



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

19  
2ij

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

" DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE  
ELISA PARA LA DETECCION DEL VIRUS  
DE RINOTRAQUEITIS  
INFECCIOSA BOVINA "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

MA. GUADALUPE GARCIA CHAVEZ

ASESOR : M. C. GUILLERMO VALDIVIA ANDA

COASESOR : M. C. VIRGINIA LARA SAGAHON



CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

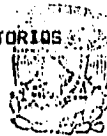


UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Desarrollo de una prueba de ELISA para la detección del virus de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina"

que presenta la pasante: Ma. Guadalupe García Chávez

con número de cuenta: 9057772-8 para obtener el TITULO de:  
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 7 de Junio de 1996

PRESIDENTE M. en C. Raúl Mor Cruz

VOCAL MVZ. José Antonio Liceo Vega

SECRETARIO M. en C. Guillermo Valdivia Ando

PRIMER SUPLENTE MVZ. Marco Antonio Mendoza Saavedra

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Raúl Rodilla Rodríguez

## AGRADECIMIENTOS

### A MIS PADRES:

Erasmus y Lucila por haberme dado la vida y la oportunidad de mostrarles los primeros frutos que he conseguido, gracias al ejemplo, la disciplina y el esfuerzo que hicieron por darme una educación; ya que sin esa confianza y amor me hubiese sido imposible lograrlo.

### A MIS HERMANOS:

Abel, Andrés, Tomás y Cruz por que con ustedes y compartí alegrías, ilusiones, tristezas y muchas ganas de seguir adelante. Gracias por su ejemplo, confianza y apoyo.

### A LAS FAMILIAS:

Montoya Olvera y Flores Montoya por permitirme ser parte de ellas, por los consejos recibidos y el -- apoyo que siempre me brindaron. -- Gracias.

### A MI ESPOSO:

Por haber llegado a mi vida y darle un giro total, por su comprensión y apoyo en todo momento, por estar a mi lado. Deseando que este sea el inicio de muchos logros juntos. TE AMO

AL M. C. GUILLERMO VALDIVIA ANDA:

Por el apoyo y la confianza brindada para poder realizar este -- trabajo, aún sin haber terminado la carrera. Gracias.

A LOS AMIGOS:

Que me brindaron su amistad sincera, que no puede cambiar de la noche a la mañana. A todos ellos gracias.

A LOS LABORATORIOS DIVET Y VALAR:

A su personal por la ayuda brindada durante la fase experimental de este trabajo.

Al Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal. Por la oportunidad de permitirnos - trabajar en sus instalaciones. En especial a la MVZ Margarita por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A TI SEÑOR POR PERMITIRME  
LLEGAR A ESTA NUEVA  
ETAPA DE MI VIDA  
GRACIAS.

## ÍNDICE

RESUMEN.	1
<b>CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.</b>	<b>2</b>
1.- Antecedentes de la enfermedad.	2
2.- Distribución geográfica.	3
3.- Etiología.	4
4.- Características del virus.	4
5.- Especies susceptibles.	5
6.- Transmisión.	5
7.- Patogenia.	6
8.- Signos clínicos.	7
9.- Lesiones macroscópicas y microscópicas.	10
10.- Diagnóstico.	10
11.- Diagnóstico diferencial.	15
12.- Inmunidad.	15
13.- Control y erradicación.	17
14.- Tratamiento.	18
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS.</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO III. HIPÓTESIS.</b>	<b>19</b>

<b>CAPÍTULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>20</b>
<b>I. MATERIAL.</b>	
1.- Material biológico.	20
2.- Material físico.	20
3.- Material químico.	21
<b>II. METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.</b>	
1.- Método para la obtención del antígeno.	24
2.- Método para la obtención de anticuerpos.	27
3.- Método para la precipitación de gammaglobulinas.	30
<b>III. METODOLOGÍA PARA EL DESARROLLO DE LA PRUEBA DE ELISA.</b>	
1.- Método general para el desarrollo de la prueba de ELISA.	31
2.- Optimización de la concentración del anticuerpo de captura.	34
3.- Optimización de la concentración del antígeno.	35
4.- Optimización de la concentración del anticuerpo de identificación.	36
5.- Optimización de la concentración del conjugado anti-conejo.	37
<b>IV. MÉTODO PARA EL DESARROLLO DE LA PRUEBA DE ELISA DE CAPTURA.</b>	
1.- Desarrollo de la prueba de ELISA en PBS, lavado nasal y semen de bovino, usando suero completo tanto para la	

de captura como para la de identificación.	37
2.- Desarrollo de la prueba de ELISA en PBS, lavado nasal y semen de bovino, utilizando gammaglobulinas tanto de captura como de identificación.	39
V.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	41
Cuadro No. 1. Calendario de inmunización No. 1 en caprino.	42
Cuadro No. 2. Calendario de inmunización No. 2 en caprino.	43
Cuadro No. 3. Calendario de inmunización No. 1 en conejos.	44
Cuadro No. 4. Calendario de inmunización No. 2 en conejos.	45

#### CAPÍTULO V. RESULTADOS.

I. RESULTADOS DEL MATERIAL BIOLÓGICO.	
1.- Obtención del virus.	46
2.- Obtención de anticuerpo.	46
Cuadro No. 5. Titulación de anticuerpos anti - IBR en caprino.	46
Cuadro No. 6. Titulación de anticuerpos anti - IBR en caprino.	47
Cuadro No. 7. Titulación de anticuerpos anti - IBR en conejos.	47
Cuadro No. 8. Titulación de anticuerpos anti - IBR en conejos.	48
3.- Resultados de la precipitación de gammaglobulinas.	48



4.- Resultados de la cuantificación de proteínas.	48
II. RESULTADOS DE LAS OPTIMIZACIONES PARA EL DESARROLLO DE LA PRUEBA DE ELISA.	49
III. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ELISA DE CAPTURA.	
1.- Resultados de la prueba de ELISA en PBS, lavado nasal y semen de bovino, usando suero completo tanto para la captura como para la identificación del virus.	49
2.- Resultados de la prueba de ELISA en PBS, lavado nasal y semen de bovino, usando gammaglobulinas tanto para la captura como para la identificación del virus.	49
Figura No. 1. Titulación de sueros de conejo por prueba de ELISA indirecta y sueroneutralización.	52
Figura No. 2. Optimización de la concentración del anticuerpo de captura de bovino.	53
Figura No. 3. Optimización de la concentración del anticuerpo de captura de caprino.	54
Figura No. 4. Optimización de la concentración del antígeno.	55
Figura No. 5. Optimización de la concentración del anticuerpo de identificación de conejo.	56
Figura No. 6. Optimización de la concentración del anticuerpo de identificación de bovino.	57
Figura No. 7. Optimización de la concentración del conjugado anti-conejo.	58
<b>CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.</b>	59

**CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES.**

66

**CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.**

67

## RESUMEN.

Se realizaron cultivos celulares de la línea comercial Swine Kidney Line (SKL), posteriormente se llevaron a cabo los cultivos del virus Herpes virus bovino tipo 1 (BHV-1).

Al mismo tiempo se realizaron inmunizaciones para la obtención de sueros hiperinmunes anti-IBR, primeramente a un caprino, posteriormente a dos grupos de conejos, utilizando diferentes calendarios de inmunización; para la obtención de sueros de bovino éstos se recolectaron de animales con altos títulos de anticuerpos diagnosticados por medio de la prueba comercial ELIVET. Los sueros fueron titulados por medio de las pruebas de sueroneutralización, ELISA indirecta en el caso de los conejos.

También se recolectaron lavados nasales y semen de bovino libres del virus.

Primeramente se llevó a cabo la estandarización de la prueba utilizando el método de ELISA indirecta de "sandwich", optimizando las concentraciones del anticuerpo de captura, del antígeno, del anticuerpo de identificación y del conjugado.

La estandarización de la prueba se desarrolló para la detección del virus en semen y lavado nasal, realizándose diluciones dobles y decimales.

En base a los resultados que se obtuvieron en este trabajo, se concluye que la prueba presenta una sensibilidad de  $10^6$  TCID<sub>50</sub> /ml.; no se encontró diferencia en cuanto a la captación del virus ya sea en lavado nasal o semen de bovino, existiendo un índice de correlación del 0.94.

El método de ELISA en la actualidad es muy útil en el diagnóstico de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, ya que tiene un alto grado de seguridad por su especificidad y sensibilidad, además de que es fácil de realizar y tenemos la posibilidad de emitir un diagnóstico rápido.

## CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN.

La Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, comúnmente conocida por sus siglas en inglés como IBR ( Infectious Bovine Rhinotracheitis), es una enfermedad infecciosa que tiende a asociarse comúnmente a problemas respiratorios y reproductivos de los bovinos.

### 1.- Antecedentes de la enfermedad.

Los primeros datos referentes a la IBR correspondieron a un caso ocurrido en ganado lechero de California EUA en 1954 (8). En su forma respiratoria se atribuyó que era causada por un virus; en su forma reproductiva conocida como vulvovaginitis pustular, el problema fue descrito desde hace más de un siglo y en 1920 se consideraba que el agente causal era un microorganismo del grupo de gérmenes causantes de la Psitacosis Linfogranuloma Venéreo (25).

Posteriormente, cuando se hicieron estudios de inmunidad cruzada, se demostró que el virus de IBR era similar al virus de la Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (IVP) (8), y de la balanopostitis en toros (9).

En México los primeros brotes de IBR aparecieron en los años sesentas, a partir de las importaciones masivas de ganado bovino lechero. Esta enfermedad la reportaron por primera vez en nuestro país Ruiz y Cuevas en 1971 como causante de aborto (31) y en 1974 Correa reporta que de 47 sueros de bovinos obtenidos en el Distrito Federal, Estado de México y Yucatán el 37.5% fueron positivos a IBR por la prueba de sueroneutralización, 23% sospechosos y 39.5% negativos (9).

## 2.- Distribución geográfica.

La distribución de esta enfermedad, es en la actualidad probablemente universal, se ha encontrado en los cinco continentes, con una incidencia variable. Se ha reportado en Estados Unidos, algunos países de Sudamérica como en Chile con una incidencia del 47.2% por prueba de sueroneutralización (16).

En Argentina se le reportó en semen congelado y fetos abortados (13).

Se le encontró con una incidencia variable en Nueva Zelanda con un 48.7% en ganado de carne y 6.2% en vacas lecheras (30).

En Australia, Gran Bretaña, Sudamérica, Zimbabwe, Japón y otros países de Europa también ha sido reportada (6).

En Francia se reportó un 7.2% de animales positivos a IBR en diferentes ranchos estudiados.

Un estudio realizado en la India reportó anticuerpos contra IBR en ganado indígena, búfalos y ganado cruzado, tanto en animales sanos, con enfermedad respiratoria o en abortos, con títulos de hemaglutinación indirecta de 1:8 a 1:1024 (33).

En un estudio realizado en México, de 19 estados de la república y reportado en 1983, se encontró que de 158 de 277 cabezas de ganado lechero (57%) y de 601 de 1154 de ganado de carne (52%) eran positivos a IBR (36). El Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias y la Dirección Nacional de Salud Animal realizaron un estudio serológico, fueron tomadas un total de 2209

muestras de todo el país, esto dio como resultado que IBR afecta en diferentes grados a la ganadería lechera siendo la comarca lagunera la zona de mayor porcentaje de reactores positivos con un 84% y Tulancingo Hidalgo la de menor con un 19%; en ganado productor de carne el estado de Puebla mostró mayor porcentaje de reactores positivos con un 70.1% y al estado de Durango correspondió en menor porcentaje con un 20.7% (39). Vilchis M. Reportó en 1985, que en ganado productor de leche de 354 muestras 11.8% tuvieron un título de 1:4, el 7.2% tuvieron un título de 1:8, el 8.3% tuvieron un título de 1:16; en ganado productor de carne de 1722 muestras el 51.9% fueron negativos, en 12.1% tuvieron un título de 1:2, 18.3% tuvieron un título de 1:4 y el 8.2% tuvieron un título de 1:16 (39).

### 3.- Etiología.

Esta enfermedad es producida por un virus de la familia Herpesviridae, que pertenece a la subfamilia Alphaherpesviridae, llamado Herpes virus bovino tipo 1 (BHV-1) (6, 18).

### 4.- Características del virus.

Los virus maduros observados al microscopio electrónico miden de 130 a 180 nanómetros (nm). Algunos presentan una membrana doble (8). Su composición química sugiere que se trata de un virus ácido desoxirribonucleico (DNA) lineal en doble cordón (18). Posee simetría icosaédrica; una envoltura lo reviste el núcleo y la segunda envoltura reviste el citoplasma. En el curso del ciclo de replica salen visiones con capacidad infectante de las células hospedadoras (18).

El virus de IBR se puede reproducir en cultivos celulares preparados a partir de una gran variedad de tejidos de bovinos, incluyendo riñones, piel embrionaria, glándulas adrenales, timo, glándula tiroides, páncreas, testículo, pulmón y nódulos linfáticos; también se multiplica en riñones y testículo de cordero, riñón de cabra, cerdo, caballo y conejo; en testículo y bazo de conejo; así como en células amnióticas de humano (8). Las líneas celulares comerciales que más se utilizan para su replicación son MDBK y SKL (26, 35).

