



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Elaboración de un conjugado experimental para el diagnóstico de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) por la técnica de inmunofluorescencia en el CENASA”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

Edgar Omar Valera González.

Asesores:

Asesor - M.S.C. Raúl Arturo Mar Cruz

Coasesor - M.V.Z. Ángel Miranda Sánchez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2013



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, autoriza al alumno: **Edgar Omar Valera Gonzalez**
Con número de cuenta: **40210601-4** a presentar **El Trabajo de Tesis:**

"ELABORACIÓN DE UN CONJUGADO EXPERIMENTAL PARA EL DIAGNOSTICO DE RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA (IBR) POR LA TECNICA DE INMUNOFLOURESENCIA EN EL CENESA"

Bajo la asesoría del: **M. en C. Raúl Arturo Mar Cruz**
Para obtener el título de: **Medico Veterinario Zootecnista**



PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FECHA DE RECEPCIÓN DEL TRABAJO	VOTO APROBATORIO FIRMA
PRESIDENTE	<u>M. en C. Raúl Arturo Mar Cruz</u>	<u>15-03-2013</u>	
VOCAL	<u>Dr. Humberto A. Martínez Rodríguez</u>	<u>15-03-2013</u>	
SECRETARIO	<u>DR. Armando Enrique Esperón Sumano</u>	<u>15-III-2013</u>	
1er SUPLENTE	<u>M.V.Z. Rafael Pérez González</u>	<u>15-III-2013</u>	
2do SUPLENTE	<u>M.V.Z. Raúl García Tinajero</u>	<u>15-03-2013</u>	

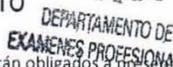
Atentamente notificamos su participación en la revisión y evaluación del trabajo para que en un plazo no mayor a 30 días hábiles emita su VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de marzo de 2013.

L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
JEFA DEL DEPARTAMENTO



NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Este formato deberá ser entregado original y 3 copias con firmas originales en tinta negra, sin tachaduras y enmendaduras.

HHA/pm

DEDICATORIA

A ti **mamá**, por todo el apoyo y paciencia que has tenido conmigo desde que supiste mi deseo por alcanzar ésta meta. Esto es el fruto de lo que siempre me has enseñado con hechos y no con palabras.

A mis **padres**, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como personal, por su incondicional apoyo en mi vida, porque creyeron en mi y me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo concluir mi trabajo, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, por todo este tiempo y el orgullo que sienten por mi, fue lo que me hizo perseverar y alcanzar mi meta.

A ti mi amor, **Diana Shendel** que has sido pieza fundamental en mi vida y en ésta tesis, gracias por ser y existir en mi vida.

A mis **hermanos**, Iván, Rocha, Eloy, Lalo, Tlapale y Alfonso, que siempre han estado a mi lado apoyándome y aconsejándome, por ver por mi y por ser mis grandes amigos y espero siempre seguir contando con ustedes.

A mis **tíos, primos, abuelos y amigos** por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida y a todos mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

A la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** por la oportunidad brindada para realizar mis estudios, y a los animalitos quienes nos permitieron aprender de y en ellos. Así como al Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (**CENASA**) por haber facilitado todo el material y asesoramiento técnico para la realización de ésta tesis.

Agradezco al M.SC. **RAÚL MAR CRUZ**, mi asesor, a mi coasesor M.V.Z. **ÁNGEL MIRANDA SÁNCHEZ** y al M.V.Z. **FELIPE DE LA O RAMÍREZ**, por haberme guiado durante el desarrollo de esta tesis. Gracias por el trabajo exigido que en su momento me hizo flaquear, pero que ahora les agradezco infinitamente porque fortaleció mi carácter, me enseñó a trabajar con mayor disciplina y darme cuenta que puedo hacer más de lo que creo. Porque cuando sentí que ya no podía siempre encontré en usted palabras de aliento y confianza para seguir trabajando. Por todas sus observaciones sobre

mi trabajo durante las presentaciones de mis avances de tesis, las cuales me ayudaron a mejorarlo.

