763	0,097	1,554	0,083	1,374	0,085	1,182	0,083	1,148	0,088	1,09	0,072			
<b>E</b>	1,139	0,078	0,963	0,071	0,838	0,072	0,74	0,072	0,704	0,075	0,667	0,064	<b>1:200</b>		
<b>F</b>	1,152	0,076	0,969	0,068	0,833	0,07	0,748	0,065	0,734	0,074	0,694	0,063			
<b>G</b>	0,617	0,068	0,519	0,064	0,459	0,065	0,402	0,063	0,396	0,068	0,377	0,061	<b>1:400</b>		
<b>H</b>	0,613	0,066	0,525	0,063	0,477	0,063	0,437	0,062	0,382	0,066	0,354	0,06			

En la tabla 1 se demuestra como a medida que aumenta la dilución de suero positivo va disminuyendo la absorbancia y como a medida que aumenta la dilución de suero negativo no cambia la misma. Se aprecia que el suero positivo reconoce con una alta absorbancia la VP3 recombinante en casi todas sus diferentes diluciones, siendo siempre superior a la del negativo. Ello demuestra que está ocurriendo una reacción realmente específica del analito, es decir de los anticuerpos anti-VP3 presentes en el suero. Este es el primer resultado donde se demuestra que nuestra proteína recombinante VP3 es reconocida en un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA por suero obtenidos a partir de animales infectados con el virus de la enfermedad de Gumboro. Además pudimos comprobar que dicha proteína recombinante, después de 4 años de conservación, fue capaz de conservar su actividad biológica, al ser reconocida eficientemente por sueros anti-gumboro, por lo que podría ser utilizada en este tipo de ensayo hasta 4 años, como mínimo, después de su obtención.

En todas las diluciones de suero con conjugado diluido 1:50 y 1:100 el suero control positivo tuvo valores de absorbancia superiores a 1,0 y el suero negativo en todas las combinaciones de diluciones de suero y conjugado se mantuvo inferior a 0,14. Según Ochoa (6), se espera de un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA la mayor diferenciación entre el suero positivo y negativo con el objetivo de aumentar la detectabilidad del sistema diagnóstico.



En el gráfico número 1 se aprecia que las mejores diluciones de suero fueron 1:100 y 1:200 con diluciones de conjugado de 1:50 y 1:100 que representa tomando en consideración la pre-dilución del conjugado de 1:250, una dilución de trabajo de 1:12500 y 1:25000 respectivamente, lo que da la medida que se obtienen buenos resultados con altas diluciones del conjugado. De forma gráfica se puede apreciar muy bien como decrece la absorbancia con el aumento de las diluciones del positivo para cada una de las diluciones de conjugado, demostrando que existe una reacción específica. El suero control negativo se mantiene prácticamente inalterable, apreciándose además que da muy bajos valores de fondo, muy cercanos a 0,1.



En el gráfico 2 se observa que la mejor dilución de conjugado estaba entre 1:50 (1:12500) y 1:100 (1:25000) para todas las diluciones de suero control positivo (desde 1:100 hasta 1:600) con valores de absorbancia superiores a 1,0. Igualmente se aprecia que la absorbancia del suero negativo se mantuvo a un nivel basal para cada una de las diluciones de conjugado en las diferentes diluciones de suero que confirma todo lo planteado anteriormente sobre la especificidad del ensayo, por tanto su factibilidad.

Con estos resultados pudimos determinar que tanto los reactivos, metodología y protocolos seleccionados nos permiten distinguir muy bien entre los sueros positivos reactivos a VP3 y los negativos, demostrándose además que dicho ensayo poseía una tendencia a dar muy poco fondo, algo muy recomendado para los ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA de acuerdo a los criterios planteados por Jacobson (10). Este bajo fondo pudo estar justificado por la utilización de una proteína recombinante purificada, que aumenta a su vez la especificidad del ensayo como refiere la OIE (8) y Jacobson (10).

Con estos resultados podemos concluir que el uso de la proteína recombinante VP3 de Gumboro es factible para su empleo en el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA para la detección de anticuerpos específicos a la misma.

## Referencias

- Shamaila Ashraf. Studies on infectious bursal disease virus. Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor of Philosophy in the Graduate School of The Ohio State University. United State. 2005.
- Ching, W.; Rubinelli, P.; and Long, T. Molecular Detection and Differentiation of Infectious Bursal Disease Virus. Avian diseases. 2007;51:515–526.
- De Herdt, P.; Jagt, E.; Paul, G.; Van Colen, S.; Renard, R.; Destrooper, C. and Van den Bosch, G. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bursal disease virus (IBDV) and the estimation of the optimal age for IBDV vaccination in broilers. Avian Pathology. 2005;34(6):501-504.
- Saravanana, P.; Kumarb Satish, Katariac, J.M. (2004). Use of multiple antigenic peptides related to antigenic determinants of infectious bursal disease virus (IBDV) for detection of anti-IBDV-specific antibody in ELISA-quantitative comparison with native antigen for their use in serodiagnosis. Journal of Immunological Methods. 2004;293:61–70.
- Fernández, Mercé. Las vacunas «marcadas» o estrategias DIVA permiten diferenciar entre animales vacunados y animales infectados. Artículo on-line. 2003. Disponible en:

<http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2003/10/06/8646.php>

- Ochoa, R. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. Ediciones Finlay. Cuba. 2004.
- Rodriguez, I. R.; Rosenberger, J. K. and Cloud, Sandra. Characterization of the antigenic, immunogenic, and pathogenic variation of infectious bursal disease virus due to propagation in different host systems (bursa, embryo, and cell culture). I. Antigenicity and immunogenicity. Avian Pathology. 2002;31:463-471.
- OIE. Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004 - capítulo actualizado (mayo de 2006) Capítulo 1. 1. 3. 2006a.
- OIE. Standard Operating Procedure (SOP) for OIE Validation and Certification of Diagnostic Assays. SOP for OIE Validation and Certification of Diagnostic Assays Version 1.9 (09/2006). 2006b.
- Jacobson, R. H. Principles of validation of diagnostic assays for infectious Diseases. New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York, USA. This paper has been published in the "Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines", p. 8-15 by OIE, France 1996 and is included as an excerpt in this TECDOC with the permission of the OIE. 1996

## **REDVET: 2010, Vol. 11 N° 06**

Recibido 28.10.09 / Ref. prov. NOV0908\_REDNET / Aceptado 10.05.10  
Ref. def. 061002\_REDNET / Publicado 01.06.2010

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060610.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060610/061002.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.  
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org) y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>