#### 5.- Especies susceptibles.

Todos los bovinos de cualquier edad y raza son susceptibles, la enfermedad ocurre naturalmente en animales que en su mayoría han cumplido 6 meses de edad (18). Otros animales como borregos, caballos, cuyos, ratones, perros y gatos son refractarios. En caballos, cabras, borregos y principalmente conejos se puede estimular la respuesta de anticuerpos (9,22). Un estudio reportado en la India se encontraron anticuerpos contra IBR en ganado cruzado, ganado indígena y búfalos (33). Hallazgos de que los cerdos, cabras y posiblemente los venados puedan en raras ocasiones sufrir infecciones naturales por el virus, indican que los conceptos actuales de epizootiología de IBR en bovinos, probablemente tengan que ser modificados (8).

#### 6.- Transmisión.

El virus de IBR invade al organismo de los bovinos a través del tracto respiratorio o genital (8,3). La forma respiratoria se transmite mediante la exposición a aerosoles, exudado nasal y posiblemente descargas vaginales (6). La forma genital es de

origen venéreo. La infección también puede ser transmitida al ganado susceptible por utilización de guantes, espéculos o camas contaminadas (8).

El virus puede persistir en animales recuperados y ser eliminado intermitentemente hasta por 17 meses después de la infección, pudiendo permanecer latente indefinidamente después de la infección natural (6). Algunos animales portadores sanos, periódicamente sufren exacerbación de la enfermedad, con excreción del virus (8). La introducción de animales nuevos a un hato procede con frecuencia a un brote (6).

#### 7.- Patogenia.

Es sumamente importante la patogenia de ésta enfermedad, no obstante que aún hay muchos aspectos que no han sido estudiados a fondo (8). El virus ha sido aislado a partir de exudados respiratorios (8, 10), exudados oculares (8), exudados prepuciales (8, 37), exudados vaginales (38), semen (13, 20), fetos abortados (13), heces de bovino y la leche de una vaca con mastitis (8).

En la fase respiratoria, el virus se multiplica en cavidades nasales y vías respiratorias superiores, este ocasiona que se presente pérdida extensa de cilios en la tráquea. El virus causa grados variables de enfermedad pulmonar obstructiva, pudiendo llegar a una neumonía grave y mortal. La propagación a partir de las cavidades nasales hacia tejidos oculares probablemente ocurre a partir de los conductos lagrimales y causa conjuntivitis (3).



Puede ocurrir propagación a partir de la mucosa nasal a través del nervio trigémino periférico hacia el ganglio del trigémino, lo que causa una encefalitis no superlativa (3).

Al presentarse la viremia el virus es transportado por los leucocitos periféricos hacia la placenta y este debe de cruzar hacia el feto para que se presente el aborto, ya sea directamente a través de la circulación fetal o indirectamente a través de la placenta y del fluido amniótico. La reclinación del virus en el feto da por resultado que muera en 1 - 3 días y sea expulsado entre los 2 y 7 días siguientes (8, 3).

#### 8.- Signos clínicos.

La enfermedad se puede presentar afectando diferentes partes del organismo como: el aparato respiratorio, aparato reproductor, aparato digestivo, provocar conjuntivitis o encefalitis.

##### a) Forma respiratoria.

Desde el punto de vista económico este cuadro y el reproductivo posiblemente sean los más importantes (8).

Este cuadro generalmente ocurre en corrales de engorda, donde se reúnen animales de diferentes procedencias (8). Puede haber de 1 a 3% de mortalidad. Se presenta anorexia, fiebre hasta de 42° C, hiperemia intensa de la mucosa bucal y nasal, con cúmulos grisáceos de necrosis en la mucosa del tabique nasal, secreción serosa ocular y nasal, sialorrea, baja la producción láctea. El curso es de 1 a 10 días, pudiendo ser variables (8, 3, 10). Se puede presentar

aborto aproximadamente a la 4ta a 8va. Semana post-infección respiratoria (8).

b) Forma ocular.

Puede presentarse con reacción sistémica respiratoria o sin ella; observamos inflamación de la conjuntiva palmeral y membrana nictitante, edema bajo de la conjuntiva, exudado ocular, exudado nasal seroso tornándose mucopurulento, córnea opaca y queratitis secundaria a la conjuntivitis con o sin ulceración (8, 3).

c) Forma genital en hembras.

- Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (IVP). También se le conoce como Exantema Vesicular Coital. Se observa elevación de la cola, micción frecuente, edema, exudado sanguinolento y pústulas en la vulva, ligera elevación de temperatura y baja la producción láctea (8, 3).
- Endometritis y retención placentaria. Se ha observado que aunque muchos animales no abortan si presentan retención placentaria y problemas de endometritis subsecuente (15).
- Necrosis del cuerpo lúteo. Se realizó un trabajo con vaquillas, inoculándoseles virus por diferentes vías, estas vaquillas fueron sacrificadas y se aisló el virus de ovarios, los cuales presentaron lesiones que variaban de necrosis focal e infiltración con células mononucleares a necrosis y hemorragia difusa (38).

d) Forma genital en machos.

- Balanopostitis pustular infecciosa. Se caracteriza por presentar pústulas e inflamación en prepucio y pene, dándole una apariencia granular a los tejidos afectados, se ha observado aumento de volumen del escroto sin evidencia de orquitis (8, 41).
- Infección por semen. Se han encontrado reportes desde 1965, de que el virus se localiza tanto en semen fresco como en pajillas; hasta nuestros días se ha reportado endometritis, dificultad para la concepción y estro corto, lo que va a traer como consecuencia que nuestros parámetros reproductivos se vean disminuidos (3, 13, 20).

e) Aborto.

Es muy frecuente que se presente un síndrome respiratorio uno o dos meses antes del aborto; puede haber historia clínica de vacunación con vacunas vivas poco atenuadas, en vacas vacunadas entre 167 a 232 días después de la concepción (8). El aborto puede presentarse hasta los 90 días después de la vacunación (3). Se observó placentitis y el feto muestra autólisis, hepatitis focal necrosante y hemorragia necrosante en la corteza renal (8, 3).

f) Forma encefálica.

Australia la reporta como meningoencefalitis. Se presenta en animales menores de 6 meses de edad, en los que hay ataxia, depresión, convulsiones, rechinan los dientes y mueren presentando espasmos opistótonos (8, 15).

#### 9.- Lesiones macroscópicas y microscópicas.

En la afección de las vías respiratorias altas, las mucosas de las fosas nasales, laringe y tráquea presentan inflamación catarral y a veces difteroides; erosiones y ulceraciones se presentan con frecuencia en dichas mucosas (18). Puede haber enfisema pulmonar o bronconeumonía secundaria, pero en su mayor parte los pulmones se muestran normales (6). Microscópicamente se advierte inflamación catarral aguda de las mucosas, la invasión bacteriana secundaria más intensa a la que suele seguir bronconeumonía (3).

En terneros muertos en fase aguda de afección generalizada febril con signos respiratorios, las lesiones consisten en enfisema pulmonar, bronconeumonía ligera y enrojecimiento y tumefacción de las mucosas del aparato respiratorio. En forma crónica se observan pulmones con neumonía catarral purulenta ocasionada por bacterias (18).

En la meningoencefalitis de los terneros, se presentan lesiones virales típicas que asientan, sobre todo en corteza cerebral y cápsula interna (3).

En fetos abortados se presenta autólisis grave o moderada y hepatitis necrosante focal (8, 18, 3).

#### 10.- Diagnóstico.

Para el diagnóstico de IBR es muy importante evaluar la historia clínica, signos clínicos y observar las diferentes lesiones que se presentan en los animales vivos y a la necropsia (8).

En cuanto al diagnóstico de laboratorio contamos con diferentes técnicas, algunas con mayor eficacia que otras, entre estas tenemos:

a) Inmunofluorecencia.

Esta prueba es más utilizada a nivel investigación que a nivel diagnóstico de rutina. Se utiliza generalmente después del aislamiento viral. Emplea anticuerpos monoclonales e inmunofluorecencia, esto la hace ser demasiado cara (8).

b) Hemaglutinación pasiva.

Esta técnica se utiliza para demostrar elevación del título de anticuerpos (8). No es muy usada en México.

c) Inmunodifusión.

Esta es una técnica que se ha empleado casi únicamente de manera experimental (34).

d) Aislamiento viral.

Consiste en aislar el virus de BHV-1 en cultivos celulares, las muestras provienen de animales enfermos o muertos (8). En la Gran Bretaña el gobierno requiere el examen de semen de toros seropositivos a IBR (11). Se emplea cultivos primarios de células de riñón y testículo de feto de bovino, tanto en semen fresco como semen congelado y en fetos abortados (13). En México no existen laboratorios particulares que realicen la prueba, solo algunos del sector oficial.

e) Fijación del complemento.

Esta técnica es utilizada para demostrar elevación del título de anticuerpos (8). Un experimento realizado en Rusia, se encontró que de ésta prueba, preparada con antígeno intracelular, fue más específica y sensitiva que la de sueroneutralización y difusión en gel; sin embargo recientemente se ha demostrado que no todos los antígenos de este virus responden de manera uniforme a ésta prueba (24).

f) Prueba intradérmica.

Esta es una prueba experimental para detectar animales reactivos positivos a IBR. Esta enfermedad conduce a la formación de inmunidad celular inmediata que puede ser detectada. Se realiza utilizando un antígeno concentrado e inactivado mantenido en congelación (8, 27). En Costa Rica se realizó un estudio comparativo en 162 animales entre ésta técnica y la de sueroneutralización; su análisis determinó que la intradermorreacción del 94% y un valor de repetibilidad del 63%; la prevalencia de anticuerpos por sueroneutralización fue del 17.3% (7).

g) Sueroneutralización.

Esta es la técnica de laboratorio más usada para el diagnóstico y evaluación de IBR. Los sueros remitidos al laboratorio deben de ser enviados lo más rápido posible, en refrigeración, libres de contaminantes y de hemólisis (8).

Esta prueba no es muy exacta para diagnósticos individuales, pero si es recomendable para evaluar hatos (34). Tiene la desventaja de que necesita un equipo especial en el laboratorio y además no es muy rápida.

h) Inmunoensayo enzimático (ELISA).

Esta prueba conocida por sus siglas en inglés como ELISA (Enzime-Linked Immuno Sorbent Assay). Presenta las características de su alta sensibilidad, alta especificidad, rapidez y economía (32).

Esta prueba tal como se conoce hoy, comenzó a desarrollarse a partir de los trabajos de Avrameas y Uriel (1966), que marcaron antígenos y anticuerpos con enzimas para su uso en técnicas serológicas convencionales. Nakane y Pierce (1966) y Wicker y Avrameas (1969) marcaron anticuerpos con enzimas con el fin de localizar antígenos virales en tejidos animales. Enguall y Perlman (1971) describieron un método ELISA, para titular inmunoglobulinas utilizando tubos de poliestireno. Ruitenber, Steerenber y Brosi aplicaron por primera vez en método ELISA en patología animal (32).

Actualmente este método se utiliza en numerosos laboratorios como método de diagnóstico rutinario así como en programas de investigación (32).

Este método utiliza anticuerpos conjugados a una enzima. En estos conjugados el anticuerpo conserva su capacidad de unión específica al antígeno, mientras que la enzima es capaz de catalizar una reacción de óxido reducción, en la cual el sustrato o un cromógeno se transforma en un producto colorido. En este

sistema el antígeno o el anticuerpo se adsorbe a una fase sólida (microperlas, tubos o perlas de polivinilo o en poliestireno, o bien papel de celulosa) (12, 19, 32).

Los tipos de ELISA se pueden clasificar en ELISA indirecto, ELISA directo, ELISA doble "sandwich" de anticuerpos, ELISA competición (32).

En cuanto al diagnóstico de IBR, casi todos los reportes coinciden en que la prueba de ELISA es más sensible que la de sueroneutralización y es frecuente que se detecten casos positivos con ELISA que fueron negativos a sueroneutralización (4).

La prueba ha sufrido diversas modificaciones con el objeto de incrementar su exactitud, por ejemplo se ha desarrollado para detección de BHV-1 como antígeno del escorbuto nasal, recolectado de animales infectados, utilizando anticuerpos monoclonales para su captura y comparado su eficiencia con el aislamiento viral, en donde ELISA fue muy superior, por esto se considera como una buena prueba para detectar al virus (4).

En otro trabajo se llevó a cabo un estudio de comparación de 6 reactivos de ELISA, sueroneutralización y hemaglutinación pasiva sobre 151 sueros positivos o negativos; el ensayo se refería a la concordancia y reproductibilidad de las medidas y de su interpretación. Las ocho reacciones estaban de acuerdo en 74.1% de las muestras analizadas. La sueroneutralización tiene una desventaja de irregularidad de su reproductibilidad. La sensibilidad fue igual (5).



Existe la prueba comercial ELIVET (Laboratorios Pronabive), la cual detecta anticuerpos (2). Pero no existe una prueba comercial para el diagnóstico rutinario del virus de IBR en donde éste se pueda detectar, ya sea en semen, exudado nasal o en otro tipo de muestras; esto crea la necesidad de desarrollar una prueba diagnóstica rápida, segura, económica y además ayudarnos en el control de la enfermedad, auxiliandonos con otra prueba serológica para corroborar que el diagnóstico emitido es seguro.

#### 11.- Diagnóstico diferencial.

Esta enfermedad debe ser diferenciada con Pasteurelisis neumónica, Diarrea Viral Bovina, Fiebre Catarral Maligna, Difteria de los terneros, Neumonía viral de los terneros, Fiebre de embarque, Rinitis alérgica, Leptospirosis, Brucelosis e infección por *Haemophilus somnus*. (8, 18, 3).