A mis **compañeros** que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y personal, por todas los días que pasamos dentro y fuera de la FESC, en donde hemos crecido como personas y que hasta ahora, seguimos siendo amigos.

A los **docentes** que me han acompañado durante el largo camino, brindándome siempre su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos y afianzando mi formación.

A la memoria de mis perros que siempre estuvieron conmigo y a todos los animales que existen en el mundo pero sobre todo aquellos que nos permiten aprender de ellos, por ser ángeles del ser humano, por ser tan nobles y los únicos en equilibrio con el mundo, muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS:

A la hermosa **UNAM** quien me adoptó en la **FESC** como parte de su familia en donde aprendí que es un privilegio ser de sangre azul y piel dorada. Gracias a todos los catedráticos quienes me formaron y sobre todo al M.SC. **RAÚL ARTURO MAR CRUZ** quien ha asesorado éste trabajo y quien ha forjado parte de mi formación personal, profesional y confiar en mi.

Al Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (**CENASA**), a los departamentos de Constatación de Vacunas y Reactivos, Virología y Desarrollo de Biológicos, quienes facilitaron y apoyaron la realización de este trabajo con asesoramiento técnico, apoyo moral pero sobre todo por la amistad otorgada a un servidor y gracias por hacerme sentir parte de este gran grupo de trabajo pero sobre todo por hacerme sentir como su familia. A directivos como M.V.Z **Joaquín Delgadillo Álvarez** y a M.V.Z. **Marcela Mercado Pezzat** quienes me brindaron su confianza, a todo el personal del centro quienes me han apoyado con su conocimiento pero sobre todo con su compañerismo. Cabe resaltar que doy gracias a la vida por haberme permitido conocer, aprender y compartir este trabajo y mi vida personal con mis dos grandes asesores M.V.Z. **ÁNGEL MIRANDA SÁNCHEZ** y al M.V.Z. **FELIPE DE LA O RAMÍREZ**, quienes sin duda me han apoyado y han tenido mucha paciencia desde inicio a final del trabajo. Por ser grandes, humildes como personas, sabias, que son unas figuras a seguir, por su profesionalismo, por su gran ética y por ser parte de mi vida tanto profesional como personal, muchas gracias.

A mi otra gran familia que son mis padres, hermano y **Diana** quien ha estado apoyándome desde antes que iniciara con este gran proyecto, que sin su apoyo no hubiera podido ser realizado dándome su amistad incondicional y cariño en todo momento; y a la familia **Quintal Ramos**.

Gracias a toda la familia **González** quien siempre me ha apoyado en los momentos buenos y malos, brindándome amor y cariño, haciéndome crecer como persona.

También doy gracias a mis hermosas **Kitana** y **Stacy** por pasar esas horas de desvelo, brindando el calor de su presencia mientras yo leía a la hora de hacer la tarea desde que entre en la carrera y hacerme compañía todos los días.

El autor da el consentimiento a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis este disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

Edgar Omar Valera González

NOMBRE Y FIRMA DEL AUTOR

ÍNDICE

Resumen.....	II
Introducción.....	1
Objetivos.....	16
Hipótesis.....	16
Materiales y Métodos.....	17
Resultados	28
Discusión.....	34
Conclusiones.....	36
Referencias bibliográficas.....	38
Glosario.....	43
Abreviaturas.....	44
Anexos.....	45