#### 12.- Inmunidad.

Después de la infección, la respuesta inmune está dada por los mecanismos inespecíficos humorales y celulares y otros específicos también humorales y mediados por células (28).

##### a) Mecanismos humorales no específicos.

Entre estos tenemos al complemento activado por la vía alterna, pero el más conocido de ellos es el interferón tipo I o interferón fibroblástico, este es producido por la mayor parte de los leucocitos y de células en ciertas condiciones de inducción (8, 28).

b) Mecanismos celulares no específicos.

Los macrófagos son células que tienen importancia en la regulación de la diseminación viral, ya que impiden su replicación, limitando así su diseminación. Los macrófagos de los bovinos tienen receptores Fc y pueden intervenir en los mecanismos de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC). Los macrófagos de origen fetal son más sensibles al virus de IBR que los macrófagos procedentes de bovinos adultos, lo que podría explicar en parte la variación de sensibilidad a este virus dependiendo de la edad de los animales (28).

c) Mecanismos humorales específicos.

La inmunidad humoral se basa en los anticuerpos de clase IgM e IgG. Los anticuerpos pueden intervenir en al menos 3 mecanismos, el primero en la destrucción por la acción del anticuerpo y el complemento de las células afectadas; el segundo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y por último la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y ayudado por el complemento (28).

d) Mecanismos celulares específicos.

La inmunidad celular parece tener un papel muy importante en el control de la reactivación viral; aparece antes que los anticuerpos puedan ser detectables. Los linfocitos T son el eje de la inmunidad y ejercen su acción antiviral de varias maneras: ya sea mediante la liberación de sustancias solubles o linfoquinas o a través de la citotoxicidad directa de las células infectadas (28).

### 13.- Control y erradicación.

Los métodos y vacunas disponibles para el control eficaz de IBR no han resultado del todo satisfactorios. La enfermedad puede aparecer en forma impredecible en cualquier momento. Por tanto no se cuenta con una técnica de control completamente confiable, y el control de padecimiento depende de la adquisición de inmunidad después de la exposición natural o de las vacunas (3).

Existen actualmente una serie de vacunas en el mercado como vacunas de virus vivo modificado de aplicación intramuscular, vacuna intranasal, vacunas inactivadas, vacunas combinadas tales como IBR, DVB, PI-3 (8). El uso de cualquier vacuna dependerá de las características del hato (3).

La necesidad de vacunar depende de la incidencia de la enfermedad en el área y en el hato, así como del desplazamiento de animales hacia el interior o el exterior (3).

Los toros que se usan en los centros de inseminación artificial, presentan un problema especial para el control, ya que el virus se encuentra en el semen. Los toros que dan resultados positivos en el suero, pueden ser considerados portadores y liberadores del virus, se debe de evitar su entrada a estos centros. No todos los toros que dan resultados negativos pueden considerarse libres del virus, y deben de realizárseles pruebas regulares de aislamiento viral tomando como muestras lavados prepuciales y semen (3).

Los toros que van a ingresar a centros de inseminación artificial no deben ser vacunados, así como los que se van a exportar a países libres de ésta enfermedad (3).

En algunos países como Suiza se realizan programas de erradicación (1).

En México sería un poco difícil pensar en la erradicación si no es que imposible, aunque existe la posibilidad teniendo un panorama real de la situación de IBR, esto se podría lograr por medio de la prueba de intradermoreacción (8), combinando con otra prueba como la ELISA directa.

#### 14.- Tratamiento.

Se basa principalmente en controlar infecciones secundarias. Se usan antibióticos, sulfas y además hay que compensar la deshidratación y la inanición (8).

## **CAPÍTULO II.- OBJETIVOS**

- 1.- Estandarizar una prueba de ELISA directa para la detección del virus de la Rinotraqueítis Infecciosa bovina.
- 2.- Evaluar la utilidad de la prueba para detectar el virus en lavado nasal y semen de bovino.

## **CAPÍTULO III.- HIPÓTESIS**

Es posible desarrollar una prueba de ELISA para la detección del virus de IBR presente en una solución buffer de fosfato, lavado nasal y semen de bovino.

## **CAPÍTULO IV. - MATERIAL Y MÉTODOS**

### **I. - MATERIAL.**

#### **1.- Material biológico.**

- a) Línea celular SKL (células de riñón de cerdo)
- b) Herpes virus bovino tipo 1 (BHV-1)
- c) Conejos adultos
- d) Caprino de 5 meses de edad
- e) Sueros hiperinmunes anti-IBR de bovino

#### **2.- Material físico**

- a) Botellas de vidrio estériles con tapón de rosca  
con un volumen de 25 cm<sup>3</sup> de capacidad
- b) Pipetas de 1, 2,5 y 10 ml.
- c) Vaso de precipitado
- d) Campana de flujo laminar
- e) Microscopio
- f) Tubos de ensaye estériles de 5 y 10 ml
- g) Jeringas desechables insulínicas
- h) Jeringas desechables de 5 y 10 ml
- i) Equipo y material para el desarrollo de la prueba de  
ELISA.
  - Microplacas de titulación de poliestireno
  - Micropipetas de 10, 200 µl
  - Puntillas para micropipetas
  - Tubos de ensaye
  - Papel absorbente
  - Estufa para incubación

• Lector de ELISA (Metrolab)

3.- Material químico.

a) Solución reguladora de carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 9.6.

Carbonato de sodio (J. T. Baker)	1.5	g
Bicarbonato de sodio (J. T. Baker)	2.93	g
Agua destilada	1000.00	ml

b) Solución de grenetina.

Grenetina (Sigma Chemical Company)	0.25	g
Agua destilada	100	ml

c) Solución de lavado PBS-TWEEN-20 al 0.1%.

Solución PBS 10X	100	ml
Tween-20 (Sigma Chemical Company)	1	ml
Agua destilada	800	ml
Agua destilada cbp	1000	ml
Ajustar a pH de 7.0		

d) Solución PBS 10X.

Cloruro de sodio (J. T. Baker)	8.00	g
Cloruro de potasio (J. T. Baker)	0.20	g
Fosfato ácido de sodio (J. T. Baker)	1.44	g
Fosfato ácido de potasio (J. T. Baker)	0.24	g
Agua destilada cbp	100	ml
Ajustar a pH de 7.0		

e) Solución verseno al 0.05%.

Versenato de sodio (EDTA)	0.5	g
Solución de PBS 10X	50	ml
Agua destilada	950	ml
Ajustar a pH de 7.6		

f) Solución tripsina al 5%.

Solución de PBS 10X	100	ml
Agua destilada	900	ml
Tripsina 1:250	50	g
Ajustar a pH de 7.0		
Rojo de fenol al 1%	0.5	ml

g) Medio esencial mínimo 10X (MEM).

MEM M-199 base (Gibco)	9.53	g
Agua bidestilada	100	ml

h) Medio de crecimiento.

Agua desionizada estéril	90.0	ml
Bicarbonato de sodio (J. T. Baker)	2.0	ml
Penicilina-estreptomicina	1.0	ml
Suero fetal bovino (Industrializadora Agropecuaria Nacional S. A. de C. V.)	5.0	ml
Medio MEM-199 10X	10.0	ml



i) Solución de penicilina-estreptomina.

Penicilina g (sal sódica)	1 000 000	UI
Sulfato de estreptomina	1.0	g
Agua destilada	10	ml

j) Solución ácido cítrico 0.1 M.

Ácido cítrico (J. T. Baker)	0.210	g
Agua destilada	100	ml

k) Solución fosfato dibásico de sodio 0.2 M.

Fosfato dibásico de sodio (J. T. Baker)	5.36	g
Agua destilada	100	ml

l) Solución reguladora de citratos pH 5.

Ácido cítrico 0.1 M	24.3	ml
Fosfato dibásico de sodio 0.2 M	25.7	ml
Agua destilada	50	ml

m) Solución de paro.

Ácido sulfúrico 2 N (J. T. Baker)	0.52	ml
Agua destilada	10	ml

## II.- METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

### 1.- Método para la obtención del antígeno.

Para la obtención del virus, se realizaron previamente cultivos celulares y posteriormente cultivos virales.

#### a) Cultivos celulares:

Los cultivos celulares como su nombre lo dice son líneas de células que en ciertas condiciones de laboratorio nos ayudan a la replicación del virus.

En el presente trabajo, la línea celular utilizada fue células de riñón de cerdo ( SKL ), las cuales fueron donadas por el laboratorio de Enfermedades Exóticas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Palo Alto D. F. Las células se llevaron al Laboratorio de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, Cuautitlán Izcalli Edo. de México y al Departamento de Virología del Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal Tecamac Edo. de México.

Las células en el laboratorio se conservaron mediante subcultivos seriados, esto es lo que llamamos pases celulares. Para realizar los pases celulares empezamos a trabajar con 1 botella de una superficie de 25 cm<sup>2</sup> de cultivo celular y una confluencia del 100%. En la campana de flujo laminar, de esta botella se tiró el medio que contenía por el lado opuesto a la monocapa celular en un vaso de precipitado destinado para desechos. A estas botellas de células, se adicionaban dependiendo del tamaño de la botella de 1 a 1.5 ml. de solución Tripsina-verseno, dejándola actuar sobre la capa celular durante 20 a 60 segundos; eliminar

la solución Tripsina-verseno por la cara opuesta a la monocapa celular, dejando actuar tiempo necesario para que las células se disgreguen ( la capa celular se torna opaca aproximadamente en 5 a 10 min. a 37° C). Las células se observan al microscopio para verificar el desprendimiento celular. Se golpea a un costado de la botella, de manera que la capa celular se desprenda de su soporte; ya que las células se desprendieron en su totalidad se adicionaron 3 ml. de medio de crecimiento, se homogeneizó el medio por pipeteo suave. Por otro lado se prepararon botellas para cultivo con tapón de rosca, el número de estas botellas dependía de la relación de pase, que puede ser de 1:1, 1:2 ó 1:3, la suspensión celular se distribuye equitativamente en cada una de las botellas, posteriormente se le adicionó 6 ml. de medio de crecimiento, las botellas se tapan y se homogeneizan en su totalidad, por último se etiquetaron con el número de pase y fecha correspondiente y se incubaron en atmósfera de CO<sub>2</sub> a 37° C.

b) Cultivos virales:

Previamente realizados los cultivos celulares, se procedió a realizar los cultivos virales. Con 6 botellas de células obtenidas, con un volumen de 25 cm<sup>3</sup> y una confluencia celular del 100% , se infectaron con 0.5 ml. de Herpes virus bovino tipo 1 (BHV-1, causante de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina) en cada botella; se incubaron en atmósfera de CO<sub>2</sub> a 37° C durante 24 h. Pasado el tiempo ya mencionado se observaron al microscopio, en todas las botellas se presentó el efecto citopático, esto es, que las células cambiaban en su morfología, se tornaban redondeadas, algunas células se observaban multinucleadas y además presentaban cierta granulación por el estallamiento de algunos organelos celulares y posteriormente se presentaba la lisis celular. Estas

botellas se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 24 h.; posteriormente se congelaron y descongelaron tres veces en hielo seco y acetona, con la finalidad de hacer que se rompiera la célula y el virus se liberara. El cultivo viral se paso a tubos de centrifuga y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 min. en frío, con este procedimiento los desechos celulares sedimentaron y las partículas virales quedaron suspendidas en el medio. La suspensión viral se almacenó en botellas de vidrio de 8 ml., se etiquetaron y congelaron a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador tipo Revco. Este se realizó en el Laboratorio de virología de la unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 1.

Posteriormente en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, Tecamac Edo. de México en el laboratorio de Virología se infectaron 5 botellas más de 250 ml. de capacidad y una confluencia celular del 100%, se infectaron con 1 ml. de BHV-1 con un título de  $10^6$  TCID<sub>50</sub> /ml (Dosis Infectante en Cultivo de Tejidos al 50%), estas botellas se dejaron incubar 24 h. a  $37^{\circ}\text{C}$ ; pasadas las 24 h. se realizó la revisión al microscopio y se observó el efecto citopático característico en todas las botellas; todas las botellas fueron congeladas a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  por 24 h en congelador Revco, posteriormente las botellas se descongelaron y congelaron 3 veces, el contenido se pasó a tubos de centrifuga y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 minutos en centrifuga fría; el suspendido viral se envasó en viales de plástico de una capacidad de 30 ml. cada uno, se etiquetaron y almacenaron a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  en congelador Revco hasta su utilización.

## 2.- Método para la obtención de anticuerpos.

### a) Anticuerpos anti-IBR en caprino.

Para la obtención de anticuerpos anti-IBR en caprino, se eligió un cabrito de raza Alpina, macho, de 5 meses de edad. Utilizando un calendario de inmunización convencional, como se muestra en el cuadro No.1 (27).

El virus utilizado fue el obtenido en el Laboratorio de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1. El primer sangrado se realizó el día 0 del calendario de inmunización, se obtuvieron 10 ml. de sangre, la cual se centrifugó para la obtención del suero, el suero se envasó y etiquetó en un tubo de ensaye. El segundo sangrado se realizó el día 18 del calendario de inmunización obteniéndose 10 ml. de sangre, ésta se procesó de la misma manera que para el primer sangrado. El tercer sangrado se realizó el día 27 del calendario de inmunización realizándose de la misma forma que para los sangrados anteriores. Los sueros fueron remitidos al Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, para ser titulados por medio de la prueba de sueroneutralización.

En el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal nos fueron donados 25 ml de Herpes virus bovino tipo 1 con un título de  $10^6$  TCID<sub>50</sub> /ml, con este virus se realizaron nuevas inoculaciones al caprino, como se muestra en el cuadro No. 2.

En la reinoculación al caprino se realizaron 2 sangrados al término del calendario de inmunización, con un intervalo de 3 días

cada uno; de cada sangrado se obtuvieron 150 ml. de sangre, la cual se centrifugó para la obtención del suero, éste se envasó en tubos de ensaye de 10 ml.; de este suero se separaron 3 ml. para su titulación de anticuerpos por medio de la prueba de sueroneutralización en el Centro Nacional de Servicios Diagnóstico en Salud Animal.

b) Anticuerpos anti-IBR en conejo.

Para la obtención de los anticuerpos anti-IBR en conejo, se utilizaron 3 conejos de la raza Nueva Zelanda, procedentes del criadero de conejos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4. Se utilizó el calendario de inmunización convencional, como se muestra en el cuadro No. 3 (27).

Los conejos fueron sangrados el día 0 antes de la primera -inoculación, con el fin de tener el control negativo del suero. Se realizaron dos sangrados, el primero el día 13 y el segundo el día 30 del calendario de inmunización. En el primer sangrado se obtuvieron 5 ml. de sangre completa, la cual se centrifugó, el suero fue envasados y etiquetado en tubos de ensaye, estos se mandaron al centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal para su titulación de anticuerpos por medio de la prueba de sueroneutralización. Para el segundo sangrado los conejos fueron sangrados a blanco, centrifugando la sangre para la obtención del suero, la sangre se envasó y etiquetó en tubos de ensaye, de éste suero se tomaron 3 ml. para su titulación de anticuerpos por la prueba de sueroneutralización.

Con la finalidad de obtener suero hiperinmune anti-IBR en conejo con altos títulos de anticuerpos, se tomó la decisión de hacer una nueva inoculación a otros conejos. Para este fin se

eligieron 2 conejos adultos de la raza Chinchilla, procedentes del criadero de la Facultad de Estudios superiores Cuautitlán campo 4. En el cuadro No. 4 se muestra el calendario de inmunización que se siguió en este caso.

El primer sangrado se realizó el día 0, antes de la primera inoculación. El segundo sangrado se llevó acabo al término del calendario de inmunización convencional (día 22), obteniéndose 5 ml de sangre por cada conejo vía intracardiaca, la sangre se centrifugó, el suero se etiquetó y envasó en tubos de ensaye, y se almacenó a 4° C. El tercer sangrado se realizó el día 40 de inoculación como ya se mencionó anteriormente. El cuarto sangrado fue a blanco en los dos conejos el día 47, centrifugando, el suero se etiquetó y envasó en tubos de ensaye de 10 ml. y se almacenó a una temperatura de 4° C. De los sueros obtenidos se tomaron 1 ml de cada uno y se mandaron al Departamento de Complejos Neumónicos en Rumiantes del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, para la titulación de anticuerpos por medio de la prueba de sueroneutralización.

• Titulación de los sueros anti-IBR en conejo por medio de ELISA indirecta.

La placa se sensibilizó (ver punto de desarrollo general de la prueba de ELISA) con virus (BHV-1) diluido 10<sup>4</sup> y células SKL diluidas 10<sup>4</sup> en solución carbonato-bicarbonato pH 9.6, aplicándose 100 µl en cada pozo el 2 hileras, la placa se dejó incubar toda la noche en refrigeración. El lavado y el bloqueo se realizó de la misma forma antes mencionada. Los anticuerpos para la identificación del antígeno fueron los sueros de los conejos hiperinmunizados, de los cuales se contó con suero de conejo

negativo, suero de conejo al término del primer calendario de inmunización y suero de conejo al término del segundo calendario de inmunización; cada uno de los sueros se aplicaron diluidos 1:2 en solución PBS, realizándose 2 repeticiones; la placa se dejó incubar 1 h. a 37° C. Lavado. Para la aplicación del conjugado anti-conejo se utilizó la dilución 1:1500 en PBS, aplicándose 100 µl en cada pozo; la placa se incubó 1 h. a 37° C. El desarrollador de color, la solución de paro y la lectura de la placa se realizaron de la misma forma mencionada. Los testigos de la placa son los ya mencionados.

c) Anticuerpos anti-IBR en bovino.

Al laboratorio DIVET (Diagnóstico Integral Veterinario) de Cuautitlán de Romero Rubio, fueron remitidas muestras de suero de bovinos para el diagnóstico de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, Diarrea Viral Bovina y Brucelosis. En este laboratorio la prueba que se corre para el diagnóstico de IBR es la comercial ELIVET (Laboratorios PRONABIVE); estos sueros presentaron títulos elevados de anticuerpos a IBR (++++). De estos bovinos se seleccionaron 5, los cuales se sangraron 200 ml. de sangre a cada uno, ésta se centrifugó para la obtención del suero, se envasó, etiquetó y almacenó en tubos de ensaye a una temperatura de 4° C hasta su utilización.

3.- Método para la precipitación de gammaglobulinas.

Se precipitaron gammaglobulinas de conejo y de bovino.

Primeramente se tomaron 10 ml de suero de conejo y 5 ml de suero de bovino, se pasan a un vaso de precipitado por separado.



En un tubo de ensaye se separan 5 ml de sulfato de amonio saturado. El vaso de precipitado se coloca sobre una charola con hielo y a su vez se coloca sobre el agitador adicionándole un agitador magnético, se empieza a aplicar el sulfato de amonio gota por gota, terminando se deja agitar 15 min más, pasado este tiempo se centrifuga el contenido del vaso de precipitado por 15 min., se decanta y el sedimento se reintegra al volumen inicial. Se realiza el mismo procedimiento 2 veces más, el sobrenadante de cada centrifugación se envasó por separado. El sedimento de la última centrifugación se reconstituye a la mitad del volumen inicial ( 5 ml para el conejo y 2.5 ml para el bovino). Estos precipitados se colocan en membranas y se dializan en PBS 1:10 durante 3 días con el agitador magnético y en refrigeración cambiando regularmente la solución. Por último se sacan los precipitados de las membranas a tubos de ensaye, se etiquetan y guardan a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

La cuantificación de proteínas se llevó acabo por medio de la técnica de Bradford.

### III.- METODOLOGÍA PARA EL DESARROLLO DE LA PRUEBA DE ELISA.

#### 1.- Método general para el desarrollo de las pruebas de ELISA.

a) Sensibilización. Para el desarrollo de la prueba de ELISA se utilizaron microplacas de titulación de poliestireno (96 pozos).

La sensibilización se inició distribuyendo 100  $\mu\text{l}$  de la solución reguladora de carbonato-bicarbonato 0.1 M con pH de 9.6, en

cada pozo de la microplaca; posteriormente se aplicaron 100 µl del suero hiperimmune anti-IBR con anticuerpos de captura en los pozos A-2 al pozo H-2, haciéndose diluciones dobles de cada pozo en dirección horizontal. La placa se dejó incubar 24 h. en refrigeración.

b) Lavado. Se eliminó la solución sensibilizante y la placa se lavó con solución de lavado PBS-TWEEN 20 - 0.1%, aplicándose 200 µl en cada pozo, repitiéndose el lavado por 4 veces con ésta solución y 2 veces con agua destilada; la placa se secó con papel.

c) Bloqueo. El bloqueo se llevó a cabo saturando los sitios de la microplaca con 100 µl de solución de gelatina al 0.25%, en cada pozo, al mismo tiempo se aplicó 100 µl de solución carbonato-bicarbonato en cada pozo, se homogeneizó con pipeteo suave, la placa se dejó incubar 3 h. a 37° C.

d) Lavado. Se eliminó la solución bloqueadora y la placa se lavó con solución de lavado PBS-TWEEN 20 - 0.1% 4 veces y 2 con agua destilada, se secó con papel.

e) Aplicación del antígeno Herpes virus bovino tipo 1 (BHV-1). Primeramente se hicieron por separado diluciones del virus en solución PBS. Del virus ya diluido se realizaron aplicaciones a cada pozo de la microplaca. La placa se dejó incubar 1 h. a 37° C.

f) Lavado. Se realizó con solución de lavado PBS-TWEEN 20 - 0.1%. repitiéndose 4 veces y 2 con agua destilada, la placa se secó con papel.

g) Anticuerpos de identificación. En este caso se utilizó suero hiperimmune anti-IBR que contenían los anticuerpos de identificación; este se diluyó en solución PBS pH de 7.0, aplicándose 100 µl a toda la microplaca. La microplaca se dejó incubar 1 h. a 37° C.

h) Lavado. Se realizó con solución de lavado PBS-TWEEN 20 - al 0.1%, repitiéndose 4 veces y 2 con agua destilada, la placa se secó con papel absorbente.

i) Conjugado anti-IgG-enzima. El conjugado utilizado fue un conjugado anti-bovino (SIGMA) y un conjugado anti-conejo (The Binding Site), estos se diluyeron en solución PBS pH 7.0 y se aplicaron 100 µl a cada pozo de la microplaca. Se dejó incubar 1 h. a 37° C.

j) Lavado. Se realizó con solución de lavado PBS-TWEEN 20 - 0.1%, repitiéndose 4 veces y 2 con agua destilada, se secó con papel.

k) Sustrato para la actividad de la peroxidasa. El sustrato de elección fue la O-fenilendiamina (OPD, Laboratorios SIGMA). Se aplicaron 5 mg de OPD en 10 ml. de solución Citratos-fosfatos pH 5.0 y por último aplicar 9 µl de peróxido de hidrógeno al 30%, de ésta solución se aplicaron 100 µl a toda la microplaca. Se dejó incubar 10 min. a temperatura ambiente, de acuerdo a lo descrito en el Manual de Inmunología del Instituto Politécnico Nacional (20 ).

l) Solución de paro. Pasados 10 min. la reacción se detuvo con una solución de Ácido Sulfúrico aplicándose 50 µl a cada pozo de la microplaca.

m) La microplaca se leyó en lector de ELISA ( Metrolab 970), con filtro de 492 nm.

2.- Optimización de la concentración del anticuerpo de captura.

a) Anticuerpos de captura anti-IBR en bovino.

Para la sensibilización de la placa, primeramente se aplicaron 100 µl de solución carbonato-bicarbonato pH 9.6 a toda la placa, posteriormente de la columna A-2 a H-2 se aplicaron a cada pozo 100 µl de suero hiperinmune de bovino realizándose diluciones dobles hacia la derecha; la placa se dejó incubar toda la noche en refrigeración. El lavado y bloqueo se realizaron de la forma ya mencionada. Para la aplicación del antígeno el virus se diluyó previamente en diluciones decimales en solución PBS, aplicándose 100 µl de cada dilución en dirección vertical de la placa; la placa se dejó incubar 1 h. 37° C. Posteriormente la placa se lavó. El anticuerpo de identificación utilizado para ésta prueba fue suero hiperinmune anti-IBR en bovino diluido 1:2 en solución PBS, aplicándose 100 µl en cada pozo de la microplaca; la placa se dejó incubar 1 h. a 37° C. La dilución del conjugado anti IgG de bovino (2), se utilizó a una concentración de 1:32 000 en solución PBS como se demostró en un trabajo paralelo; la placa se dejó incubar 1 h. 37° C. Posteriormente la placa se lavó con solución de lavado. La aplicación del desarrollador de color, la solución de paro y la lectura se realizaron de la forma ya mencionada anteriormente.

b) Anticuerpos de captura anti-IBR en caprino.

La microplaca se sensibilizó con 100 µl de solución carbonato-bicarbonato pH 9.6; del suero hiperimmune anti-IBR en caprino se aplicaron 100 µl de este suero al pozo A-2 realizándose diluciones dobles hasta el pozo A-12, se repite la misma operación hasta los pozos H-2 al H-12. La placa se corrió de la forma antes descrita.

3.- Optimización de la concentración del antígeno.

La placa se sensibilizó con anticuerpos anti-IBR en bovino diluido 1:2 en solución carbonato-bicarbonato pH 9.6, aplicándose 100 µl a cada pozo; la placa se dejó incubar toda la noche en refrigeración. Tanto el lavado como el bloqueo se realizaron de la forma ya mencionada. Para la aplicación del antígeno previamente se le realizaron tanto diluciones decimales (0 a -6) como diluciones dobles (1:2 a 1:128) en solución PBS, aplicándose 100 µl de cada dilución, en una hilera las diluciones dobles y en otra las diluciones decimales, al mismo tiempo se realizaron las mismas diluciones de células aplicándose de la misma forma; la placa se dejó incubar 1 h. a 37° C. Posteriormente se lavó la placa. Para la identificación del antígeno se utilizaron anticuerpos anti-IBR de conejo, diluidos 1:8 en solución PBS; la placa se dejó incubar 1h. a 37° C. La placa se lava de la forma antes mencionada. El conjugado utilizado fue el anti-conejo (37), diluido 1:1500 en solución PBS; la placa se dejó incubar 1 h. 37° C. Se lava con solución de lavado. La aplicación del desarrollador de color, la solución de paro y la lectura se realizaron de la forma ya mencionada anteriormente.