Índice

Índice de cuadros

		Págs.
Cuadro No 1	Número de focos registrados de IBR en México en el periodo 2006-2010.	5
Cuadro No 2	Resumen sobre la enfermedad de IBR según la OIE presente en México en el periodo de 2005 – 2010.	6
Cuadro No 3	Sensibilidad de las diferentes técnicas para la detección de anticuerpos (mg/ml)	10
Cuadro No 4	Cálculo de DICT _{50%} por el método de Sperman-Karber.	19
Cuadro No 5	Resultados de los sueros en el sangrado previo a la inoculación de los animales en donde fueron evaluados por la técnica de SN.	20
Cuadro No 6	Cálculo de las dosis teóricas para obtener el virus de trabajo para trabajar la SN.	24
Cuadro No 7	Título de Ac medidos por la prueba de SN en conejos.	28
Cuadro No 8	Evaluación de Ac medidos por la prueba de SN en cabras.	28
Cuadro No 9	Evaluación de Ac medidos por la prueba de SN en borregos.	28
Cuadro No 10	Grado de intensidad tintorial específica y tinción no específica en el conjugado policlonal basados en la OMS y la NOM-035-ZOO-1996.	32

Índice

Índice de figuras

		Págs.
Figura No 1	Distribución mundial de IBR, datos de la OIE.	6
Figura No 2	Medición de Ac en borregos mediante la prueba de SN.	29
Figura No 3	Medición de Ac en conejo mediante la prueba de SN.	29
Figura No 4	Medición de Ac en cabras mediante la prueba de SN.	30
Figura No 5a	Evidencia de los registros diarios de temperatura por vía rectal.	31
Figura No 5b	Evidencia de los registros diarios de temperatura por vía rectal.	31

Índice

Índice de esquemas

		Págs.
Esquema No 1	Procedimiento técnico para hacer las diluciones para la titulación del virus.	18

II RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un protocolo de inoculación en 3 diferentes especies: ovinos, caprinos y conejos; inoculando una cepa viral estandarizada de catálogo y otra cepa de campo aislada en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA), ambos virus fueron purificados previamente. La evaluación de la concentración de anticuerpos fue realizada por la técnica de seroneutralización y hasta notar un suero alto esperado. La conjugación de las inmunoglobulinas del tipo IGg, se hizo siguiendo una técnica japonesa utilizando FITC (isotiocianato de fluoresceína), realizando algunas modificaciones de acuerdo a la infraestructura con que se cuenta en estos procedimientos experimentales. El conjugado fue titulado de acuerdo al procedimiento de la OMS, obteniendo resultados satisfactorios, resultando una dilución de trabajo de 1:512. Los resultados obtenidos permiten establecer que el conjugado es estable y que puede ser utilizado como una técnica complementaria para diagnóstico de la enfermedad de IBR y ser utilizada en aislamientos virales observándose una buena especificidad y sensibilidad del colorante de este mismo. En la obtención del suero positivo no necesariamente tiene que ser un título tan alto como marca la literatura (1:5000 o inclusive 1:10 000), ya que en este ensayo se obtuvo un buen conjugado, con una concentración de 1:512 en el conjugado para IBR.

Durante la elaboración del conjugado se obtuvo una cantidad considerable de suero positivo, para su utilización en la prueba de seroneutralización para el diagnóstico de la enfermedad de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), en el laboratorio de virología del CENASA, éste ha sido utilizado como un suero de control positivo en la prueba que se realiza en diferentes muestras que llegan día con día al laboratorio para diagnóstico de la IBR.

Palabras claves: Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, inmunofluorescencia, conjugado, inmunoglobulinas.

III ABSTRACT

In the present work, a protocol inoculation in 3 different species: sheep, goats and rabbits; inoculating strain catalog and other field strain isolated in the National Centre for Animal Health Diagnostic by its Spanish acronym (CENASA), both viruses were previously purified. The evaluation of the concentration of antibodies was performed by the technique of neutralization and to notice a high serum expected. The conjugation of immunoglobulins of the IgG, was made following a Japanese technique using FITC, making some modifications according to the infrastructure that are available in these experimental procedures. The conjugate was entitled according to WHO procedure and where the results were satisfactory, obtaining a working dilution of 1:512. The results obtained allow the conjugate to be stable and can be used as a complementary technique for diagnosis of disease and be used for IBR virus isolates showing very good specificity and sensitivity of the dye of the same.

In obtaining positive serum need not be as high as a degree mark literature as is the case or even 1:5000 1:10 000, since in this case a good conjugate was obtained with a concentration of 1: 512 conjugate to the IBR.