#### 4.- Optimización de la concentración del anticuerpo de identificación.

##### a) Anticuerpos de identificación anti-IBR en conejo.

La sensibilización de la placa se llevó a cabo con anticuerpos anti-IBR en bovino, diluido 1:2 en solución carbonato-bicarbonato pH 9.6, aplicándose 100 µl a cada pozo; la placa se dejó incubar toda la noche en refrigeración. Lavado y bloqueo se realizaron de la forma ya mencionada. Para la aplicación del antígeno, este se diluyó previamente en diluciones decimales de 0 a -6 en solución PBS, aplicándose 100 µl de cada dilución en cada pozo de la microplaca en forma vertical; la placa se dejó incubar 1 h. a 37° C. La placa se lavó. Para la identificación del antígeno se utilizaron anticuerpos anti-IBR en conejo aplicándose primeramente 100 µl de solución PBS a toda la placa y posteriormente se aplicaron 100 µl de este suero a los pozos A-2 a H-2 realizándose de aquí diluciones dobles; la placa se dejó incubar 1 h. a 37° C. El conjugado utilizado fue el anti-conejo diluido 1:1500 en solución PBS; la placa se dejó incubar 1 h. a 37° C. Posteriormente la placa se lavó. La aplicación del desarrollador de color, la solución de paró y la lectura se llevaron a cabo de la forma ya mencionada.

##### b) Anticuerpos de identificación anti-IBR en bovino.

La sensibilización de la placa, el lavado, el bloqueo, la aplicación del antígeno se realizaron de la misma forma antes descrita. Para la aplicación del anticuerpo de identificación se utilizó suero hiperimmune de bovino aplicando primeramente 100 µl de solución de PBS a toda la placa y posteriormente se aplicaron

100 µl de suero hiperinmune de bovino de pozo A-2 al Pozo H-2, realizándose de aquí diluciones dobles hacia la derecha. Los procedimientos siguientes se llevaron acabo de la forma ya mencionada.

5.- Optimización de la concentración del conjugado anti-conejo.

La placa se sensibilizó con anticuerpos anti-IBR en bovino positivo y negativo, diluido 1:2 en solución carbonato-bicarbonato pH 9.6, aplicándose 100 µl en cada pozo de la placa; la placa se dejó incubar toda la noche en refrigeración. El lavado y el bloqueo se realizaron de la forma ya mencionada. Para la aplicación del antígeno el virus se diluyó previamente 1:128 en solución PBS, se aplicaron 100 µl en cada pozo; la placa se dejó incubar 1 h. a 37° C. Posteriormente la placa se lavó. El anticuerpo de identificación utilizado fueron anticuerpos anti-IBR en conejo diluido 1:8 en solución PBS, aplicándose 100 µl en cada pozo; la placa se dejó incubar 1 h. a 37°C . Posteriormente la placa se lavó. Las diluciones del conjugado (37) a probar fueron 1:1500, 1:3000, 1:6000, 1:12000 y 1:24000, aplicándose 100 µl de cada dilución en cada pozo por duplicado; la placa se dejó incubar 1 h. a 37° C. El lavado, la aplicación del desarrollador de color, la solución de paro y lectura se realizaron de la forma ya mencionada.

**IV.- MÉTODO PARA EL DESARROLLO DE LA PRUEBA DE ELISA DE CAPTURA.**

1.- Desarrollo de la prueba de ELISA en PBS, lavado nasal y semen de bovino, usando suero completo tanto para la captura como para la identificación del virus.

a) Desarrollo de la prueba de ELISA en PBS.

La sensibilización de la placa se realizó con suero hiperinmune de bovino diluidos 1:2 en solución carbonato-bicarbonato pH 9.6, a cada pozo se aplicaron 100 µl de ésta solución; la placa se dejó incubar toda la noche en refrigeración. El lavado y el bloqueo de la placa se llevó a cabo de la forma descrita anteriormente. Para la aplicación del antígeno previamente se realizaron diluciones dobles en PBS, de éstas diluciones se aplicaron 100 µl en cada pozo de la microplaca; la placa se dejó incubar 1 h. a 37° C. Se elimina la solución sensibilizante y se realiza el lavado. El anticuerpo de identificación para ésta placa fue el de conejo (suero hiperinmune anti-IBR en conejo) diluido 1:8 en solución PBS, aplicándose 100 µl en cada pozo; la placa se dejó incubar 1 h. a 37° C. Posteriormente la placa se lavó. La aplicación del conjugado anti-conejo se utilizó la dilución 1:1500 en PBS, aplicándose 100 µl en cada pozo de la microplaca desarrollador de color, solución de paro y lectura se realizaron de la forma mencionada anteriormente.

Testigos de la prueba:

- PBS sin virus
- PBS con células

b) Desarrollo de la prueba de ELISA en lavado nasal.

Para ésta prueba la sensibilización, el lavado, el bloqueo se realizaron de la forma descrita anteriormente. En el caso de la aplicación del antígeno la diferencia fue que éste se diluyó en



lavado nasal, realizándose diluciones dobles. Los procedimientos posteriores se llevaron acabo de la misma forma antes mencionada.

Testigos de la prueba:

- Lavado nasal sin virus
- Lavado nasal con células

c) Desarrollo de la prueba de ELISA en semen bovino.

En este caso como los anteriores la sensibilización, el lavado y el bloqueo se realizaron de la forma ya mencionada. Para la dilución del antígeno, este se diluyó en semen (este previamente diluido 1:10 en solución salina fisiológica) realizándose diluciones dobles. Los procedimientos posteriores se realizaron como ya se mencionó anteriormente.

Testigos de la prueba

- Semen sin virus
- Semen con células

2.- Desarrollo de la prueba de ELISA en PBS, lavado nasal y semen de bovino, usando gammaglobulinas tanto panto para la captura como para la identificación.

a) Desarrollo dela prueba de ELISA en PBS.

La placa se sensibilizó con gammaglobulinas de bovino diluidas 1:2 en solución carbonato-bicarbato pH 9.6, se aplicaron 100 µl en

lavado nasal, realizándose diluciones dobles. Los procedimientos posteriores se llevaron a cabo de la misma forma antes mencionada.

Testigos de la prueba:

- Lavado nasal sin virus
- Lavado nasal con células

c) Desarrollo de la prueba de ELISA en semen bovino.

En este caso como los anteriores la sensibilización, el lavado y el bloqueo se realizaron de la forma ya mencionada. Para la dilución del antígeno, este se diluyó en semen (este previamente diluido 1:10 en solución salina fisiológica) realizándose diluciones dobles. Los procedimientos posteriores se realizaron como ya se mencionó anteriormente.

Testigos de la prueba

- Semen sin virus
- Semen con células

2.- Desarrollo de la prueba de ELISA en PBS, lavado nasal y semen de bovino, usando gammaglobulinas tanto para la captura como para la identificación.

a) Desarrollo de la prueba de ELISA en PBS.

La placa se sensibilizó con gammaglobulinas de bovino diluidas 1:2 en solución carbonato-bicarbonato pH 9.6, se aplicaron 100 µl en

cada pozo de la microplaca; la placa se dejó incubar toda la noche en refrigeración. El lavado y bloqueo se realizaron de la forma mencionada anteriormente. Para la aplicación del antígeno, previamente se realizaron diluciones dobles en PBS de éstas diluciones se aplicaron 100 µl a cada pozo de la microplaca; la placa se dejó incubar 1 h. a 37° C. Posteriormente la placa se lavó. Para la identificación del antígeno se utilizaron gammaglobulinas de conejo diluidas 1:2 en solución PBS, aplicándose 100 µl en cada pozo; la placa se dejó incubar 1 h. a 37° C. La placa se lavó de la forma ya mencionada. En la aplicación del conjugado anti-conejo se utilizó la dilución 1:1500 en PBS aplicándose 100 µl en cada pozo, el desarrollador de color, solución de paro y lectura se realizó de la forma ya mencionada.

Testigos de la prueba:

- PBS sin virus
- PBS con células

b) Desarrollo de la prueba de ELISA en lavado nasal.

Para ésta prueba se realizaron los mismos procedimientos que para la prueba anterior, con la excepción de que el antígeno se diluyó previamente en lavado nasal realizándose diluciones dobles y aplicándose 100 µl a cada pozo de la microplaca.

Testigos de la prueba:

- Lavado nasal sin virus
- Lavado nasal sin células

c) Desarrollo de la prueba de ELISA en semen de bovino.

Al igual que en las dos pruebas anteriores. Ésta se realizó de la misma manera excepto que el antígeno se diluyó previamente el semen de bovino (diluido 1:10 en solución salina fisiológica), realizándose diluciones dobles y aplicando 100 µl a cada pozo de la microplaca.

Testigos de la prueba:

- Semen sin virus
- Semen con células

#### V.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de este trabajo se realizó con el paquete estadístico NWA (21).

CUADRO No. 1

CALENDARIO DE INMUNIZACIÓN No. 1 EN CAPRINO

INOCULACIÓN (día)	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	DOSIS
0	SC	2 ml BHV-1 inactivo 0.3 ml ACF
7	SC	2 ml BHV-1 inactivo 0.3 ml ACF
7	IM	2 ml BHV-1 inactivo
14	IM	2 ml BHV-1 inactivo
14	IV	0.5 ml BHV-1 inactivo 5 ml SSF
21	IV	0.5 ml BHV-1 inactivo 5 ml SSF
30	IV	2 ml BHV-1 inactivo 10 ml SSF
30	ID	0.5 ml BHV-1 inactivo

Virus con un título de  $10^6$ . Virus inactivado con formol al 0.05%. ACF.-  
 Adyuvante Completo de Freud. SSF.- Solución Salina Fisiológica al 0.85% de NaCl.  
 Vías de administración: Subcutánea (SC), Intramuscular (IM), Intravenosa (IV) e  
 Intradérmica (ID).

CUADRO No. 2

CALENDARIO DE INMUNIZACIÓN No. 2 EN CAPRINO

INOCULACIÓN (día)	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	DOSIS
0	ID	0.5 ml BHV-1 inactivo 0.1 ml ACF
7	SC	2 ml BHV-1 inactivo 0.3 ml ACF
14	IM	2 ml BHV-1 inactivo
21	IV	1 ml BHV-1 inactivo 10 ml SSF

Virus con título  $10^8$ . Virus inactivo con formol al 0.05% ACF.-  
 Adyuvante Completo de Freud. SSF.- Solución Salina Fisiológica al 0.85% de  
 NaCl. Vías de administración: subcutánea (SC), intradérmica (ID), intramuscular  
 (IM) e intravenosa (IV).

CUADRO No. 3

CALENDARIO INOCULACIÓN (día)	DE VÍA DE ADMINISTRACIÓN	INMUNIZACIÓN	No. 1 EN CONEJOS	DOSIS
0	SC			1 ml BHV-1 inactivo 0.3 ml ACF
5	SC			1 ml BHV-1 inactivo 0.3 ml ACF
11	IM			1 ml BHV-1 inactivo
16	IM			1 ml BHV-1 inactivo
21	IV			0.3 ml BHV-1 inactivo 0.7 ml SSF
26	IV			0.3 ml BHV-1 inactivo 0.7 ml SSF

Virus con título  $10^6$ . Virus inactivado con formol al 0.05%. ACF.-  
 Adyuvante Completo de Freud. SSF.- Solución Salina Fisiológica al 0.85% de NaCl.  
 Vías de administración: subcutánea (SC), intramuscular (IM) e intravenosa (IV).

CUADRO No. 4

CALENDARIO DE INMUNIZACIÓN No. 2 EN CONEJOS

INOCULACIÓN (día)	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	DOSIS
0	SC	1 ml BHV-1 inactivo 0.3 ml ACF
2	SC	1 ml BHV-1 inactivo 0.3 ml ACF
7	IM	1 ml BHV-1 inactivo
9	IM	1 ml BHV-1 inactivo
14	IV	0.3 ml BHV-1 inactivo 0.7 ml SSF
16	IV	0.3 ml BHV-1 inactivo 0.7 ml SSF
28	SC	0.5 ml BHV-1 activo
34	IV	0.3 ml BHV-1 activo 0.7 ml SSF

Virus con título  $10^8$ . Virus inactivado con formol al 0.05%. ACF.-  
 Adyuvante Completo de Freud. SSF.- Solución Salina Fisiológica al 0.85% de NaCl.  
 Vías de administración: subcutánea (SC), intramuscular (IM), e intravenosa (IV).



## CAPÍTULO V.- RESULTADOS

### I.- RESULTADOS DE LA OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

#### 1.- Obtención del virus.

Para el presente trabajo de investigación se utilizó como antígeno al Herpes Virus Bovino tipo 1 (BHV-1), el cual se tituló por medio de la prueba de efecto citopático en cultivo celular obteniéndose un título de  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml, al término del trabajo el virus seguía manteniendo el mismo título.

#### 2.- Obtención de anticuerpos.

##### a) Anticuerpos anti-IBR en caprino.

El suero obtenido de este animal se tituló por medio de la prueba de sueroneutralización, los resultados se muestran en los cuadros No. 5 y 6 respectivamente.

CUADRO No. 5 TITULO DE ANTICUERPOS ANTI-IBR EN CAPRINO CALENDARIO DE INMUNIZACIÓN No. 1

DÍA	TITULO
0	Negativo
18	Negativo
27	1 : 2

CUADRO No. 6 TITULO DE ANTICUERPOS ANTI-IBR EN CAPRINO CALENDARIO DE INMUNIZACIÓN No. 2

DÍA	TITULO
28	1 : 4
31	1 : 8

b) Anticuerpos anti-IBR en conejo.