During the preparation of conjugate produced a considerable amount of positive serum for use in the serum neutralization test for the diagnosis of disease IBR (IBR) in CENASA virology laboratory, it has been serum used as a positive control in the test performed on different samples that arrive every day to the laboratory for diagnosis of IBR.

Keywords: infectious bovine rhinotracheitis, immunofluorescence, conjugated, immunoglobulins.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Descripción de las enfermedades infecciosas de origen viral.

El concepto infección del latín *inficere*: poner dentro. Enfermedad puede ser definida como una función anormal de alguna estructura o sistema dentro de nuestro cuerpo (**Figuroa *et al.*, 1984**).

Enfermedad infecciosa se define como una alteración de la homeostasis natural, manifestándose clínicamente como una infección provocada por la introducción y acción de un virus y posee el potencial de ser transmitida. Las enfermedades son provocadas para la propagación de sus genes llámese virus, bacterias, parásitos, hongos, rickettsias, clamidias, micoplasmas, priones. Los virus son agentes submicroscópicos capaces de crecer en una célula viva. Los virus están constituidos por ácido desoxirribonucleico (ADN), y en otros ácido ribonucleico (ARN). Los virus carecen de estructura celular y de capacidad de obtener energía y efectuar la biosíntesis, por lo que para su multiplicación utilizan la reserva energética y la capacidad biosintética de las células que parasitan. (**García *et al.*, 2010; Roitt *et al.*, 2010; Shors 2009; Prats 2007**).

1.2 Importancia de las enfermedades infecciosas.

La importancia de las enfermedades infecciosas recae en que son muy frecuentes en la población y cuando éste último está inmunodeprimido, puede causarle la muerte por la infección (**García *et al.*, 2010**).

1.2.1 Importancia de la IBR.

La importancia de esta enfermedad radica en su alta latencia en la ganadería ya que los portadores tienen la capacidad de eliminar al virus en forma intermitente y que este se puede reactivar bajo ciertos estímulos y que lo más probable es que sea durante toda la vida del animal y es detonado normalmente por el estrés. El ganado afectado es muy numeroso y no importa las condiciones de la explotación ya sea intensivo, semi-intensivo o extensivo, son afectados por la IBR y con mayor importancia provocando grandes pérdidas

económicas por hembras que abortan, baja de la producción, infertilidad y en menor importancia muertes (**Zapata et al., 2002; Trinidad 2010**).

La IBR ha sido diagnosticada en los EUA, Perú, Gran Bretaña, Alemania, Nueva Zelanda, Australia, Sudáfrica, Tanzania y Japón (**Correa 1981**). El virus de HVB-I esta difundido mundialmente y se han encontrado datos de la prevalencia de algunos países por ejemplo: en la India tiene una prevalencia de 19%. Al norte de Tailandia se reporta una positividad del 67%. En Argelia la incidencia fue del 20.5%. En Finlandia se tiene una prevalencia de 10-50% e incluso podría ser más, y en Australia puede ser que hasta el 96% de los toros y 52% de las vacas sean positivas. Por otra parte en Andalucía, España se reportó una incidencia de 45.7%. En ganado para carne de Canadá la prevalencia es de 20.4%. En Colombia se reportó una seroprevalencia de 51.7% para la región del Caribe, un 21.5% para la región Andina y un 20.6% para la región del pie de monte llanero. Aunque para el municipio de Montería, Colombia notificó una prevalencia del 74.7%, según (**Vera et al., 2006; Trinidad 2010**).

La IBR está actualmente tan difundida, que es muy peligroso mover el ganado a través de canales de comercialización sin que exista una gran posibilidad de que el ganado susceptible se infecte; dichos canales de movimiento de ganado serán ferias, exposiciones, subastas y programas de mejoramiento genético, así como traslados con fines comerciales. Los animales persistentemente infectados difunden la enfermedad a través de sus fluidos corporales, éstos son el más eficiente medio y la fuente de infección más importante en los hatos (**Ávila et al., 2008; Vera y Betancur, 2008**).