Los sueros de estos animales se titularon por medio de la prueba de sueroneutralización, mostrándose los resultados en los cuadros No. 7 y 8 respectivamente.

CUADRO NO. 7 TITULO DE ANTICUERPOS ANTI-IBR EN CONEJO CALENDARIO DE INMUNIZACIÓN No. 1.

DÍA	TITULO
0	Negativo
13	Negativo
30	1 : 4

CUADRO NO. 8 TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-IBR EN CONEJO CALENDARIO DE INMUNIZACIÓN No. 2.

DÍA	TÍTULO SN	TÍTULO ELISA (Abs)
0	Negativo	Negativo
22	1 : 4	Negativo
40	1 : 8	0.041
47	1 : 16	0.175

c) Anticuerpos anti-IBR de bovino.

Del suero obtenido de estos animales, se mezclaron y se titulo por medio de la prueba diagnóstica comercial para IBR ELIVET, obteniéndose un título positivo de (++++). (3)

3.- Resultados de la precipitación de gamaglobulinas.

Se obtuvieron 2.5 ml. de gamaglobulinas de bovino y 5 ml. de gamaglobulinas de conejo.

4.- Resultados de la cuantificación de proteínas.

En cuanto a la cuantificación de proteínas tenemos los siguientes resultados:

ESPECIE	SUERO	PRECIPITADO
Conejo	7504 µcg/100 µl	683 µcg/100 µl
Bovino	6940 µcg/100 µl	658 µcg/100 µl

## II.- RESULTADOS DE LAS OPTIMIZACIONES PARA EL DESARROLLO DE LA PRUEBA DE ELISA.

Estos resultados se muestran al final de este apartado de la Figura No. 1 a la Figura No. 7.

## III.- RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ELISA DE CAPTURA.

1.- Resultados de la prueba de ELISA en PBS, lavado nasal y semen de bovino, utilizando suero completo tanto para la captura como para la identificación del virus.

En todas las repeticiones que se realizaron de este experimento, no hubo cambio de absorbancia entre el virus y los testigos de dilución.

2.- Resultados de la prueba de ELISA en PBS, lavado nasal y semen de bovino utilizando gamaglobulinas tanto para la captura como para la identificación del virus.

LECTURA CON ABS. @ As (492 nm)\*

DILUCIÓN DEL VI	PBS	LN	SEMEN
1:2	1.013	0.508	0.408
1:4	0.651	0.408	0.455
1:8	0.663	0.325	0.277
1:16	0.453	0.140	0.156
1:32	0.279	0.125	0.200
1:64	0.249	0.155	0.211
1:128	0.255	0.041	0.125

\*.- El resultado se refiere a la X de 3 repeticiones. @ As (492 nm) =

As<sub>p</sub>- As<sub>t</sub>

PBS.- Solución de buffer fosfatos. LN.- Lavado nasal.

Resultados obtenidos con el paquete estadístico NWA.

Correlación:

VARIAB.	MEDIA	S	VARIAB.	COVARIANZA	CORRELAC.	PRUEBA-T
1	0.509	0.2846	2	4.6119	0.9427	6.3204
			3	2.8592	0.7973	2.9543
2	0.223	0.1718	3	2.0360	0.9420	6.1728

Variab.- Variable 1: Pbs, variable 2: lavado nasal y variable 3: semen de bovino.  $\alpha = 0.05$

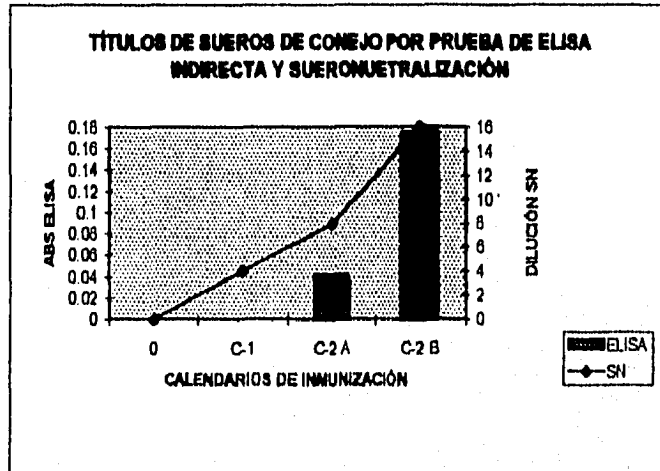
• ANALISIS DE VARIANZA (EN BLOQUES):

	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS
VARIACIÓN DEBIDA AL TRATAMIENTO	0.3084	2	0.1542
VARIACIÓN DEBIDA AL ERROR	0.1254	12	1.0450
TOTAL	0.4338		

PRUEBA F: 14.75534

$\alpha = 0.05$

FIGURA No. 1 TITULACION DE SUEROS DE CONEJO POR PRUEBA DE ELISA INDIRECTA Y SUERONEUTRALIZACION.



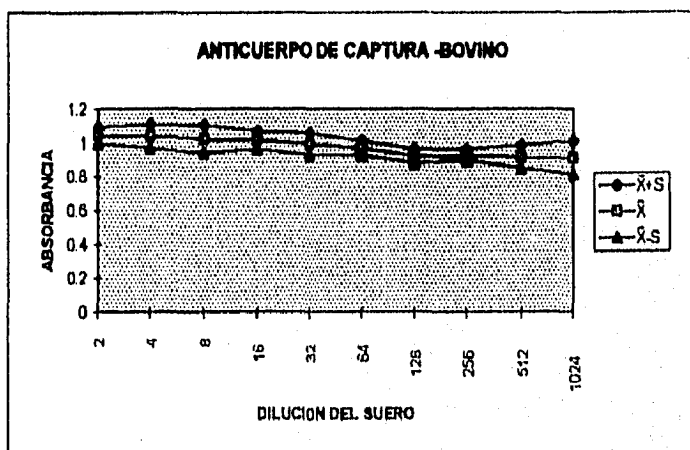
C-1 : Calendario de inmunización No. 1  
 C\_2 A: Calendario de inmunización No. 2  
 C-3 B: Calendario de inmunización No. 2 (conejos sangrados a blanco).

	(-)	C-1	C-2	C-2	
VIRUS	0.109	0.147	0.184	0.182	0.274 0.305 0.372 0.401
CELULAS	0.202	0.124	0.165	0.184	0.242 0.215 0.305 0.292
	(-)	(-)	(-)	(-)	0.032 0.061 0.057 0.108 RESTA

TITULACION DE SUEROS DE CONEJO POR ELISA INDIRECTA

CALENDA.	ELISA	SN
0	0	0
C-1	0	4
C-2 A	0.041	8
C-2 B	0.175	16

FIGURA No. 2 OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION DEL ANTICUERPO DE CAPTURA DE BOVINO.

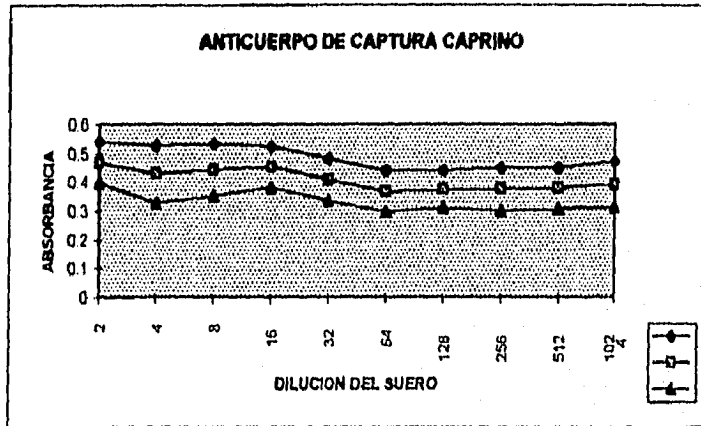


Los puntos son la X mas menos una S.

DILUCION	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
	1.122	0.801	0.724	0.845	0.746	0.832	0.693	0.631	0.628	0.621
	1.135	0.811	0.836	0.846	0.832	0.761	0.731	0.686	0.613	0.585
	1.115	0.893	0.774	0.752	0.846	0.621	0.584	0.665	0.662	0.576
	1.111	0.894	0.875	0.73	0.772	0.604	0.558	0.689	0.593	0.629
	1.175	0.872	0.837	0.721	0.901	0.742	0.524	0.635	0.658	0.654
	1.125	0.823	0.742	0.737	0.721	0.657	0.539	0.621	0.566	0.525
	1.162	0.838	0.894	0.742	0.727	0.684	0.533	0.611	0.555	0.535
	1.047	0.818	0.735	0.871	0.764	0.691	0.554	0.524	0.457	0.501
$\bar{X}$	1.124	0.844	0.802	0.781	0.778	0.699	0.591	0.633	0.599	0.578
S	0.038	0.037	0.067	0.062	0.047	0.078	0.078	0.053	0.071	0.065
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
$\bar{X}+S$	1.098	1.109	1.107	1.072	1.058	1.012	0.983	0.983	0.965	1.009
$\bar{X}$	1.048	1.039	1.024	1.017	0.992	0.97	0.92	0.929	0.917	0.911
$\bar{X}-S$	1	0.969	0.941	0.962	0.928	0.928	0.877	0.895	0.849	0.813



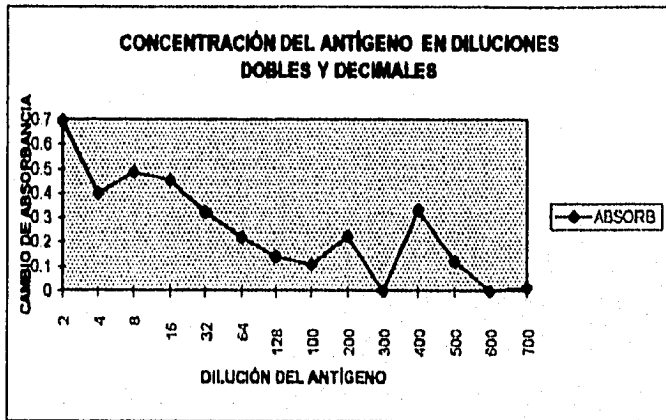
FIGURA No. 3 OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION DEL ANTICUERPO DE CAPTURA DE CAPRINO.



Los puntos son la X de la absorbancia mas menos una S.

DIL	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
	0.541	0.574	0.506	0.472	0.475	0.488	0.491	0.511	0.485	0.474
	0.482	0.477	0.532	0.542	0.524	0.363	0.405	0.438	0.437	0.441
	0.558	0.463	0.511	0.525	0.413	0.424	0.426	0.416	0.414	0.442
	0.463	0.401	0.366	0.453	0.428	0.415	0.358	0.341	0.366	0.411
	0.506	0.406	0.511	0.486	0.358	0.346	0.371	0.347	0.365	0.426
	0.462	0.512	0.478	0.431	0.378	0.351	0.301	0.294	0.335	0.346
	0.381	0.319	0.348	0.332	0.403	0.286	0.348	0.291	0.273	0.369
	0.348	0.281	0.298	0.372	0.285	0.268	0.302	0.373	0.307	0.227
$\bar{X}$	0.469	0.429	0.444	0.452	0.408	0.369	0.375	0.376	0.379	0.392
S	0.073	0.098	0.081	0.072	0.073	0.073	0.064	0.075	0.072	0.078
$\bar{X}+S$	0.542	0.527	0.535	0.524	0.481	0.441	0.439	0.451	0.451	0.47
$\bar{X}-S$	0.396	0.328	0.353	0.38	0.335	0.295	0.311	0.301	0.307	0.314

FIGURA No. 4 OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION DEL ANTIGENO.

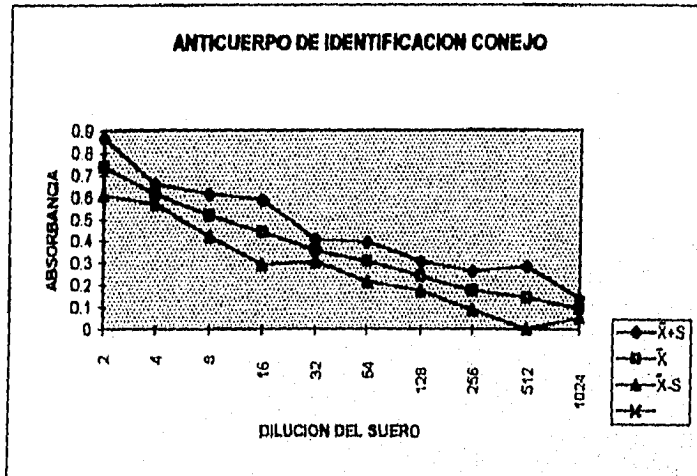


Las lecturas son las asorbancias del antígeno menos las asorbancias de los testigos negativos.

TESTIGOS	DILUCIONES DECIMALES:						
0.243 DIL.	0	-1	-2	-3	-4	-5	-6
0.131 ABS	0.107	0.22	0.196	0.335	0.12	-0.32	0.012
0.612							
0.485	DILUCIONES DOBLES						
0.571 DIL.	2	4	8	16	32	64	128
0.484 ABS	0.697	0.401	0.484	0.451	0.32	0.222	0.141
0.073							
0.117							

DIL.	2	4	8	16	32	64	128	100	200	300	400	500	600	700
ABSORB	0.697	0.401	0.484	0.451	0.321	0.22	0.141	0.107	0.222	0	0.335	0.118	0	0.012

FIGURA No. 5 OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION DEL ANTICUERPO DE IDENTIFICACION DE CONEJO.