Una de las formas más importantes para el control de la enfermedad en un hato, será el identificar y desechar a esos reservorios persistentemente infectados y una vez que éstos son removidos de los hatos, el rango de seroprevalencia del IBR y el nacimiento de becerros persistentemente infectados puede disminuir a cero a no ser que el virus sea reintroducido (**Ávila et al., 2008**).

Los estudios epidemiológicos en México han sido realizados principalmente para determinar la incidencia de enfermedades, proporción de animales enfermos en una población durante un periodo determinado (**García 1990**).

En México, fue diagnosticada en 1971 y a la fecha se ha aislado virus de IBR a partir de bovinos con signos que hacían sospechar de esta enfermedad, correspondientes a

datos de diferentes partes de la República Mexicana. También se han encontrado anticuerpos neutralizantes contra IBR en bovinos del DF, Edo. de México, Puebla y Yucatán (**Correa 1981; Ramos y Gómez, 1984; OIE 2013**).

Según **Pfizer en el 2000** el 53.35% de animales positivos fue de n=1,179 para la enfermedad de IBR provenientes de 120 ranchos de los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Chiapas y Yucatán.

En diferentes estudios se han tenido datos de algunos estados como por ejemplo: en Michoacán tiene una seroprevalencia del 22%, la Comarca Lagunera fue la zona con mayor reactores positivos de 84%, Hidalgo con 19%. En Veracruz indica que la prevalencia general es de 58.6% y que el 75% corresponde al ganado lechero, el 65.5% al cebú y el 82.9% a vacas de más de cinco partos. En estudios de diferentes estados en particular se ha reportado que en Yucatán la seroprevalencia del virus HVB-1 es de por lo menos 5%, en Querétaro la prevalencia fue notificada como un 90% en el ganado lechero, en Michoacán se demostró una prevalencia del 3.4%, en otro estudio de ganado de carne en Yucatán se demostró una prevalencia de 54.4%, otro estudio notificó una seroprevalencia del 13.66% para IBR, en el altiplano de la República Mexicana se determinó la prevalencia de IBR obteniendo un 65.5% y en el estado de Veracruz se reportó una prevalencia de 44.19% (**Trinidad 2010; Magaña A et al., 2005**).

Los siguientes datos nos dan un panorama de la importancia de la enfermedad en los países del continente americano con las siguientes respuestas al cuestionario sobre aspectos de diagnóstico y control de la IBR en la OIE: La mayoría de los países americanos que respondieron afirman considerar que la IBR/VPI tienen una importancia entre mediana y elevada para sus ganaderías nacionales. Siete de diez países declararon practicar la vacunación para controlar tanto la IBR/VPI, mientras que tres declararon no vacunar contra la enfermedad. Cuatro países indicaron tener restricciones en cuanto al tipo de vacunas cuyo uso está permitido, prohibiéndose específicamente las vacunas vivas para la IBR/VPI. Ninguno de los países usa vacunas marcadoras y ninguno ha adoptado programas de erradicación. Dos informaron estar planeando la iniciación de programas de erradicación de en el futuro próximo (uno a tres años). La mayoría de países opina que es importante que se dedique mayor esfuerzo de investigación a la IBR/VPI. Siete de diez países declararon tener una preferencia en cuanto a la prueba (NV o ELISA) usada para la detección de

anticuerpos de HVB-1 para la importación; cuatro prefieren la prueba NV y tres la ELISA (OIE Deregt 1998).

1.2.2 Etiología de la IBR.

La IBR es producida por el herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1), género Herpesvirus, familia Herpesviridae que, como el resto de los géneros de la subfamilia Alphaherpesvirinae (Simplexvirus y Varicellovirus) a la que pertenece, se caracteriza por poseer un alto rango de hospedadores, un ciclo reproductivo corto, rápida propagación en cultivos celulares y la capacidad para establecer infecciones latentes (Muylkens *et al.*, 2007; Bracho A 2002).

La infección aguda con BHV-1 lleva a cuadros de conjuntivitis, traqueítis, infecciones del tracto respiratorio superior y puede producir un complejo respiratorio conocido como fiebre de embarque (Reyes *et al.*, 2004).

La historia natural de la enfermedad de BHV-1 y de la IBR en particular, indica que las manifestaciones clínicas han variado a través del tiempo y la gravedad de los enfermos, cambia de un país a otro; esta dinámica tal vez se deba al manejo, a la patogenicidad de las cepas virales y a la asociación sinérgica con otros agentes infecciosos (Barrera *et al.*, 2005; Moraga *et al.*, 1987).

El BHV-1 establece una infección latente, de por vida en neuronas ganglionares como es el caso de el ganglio trigémino o sacro dorsal. El virus puede permanecer en fase de latencia en donde espera condiciones adecuadas para su replicación y diseminación en situaciones asociadas a trauma, estrés e inmunodepresión. La seroprevalencia mundial varía desde el 14 hasta el 96% (Reyes *et al.*, 2004).

El virión está formado por una doble cadena lineal de ADN con 135.000-140.000 pares de bases. El genoma está compuesto por un segmento largo (UL) y un segmento corto (US) (Muylkens *et al.*, 2007; Schynts *et al.*, 2003). La cápside es icosaédrica y con una envoltura lipídica con proyecciones en forma de espículas. El diámetro varía entre los 150-200 nm (USC 2013). A medida que los equipos de investigación se fueron perfeccionando, se pudieron estudiar las principales proteínas.

Se han identificado 38 proteínas estructurales y entre 5 y 15 no estructurales. Las proteínas estructurales más destacadas, son las 5 gp (gB, gC, gD, gE y gG), que están

implicadas en todos los estadios de la infección. Las gB, gC y gD producen respuesta inmunitaria. Así la gB provoca la formación temprana de Acs neutralizantes mientras que en la gC y gD dicha respuesta es más tardía y variable (USC 2013).

Mediante el análisis de endonucleasas de restricción se establecieron 3 subtipos (1, 2 (a, b) y 3) que se diferencian por la presencia de uno o varios epitopos. Parece probado que el subtipo 1 se excreta en títulos más altos y se disemina con más eficacia. Aunque los subtipos 1 y 2a se suelen asociar con las formas respiratorias, el 2b con las formas reproductivas y el subtipo 3 con encefalitis, las formas de presentación, podrían estar más relacionadas con la vía de entrada, que con el subtipo (USC 2013).

Este tipo de virus también cuenta con una cápside con isometría icosaédrica de alrededor de 100 nm de diámetro compuesta de 162 capsómeros (150 hexámeros y 12 pentámeros). La cápside está rodeada por una capa de material globular, conocido como tegumento, y alrededor de él, una envoltura que contiene las espículas de glicoproteínas virales en su superficie (Carter *et al.*, 2005; Kahrs 2001).