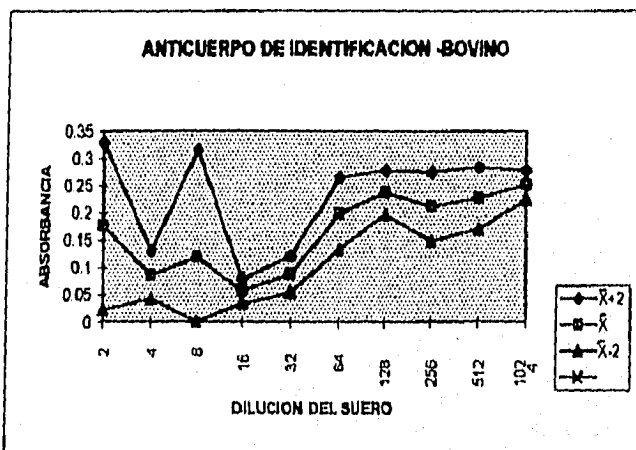
Los puntos son la  $\bar{X}$  de la absorbancia mas menos una S.

DILUCION	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
	0.881	0.611	0.431	0.526	0.313	0.295	0.268	0.308	0.187	0.171
	0.675	0.573	0.524	0.453	0.358	0.307	0.305	0.235	0.214	0.062
	1.035	0.624	0.495	0.323	0.305	0.237	0.179	0.173	0.165	0.075
	0.729	0.618	0.701	0.624	0.394	0.401	0.312	0.201	0.059	0.117
	0.727	0.597	0.617	0.598	0.481	0.361	0.268	0.209	0.137	0.048
	0.709	0.625	0.484	0.453	0.335	0.425	0.258	0.127	0.411	0.135
	0.813	0.704	0.483	0.228	0.341	0.152	0.122	0.118	0.011	0.081
	0.708	0.541	0.417	0.287	0.332	0.258	0.198	0.017	-0.06	0.077

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
PROMEDIO	0.735	0.612	0.517	0.438	0.355	0.305	0.238	0.173	0.140	0.093
DESVIACION	0.127	0.047	0.067	0.145	0.051	0.080	0.088	0.088	0.145	0.043

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
$\bar{X}+S$	0.862	0.659	0.614	0.583	0.406	0.395	0.304	0.261	0.285	0.138
$\bar{X}$	0.735	0.612	0.517	0.438	0.355	0.305	0.238	0.173	0.14	0.093
$\bar{X}-S$	0.608	0.565	0.42	0.293	0.304	0.215	0.172	0.085	0	0.05

FIGURA No. 6 OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION DEL ANTICUERPO DE IDENTIFICACION DE BOVINO.



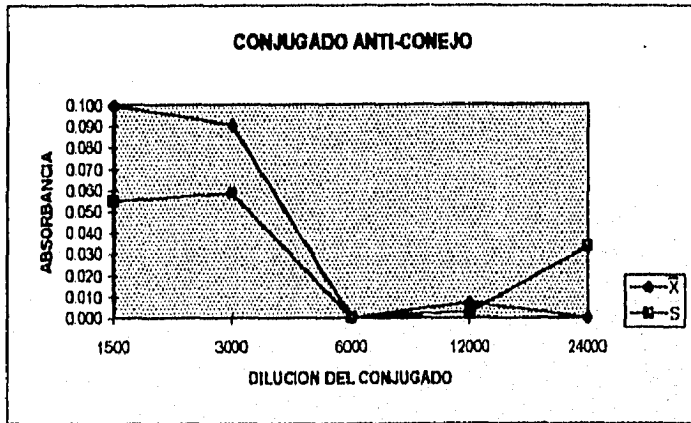
Los puntos son la X de la absorbancia mas menos una S.

DILUCION	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
	0.544	0.061	0.056	0.048	0.073	0.167	0.262	0.202	0.176	0.209
	0.141	0.158	0.055	0.075	0.132	0.181	0.314	0.328	0.311	0.273
	0.172	0.088	0.079	0.065	0.102	0.145	0.218	0.231	0.206	0.257
	0.151	0.123	0.808	0.101	0.093	0.119	0.247	0.256	0.237	0.284
	0.101	0.117	0.052	0.047	0.119	0.334	0.203	0.174	0.149	0.223
	0.132	0.047	0.035	0.039	0.063	0.233	0.252	0.197	0.285	0.234
	0.098	0.046	0.011	0.029	0.064	0.207	0.209	0.112	0.185	0.257
	0.065	0.046	0.046	0.051	0.028	0.202	0.193	0.194	0.259	0.272

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
PROMEDIO	0.176	0.096	0.118	0.057	0.087	0.199	0.237	0.212	0.227	0.251
DESVIACION	0.153	0.043	0.199	0.023	0.033	0.086	0.040	0.083	0.056	0.027

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
$\bar{X}+2$	0.329	0.129	0.317	0.08	0.12	0.265	0.277	0.275	0.283	0.276
$\bar{X}$	0.176	0.096	0.118	0.057	0.087	0.199	0.237	0.212	0.227	0.251
$\bar{X}-2$	0.023	0.043	0	0.034	0.054	0.133	0.197	0.149	0.171	0.224

FIGURA No. 7 OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION DEL CONJUGADO ANTI-CONEJO.



Las lecturas son las absorbancias de los testigos positivos menos las absorbancias de los testigos negativos

DILUCION	1500	3000	6000	12000	24000
VIRUS	0.282	0.251	0.118	0.114	0.069
CELULAS	0.184	0.139	0.112	0.107	0.095
VIRUS	0.281	0.273	0.011	0.116	0.091
CELULAS	0.135	0.138	0.172	0.112	0.081
VIRUS	0.228	0.231	0.117	0.101	0.104
CELULAS	0.073	0.207	0.149	0.091	0.102

Lectura de las absorbancias menos los testigos negativo:

	0.098	0.112	0.006	0.007	-0.056
	0.046	0.135	-0.081	0.004	0.002
	0.155	0.024	-0.032	0.01	0.002

DILUCION	1500	3000	6000	12000	24000
X	0.100	0.090	0	0.007	0.000
S	0.055	0.059	0.000	0.003	0.033

## CAPÍTULO VI.- DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos podemos observar que el cultivo del virus de IBR que se obtuvo durante el presente trabajo presentó un título de  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml, el cual si lo comparamos con el obtenido en otro trabajo (22), podemos decir que es igual. (22)

En cuanto a la obtención de anticuerpos tenemos primeramente a los anticuerpos anti-IBR en caprino, en este animal se emplearon dos calendarios de inmunización; en el primer calendario (cuadro No. 1) se empleo el antígeno con un título  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml, obteniéndose como máximo un título de anticuerpos por sueroneutralización (SN) de 1:2 (cuadro No. 5); en el segundo calendario (cuadro No. 2) se empleo un antígeno con título  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml, obteniéndose títulos de anticuerpos de 1:8 por SN (cuadro No. 6). Como podemos observar al aumentar al doble la concentración del antígeno la respuesta fue significativa obteniéndose títulos de 1:8 por SN; esta respuesta se atribuye a que en el segundo calendario de inmunización la concentración del antígeno es mayor, indicando que a mayor concentración del antígeno mayor respuesta humoral, además se realizó un refuerzo al animal. Otros autores (8) mencionan que los caprinos pueden ser utilizados para obtener sueros hiperinmunes anti-IBR, pero no se indica el calendario de inmunización, el título de anticuerpos obtenido ni la concentración de antígeno aplicada.

Para la obtención de anticuerpos anti-IBR en conejo se utilizaron dos calendarios de inmunización; el primero (cuadro No. 3) utilizando un antígeno con  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml, obteniendo un título de anticuerpos máximo de 1:4 por SN (cuadro No. 7); en el segundo calendario (cuadro No. 4) se empleo un virus con título  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml partículas infectantes, obteniendo un título de

anticuerpos de 1:16 por SN (cuadro No. 8). El título de anticuerpos se ve aumentado cuando cambiamos de antígeno por uno de mayor concentración y además en el segundo calendario de inmunización algunas aplicaciones se realizaron con antígeno vivo. Honda E. Y Col. mencionan que inoculando virus vivo y utilizando una vía de administración directamente a mucosas, se pueden obtener títulos de anticuerpos con títulos de 1:8 hacia la 5ta. semana y de hasta 1:1024 7 semanas después de la primera inoculación. En este caso, si a los conejos se hubiera inoculado mayor cantidad de virus vivo por vía endotraqueal y sangrado 1 o 2 semanas después posiblemente los títulos se hubieran incrementado (17). Estos resultados refuerzan la ruta de administración para la inducción de anticuerpos.

En cuanto a los resultados que se obtuvieron con respecto a la titulación de los sueros de conejo, se compararon dos pruebas la de Sueroneutralización y ELISA indirecta (cuadro No. 8), observándose que las lecturas son proporcionales en los dos casos, podemos decir que existe relación entre las dos pruebas y es posible seguir el curso de la inmunización por la prueba de ELISA (17).

Comparando los resultados de cabra con los de conejo, se observa que el conejo presenta una respuesta mayor a la exposición del antígeno la misma concentración de virus; esto se puede atribuir a factores propios de la especie, del individuo, a que los caprinos por su tamaño requieren una concentración diferente del antígeno y principalmente a que en los conejos se realizaron inoculaciones con virus vivo (17).

Los sueros anti-IBR en bovino que se mezclaron, estos fueron titulados por medio de la prueba comercial para el diagnóstico de

IBR ELIVET (Lab. Pronabive), obteniéndose un título positivo (++++), este título es el más alto obtenido por esta prueba. Actualmente esta prueba ya no existe en el mercado fue retirada en 1995. En la experiencia personal aún que el título se aprecia alto y el fabricante lo relaciona con infección, los bovinos usados se encontraron bajo un esquema de vacunación muy cerrado (2).

En la optimización de la concentración del anticuerpo de captura se utilizaron dos anticuerpos diferentes primeramente los de bovino, en la Figura No. 2 se muestran los resultados, en la cual podemos observar que todas las lecturas de absorbancia son similares, siendo la dilución 1:2 ligeramente mayor que el resto de las lecturas; en segundo término se utilizó anticuerpos de caprino, en la Figura No. 3 se encuentran los resultados de la optimización del anticuerpo de caprino, los cuales muestran una similitud en las lecturas de absorbancia. Comparando los resultados obtenidos entre bovino y caprino, tenemos que las lecturas de absorbancia del bovino presentan mejor distribución y comportamiento. Además hay que agregar que el bovino presentó mayor cantidad de anticuerpos. Por lo tanto podemos concluir que la concentración óptima para el anticuerpo de captura es suero de bovino diluido 1:2.

Para la optimización de la concentración del antígeno, se realizaron diluciones dobles y diluciones decimales, los resultados se muestran en la Figura No. 4, integrando los resultados de las dos variantes. Respecto a las diluciones dobles, los cambios de absorbancia (las lecturas del antígeno menos los testigos negativos) van disminuyendo conforme la concentración del antígeno baja, así tenemos que la dilución 1:2 es la lectura más alta y la dilución 1:128 es la dilución más baja, se mantuvo una correlación entre la concentración del antígeno y las lecturas obtenidas; en



cuanto a las diluciones decimales no existe una relación entre la concentración del antígeno y las lecturas obtenidas que son muy variadas. En ésta optimización se decidió tomar como concentración óptima del antígeno la dilución 1:16, ya que se obtiene una buena lectura en la sensibilidad de la prueba en la concentración mínima del virus detectada; la sensibilidad de la prueba fue de  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml.

Ahora bien para la optimización de la concentración del anticuerpo de identificación se utilizaron dos sueros, primeramente el de conejo, en la Figura No. 5 se muestran los resultados obtenidos en esta prueba, observando que hay una relación en las lecturas de absorbancia, así tenemos que a menor concentración del anticuerpo menor lectura de absorbancia. El rango de desviación estándar es muy bajo; en segundo suero empleado fue el de bovino los resultados obtenidos se muestran en la Figura No. 6, en los cuales se observa que no hay relación alguna entre la concentración del anticuerpo y las lecturas de absorbancia obtenidas. Esta disparidad de resultados pudo deber a que el anticuerpo de identificación y el de captura fueron de la misma especie, por lo que el conjugado anti-bovino se puede pegar directamente a la placa o al anticuerpo de captura y dar resultados falsos. Por las características mencionadas de la prueba, se tomó como concentración óptima para la dilución del anticuerpo de identificación suero de conejo diluido 1:8.

En cuanto a la optimización de la concentración del conjugado anti-conejo, los resultados se muestran en la figura No. 7, observando que la dilución óptima es 1:1500, ya que ésta es la lectura de cambio de absorbancia más alta; el fabricante de este producto recomienda su utilización 1:600, pero dicha dilución se

puede ver modificada debido a condiciones de transporte, almacenaje, tiempo de elaboración y condiciones particulares de la prueba (37).

En la Figura No. 7 se muestran los resultados obtenidos para la optimización de la concentración de anticuerpo de captura-bovino, mostrando estos para la repetibilidad de la prueba, en la cual se ve que hay continuidad y el margen de error es bajo.