1.3 Situación de la IBR en México según el SIVE en el periodo de 2006 a 2010.

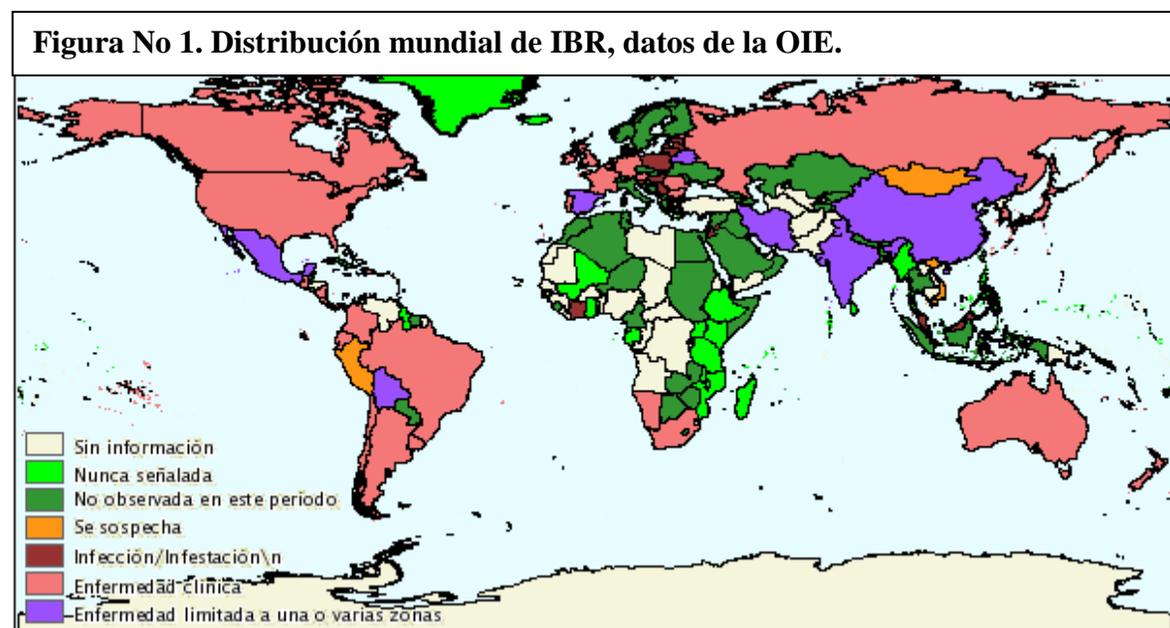
Cuadro No 1. Enfermedades de los bovinos reportadas por el SIVE en el periodo de 2006 a 2010.					
Enfermedad	No de focos				
	Año 2006	Año 2007	Año 2008	Año 2009	Año 2010
Anaplasmosis bovina	180	471	8	175	220
Babesiosis bovina	95	137	5	34	11
Brucelosis (Brucela abortus)	1668	5511	1188		4391
Carbunco bacteriano	7			3	
Diarrea viral bovina	72	300	55	295	433
Lengua azul			2	1	
Leucosis bovina enzoótica				1	
Rinotraqueitis infecciosa bovina	145	449	99	311	470
Tuberculosis bovina	42	31	400	311	937

Buscando información sobre la situación de la IBR en México, se encontró la información registrada en la página web de la OIE en donde se toman los registros del 2005 al 2010 en el siguiente cuadro (Cuadro No 2) y además podemos encontrar en cada año el número de casos y muertos.

Cuadro No 2. Resumen sobre enfermedad de IBR según la OIE presente en México en el periodo de 2005 a 2010. (WAHID Interface - OIE World Animal Health Information Data base)								
Año	Serotipo (s)	Total de focos	Especies	Medidas de control	Unidades de medida	Susceptibles	Casos	Muertos
2005	No	235	Bov	*QFM GSu Qi Cr Cn	Animales	-	1161	
2006	No	145	Bov	*QFM GSu Qi Cr Cn	Animales	-	1693	
2007	No	449	Bov	*QFM GSu Qi Cr Cn	Animales	66106	2166	29
2008	No	99	Bov	*QFM GSu Qi Cr Cn	Animales	176456	285	
2009	No	311	Bov	*QFM GSu Qi Cr Cn	Animales	39941	17	
2010	No	470	Bov	*QFM GSu Qi Cr Cn	Animales	68647	1539	14

QF- Medidas de control en puestos fronterizos. M- Seguimiento epidemiológico. GSu- Vigilancia de rutina. Qi- Restricción de los movimientos en el interior del país. Cr- Control de animales silvestres reservorios de agentes patológicos. Cn- Control de vectores invertebrados (artrópodos).