La prueba de ELISA en PBS, lavado nasal y semen de bovino utilizando suero completo de bovino para la captura del virus y suero completo de conejo para la identificación, en todas las pruebas realizadas las lecturas no indicaron relación en cuanto a la dilución del mismo, esto se puede explicar ya que en un suero completo existe menor concentración de anticuerpos y gran cantidad de proteínas y la reacción puede ser inespecífica hacia la microplaca.

Para la prueba de ELISA en PBS, lavado nasal y semen de bovino utilizando gamaglobulinas de bovino para captura y gamaglobulinas de conejo para la identificación del antígeno tenemos que el índice de correlación entre la prueba usando virus diluido en PBS y en lavado nasal fue de: 0.9427; el valor de T de ésta prueba es de 6.3204, valor que resulta mayor que la T de tablas (0.05, 7) = 2.3646; por lo tanto al nivel  $p < 0.05$  se puede interpretar como que el valor de correlación de 0.9427 es significativo, es decir que hay asociación entre estas dos variables (40). El índice de correlación entre la prueba usando el virus diluido en PBS y semen fue de: 0.80; el valor T de ésta prueba es de 2.9543, valor que resulta mayor que la T de tablas (0.05, 7) = 2.3646; por lo tanto al nivel  $p < 0.05$  se puede interpretar como que el valor de

correlación de 0.80 es significativo, es decir hay asociación entre las dos variables (30). El índice de correlación entre la prueba usando el virus diluido en lavado nasal y semen fue de: 0.9402; el valor T de ésta prueba es de 6.1728 valor que resulta mayor que la T de tablas (0.05, 7) = 2.3646; por lo tanto al nivel  $p < 0.05$  se puede interpretar como que el valor de correlación de 0.9402 es significativo, es decir hay asociación entre las dos variables (40). Análisis de varianza: F calculada (14.75534) resultó ser mayor que F de tablas (3.89); por lo cual se rechaza  $H_0$ , concluyéndose que no existe diferencia de comportamiento del virus entre los tres tratamientos de dilución (40).

Esta prueba en especial se recomienda para diagnóstico de animales en fase aguda de la enfermedad, ya que algunos autores reportan que éstos animales eliminan en secreciones nasales títulos virales de hasta  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml; la cantidad de virus que eliminan en semen no se encontró reportada en la literatura revisada (29).

Existen otros métodos de diagnóstico más sensibles que ésta prueba, como es el aislamiento viral en donde se obtiene una sensibilidad de  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/ml; el otro método es la inmunofluorescencia directa, la cual tiene una sensibilidad de  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml. (22). La prueba de ELISA tiene algunas ventajas sobre otros métodos para el diagnóstico de IBR como que es una prueba en la cual se emplea poco tiempo, su costo es bajo, no necesita personal altamente capacitado, no necesita ser manejada en esterilidad y no necesita que el virus este viable para que lo detecte.

La sensibilidad de la prueba de ELISA se puede incrementar de la siguiente manera: usando anticuerpo de captura con un título

mayor, usando anticuerpo de identificación con un título mayor, analizando el mejor soporte para los anticuerpos de captura, cambiando el sistema de amplificación por otro desarrollador de color u otro sistema, por ejemplo Avidina-biotina (ABTS).

## CAPÍTULO VII.- CONCLUSIONES

a) El mejor método de inmunización para la obtención de suero hiperinmune anti-IBR fue el realizado en conejos, utilizando virus activo (vivo) durante las últimas inmunizaciones.

b) La prueba más eficiente para la detección de virus fue el método de ELISA de captura usando gamaglobulinas de bovino como anticuerpo de captura y gamaglobulinas de conejo como anticuerpos de identificación.

c) La sensibilidad que mostró la prueba de ELISA utilizada en este trabajo fue de  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml., por lo tanto se recomienda usarla en animales enfermos en fase aguda.

d) Por medio de la prueba de ELISA no existió diferencia en la identificación del virus, empleando lavado nasal o semen bovino.

e) Esta prueba en las condiciones ya mencionadas, se puede usar como un método alternativo de diagnóstico, para la detección de virus en semen bovino o lavado nasal.

Se recomienda llevar a cabo la continuación de este trabajo, buscando primeramente aumentar la sensibilidad de la prueba y posteriormente evaluar su eficacia a nivel de campo.

## CAPÍTULO VIII.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Ackermann M.; Muller H. K.; bruckner L. And Kihm U.:  
Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland:  
review and prospects. Veterinary Microbiology. 23. 365-370 pp.  
1990.
- 2.- Beldico. ELIVET-IBR (1994). Detection of especificie infectious  
bovine rhinotracheitis virus antibodies. Laboratorios Pronabive.
- 3.- Blood D. C.; Henderson J. A. Y Radostitis O. M. (1992) Medicina  
veterinaria. 7ta. Edición. Ed. Interamericana. México.
- 4.- Bolton C. D.; Hsien-Jue C.; Alexanders A. Ardans.; Barry K. And  
Yuan Chung Z.: Evaluation of the critical parameters of a sensitive  
ELISA test using purified infectious bovine rhinotracheitis virus  
antigens. Veterinary Microbiology. 6, 265-279 pp. 1981.
- 5.- Collins K. J.; Butcher C. A.; Teramoto A. Y. And Winston S.:  
Rapid detection of bovine Herpesvirus type 1 antigens in nasal swab  
specimens with an antigen capture Enzyme-Linked Immunosorbent  
Assay. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 21 No. 3. 375-380 pp.  
1985.
- 6.- Comisión México Americana para la Prevención de la Fiebre  
Aftosa: Manual ilustrado para el reconocimiento y  
diagnóstico de enfermedades de los animales. México D. F. 1982.
- 7.- Cordero L.; Hoffman W.; Jiménez C.; Murillo J.; Villalobos P.;  
Quirós J. Y Rodriguez L.: Evaluación de la intradermorreacción como

prueba para el diagnóstico de infecciones por virus Herpes bovino.  
Ciencias Veterinarias. Vo. 14 No. 2. 25-28 pp. 1992.

8.- Correa G. P. (1988). Enfermedades virales de los animales domésticos. Vol 2 poligástricos. 5ta. Edición. Ed. Paradigmas. México D. F.

9.- Correa G.; Brown D. L. N.; y Bryner D. J. H.: Presencia de anticuerpos contra Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Diarrea Viral Bovina, Parainfluenza 3, Brucelosis, Leptospirosis, Vibriosis y *Haemophilus somnus* en sueros de bovinos con problemas patológicos, reproductores y respiratorios. Técnica Pecuaria México 26 - 33. 1974.

10.- Delgado Y.; Barrera M.; Denis M. Y Rojas L.: Reporte de un brote de infección respiratoria por herpes virus bovino 1 en terneros. Rev. Salud Animal. 14: 201-203 pp. 1992.

11.- Drew T. W.; Hewitt-Taylor C.; Watson L.; Edwards S.: Effect of storage conditions and culture technique on the isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from bovine semen. Veterinary Record. 121. 547-548 pp. 1987.

12.- Fenner F.; Peter A. Bachmann (1987). Veterinary Virology. 1st. Edition. Ed. Academic Press Inc. London.

13.- Golán E. A.; Scortti M.; Occhi L. H.; García E. M.; Dei Cas F.; Daffner F. J.; Pinotti A. M.: Detección de Herpes virus bovino tipo 1 en semen congelado y fetos abortados en la provincia de Santa Fe Argentina. Avances en Ciencias Veterinarias. Vol. 5. No. 2. 142-145 pp. 1990.

- 14.- Haffar A. (1987). Infectious bovine rhinotracheitis in Burgundy; model epidemiological study of respiratory diseases. Thesis; Ecole Nationale Veterinaire D'Alfort France.
- 15.- Hill B. D.; Hill M. W. M.; Chung G. Y. S.; Whittle R. J.: Meningoencephalitis in calves due to bovine herpesvirus type 1 infection. Australian Veterinary Journal. Vol. 61 No. 7. 242-243 pp. 1984.
- 16.- Hochstein-Mintzel V.; Reinhardt M. V.; Riedemann S. Y Marinella N.: Serología de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) en 21 predios de la décima región de Chile. Archivos de Medicina Veterinaria. XVIII: No. 1; 53-56 pp; 1986.
- 17.- Honda E.; Taniguchi T.; Watanabe M. And Kumagai T.: Detection of bovine rhinotracheitis virus antibody by neutralizing test and ELISA in experimentally infected rabbits. Journal Vet. Med. B. 38, 55-59. 1991.
- 18.- Howard G. J.; Francis J. T. (1983). Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 4ta. Edición. Ed. La Prensa Mexicana S. A. México.
- 19.- Instituto Politécnico Nacional (1994). Manual de laboratorio de inmunología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Depto. De Inmunología . México D. F.
- 20.- Kendrick J. W. And McEntee K.: The effect of artificial insemination with semen contaminated with IBR-IPV virus. Cornell Veterinary. 57 (1): 3-11 pp. 1967.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



21.- López B. B. Y Chávez G. M. E. (1994). Manual de uso del paquete estadístico "NWA Statpak" un enfoque a la biomedicina. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.

22.- Lupton H. W.; Barnes H. J. And Reed D. E.: Evaluation of the rabbit as a laboratory model for infectious bovine rhinotracheitis virus infection. Cornell Veterinary. 70: 77-95 pp. 1980.

23.- Manet G.; Guibert M.; Menard M. F.; Perrrin B.: Etude sérologique de la rhinotrachéite infectieuse bovine (I.B.R.): comparaison de quelques réactions. Revue Méd. Vét. Vol. 144 No. 7. 591-598 pp. 1993.

24.- Marshall R. L.; Israel B. A.; Letchworth G. J.: Monoclonal antibody analysis of bovine herpesvirus 1 glycoprotein antigenic areas relevant to natural infection. Virology. 165 (2). 338-348 pp. 1988.

25.- Mckercher D. G. (1970). Viral abortions and genital infections, infections pustular vulvovaginitis. Bovine Medicine and Surgery American Veterinary Publications Inc. 39 - 41.

26.- Mohan Kumar K. M.; M. Rajasekhar and Krishnappa G.: Isolation of infections bovine rhinotracheitis virus in Karnataka. Indian Veterinary Journal. February 109-112 pp. 1994.

27.- Morilla G. A. (1986). Manual de inmunología. 1ra. Edición. Editorial Diana. México D. F.

28.- Morilla G. A. (1989). Inmunología veterinaria. 1ra. Edición. Ed. Diana. México D. F.

29.- Narita M.; Inu s.; Murakami Y.; Nanback s.; Shimuzu Y.: Pathological changes in young and adult cattle after intranasal inoculation with infectious rhinotracheitis virus. Journal of Comparative Pathology. 92 (1) 41-49. 1982.

30.- Neilson, F. J. A. (1987) Farm production and practice. Infectious bovine rhinotracheitis survey of occurrence in New Zealand cattle. Wellington, New Zealand; MAF Corp.; Primedia.

31.- Ruiz D. F.; Cuevas C. F.: Rinotraqueitis infecciosa bovina como causa de aborto en México. Técnica Pecuaria México. 16, 51. 1971.

32.- Sánchez Viscaíno J. M.; Cambra Alvarez M. (1987). Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en patología animal y vegetal. Serie Técnica No. 7. 2da. Edición. Ed. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. París Francia.

33.- Satyanarayana K.; Babu T. S.: Serological survey of bovine herpes virus 1 (BHV-1) infection bovine in Andhra Pradesh. Indian Journal of Animal Sciences. Vol. 56 No. 6; 499-502 pp. 1987.

34.- Sección B: Bovinos. Rinotraqueitis infecciosa. Virología y diagnóstico. Avances en medicina veterinaria. Vol. VIII, Núm. 1; 69 - 79 pp. 1990.

35.- Sección B: Bovinos. Vacunación contra rinotraqueitis infecciosa bovina. Avances en medicina veterinaria. Vol. VIII, Núm 2; 18 - 27 pp. 1990.

36.- Suzan V. M.; Onuma M.; Aguilar R. E.; and Murakami y.: Prevalence Herpes virus 1, Parainfluenza 3, Bovine Rotavirus, Bovine Viral Diarrhea, Bovine Adenovirus 7, Bovine Leukemia virus and Bluetongue virus antibodies in cattle in México. Japanese Journal of Veterinary Research. 31:(3/4); 125-168 pp; 1983.

37.- The Binfig Site Ltd. Anti rabbit IgGAM(H-L) peroxidase conjugate. Institute of Research & Developmet. Birmingham England.

38.- Van Der Maaten M. J.; Miller J. M.: Ovarian lesions in heifers exposed to infectious bovine rhinotracheitis virus by non-genital routes on the day after breeding. Veterinary Microbiology. 10: 155-163 pp. 1985.

39.- Vilchis M. C.; Susana M. V.; Rosales B. C.; Aguilar S. A.; Vargas L. G.; Peña M. Y.; Jorge J. M.; Batalla C. D. : Estudio epizootiológico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en ganado productor de leche y carne. Técnica Pecuaria México. 49. 106 - 115. 1985.

40.- Wayne W. Daniel (1983). Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 1ra. Edición. Editorial Limusa. México D. F.

41.- Weiblen R.; Kreutz L. C.; Canabaro T. F.; Flores Y. E.: Balanoposthitis in bulls due bovine herpesvirus in South Brazil.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 24: 8. 773-  
775 pp. 1991.