1.3.1 Situación de la IBR a nivel mundial según la OIE en el 2012.



1.4 Disminución en la producción y problemas económicos.

En el caso específico de los animales de producción, las repercusiones económicas son grandes ya que en la mayoría de los animales causan ausencia o incapacidad de su potencial genético reflejado en producción de carne, y subproductos, etc. Y en el peor de los casos les produce la muerte. La trascendencia económica también es reflejada en el costo por atención médica que incluye en honorarios por los médicos, medicinas, laboratorios, etc. Aumento de su frecuencia en enfermos inmunocomprometidos y teniendo un problema de nunca acabar hasta su control, prevención y erradicación de cada hato **(Anderson y May, 1982)**.

1.4.1 Disminución en la producción y problemas económicos por IBR.

La IBR es asociada a abortos cuando se da la infección por primera vez en animales gestantes. Existen formas genitales conocidas como vulvovaginitis pustular infecciosa (VPI) y balanopostitis pustular infecciosa (BPI), asociada a infertilidad temporal en vacas. Además, este agente puede producir conjuntivitis, metritis, mastitis y formas diseminadas en terneros, y hasta hace poco se describían formas encefálicas; sin embargo este último cuadro clínico es dado por ahora con el HVB – 5. Es importante el diagnóstico de esta enfermedad, ya que trae como consecuencia grandes pérdidas en la producción y por lo tanto económicas **(Rodríguez *et al.*, 2009; Vera *et al.*, 2006)**.

Desde el punto de vista económico aún no ha sido evaluada completamente pero se ha calculado que en un período de diez años se remueve el 18% del hato por enfermedades infecciosas, de las cuales una manifestación importante es el aborto **(Bracho A 2002)**. La alta prevalencia de la infección por el Virus de la IBR en las explotaciones, y el impacto que ello significa para la eficiencia reproductiva y económica, hacen que las medidas de control de IBR sean de creciente relevancia para los profesionales veterinarios **(Vera *et al.*, 2006)**.

1.5 Riesgos epizootiológicos y problemas de salud pública.

La vigilancia epizootiológica comprende la evaluación sistemática y continua de los cambios que se operan en el proceso de salud – enfermedad de las poblaciones animales, tratando ante todo de detectar a tiempo cualquier modificación del estado de salud y factores que influyen sobre la misma (**Lazo *et al.*, 2010**).

En cuanto al ganado doméstico las especies más frecuentes en nuestro entorno ganadero son: vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos, donde según (**Cleaveland *et al.*, 2001**) establece que entre los grupos de microorganismos aproximadamente 25% para bacterias, 35% helmintos, 9% hongos, 18% virus y el 13% protozoos. Aproximadamente el 39% de los 616 patógenos del ganado incluye a la especie humana entre sus hospedadores potenciales y más del 40% son comunes tanto al hombre como al ganado y a los animales salvajes.

Briones *et al.*, 2006 establece que un factor esencial a tomar en cuenta es la gran capacidad de mutación de los virus en comparación con bacterias, hongos, helmintos y protozoos y sus tiempos de generación extremadamente cortos, lo que les permite, en conjunto, una adaptación muy rápida a nuevos nichos ecológicos. En particular, los virus ARN, de estructura generalmente más sencilla y mayor capacidad de mutación, son los que presentan la más alta probabilidad de infectar nuevos hospedadores y son, de hecho, los que con más frecuencia pueden infectar tanto mamíferos como aves, lo que sugiere una mayor habilidad para atravesar las barreras de especie y hasta de orden. Otro elemento crucial que debe ser tenido en cuenta es el mecanismo de transmisión y su influencia potencial en la capacidad de un patógeno para adquirir la condición tanto de zoonótico como de emergente (**Cleaveland *et al.*, 2001; Briones *et al.*, 2006**).

1.5.1 Epizootiología de la IBR.

El HVB-1 es un importante patógeno de los bovinos, ya que después de la infección primaria el virus tiene la capacidad de permanecer en estado de latencia. La reactivación y la excreción está asociada con la disminución de la inmunidad del animal, usualmente como consecuencia de cambios de las condiciones de manejo, concentraciones altas de

animales, celo, parto y movilización, lo que explicaría la aparición de la enfermedad donde la fuente de infección no es evidente (**Obando 2006**).

1.6 Diagnóstico de enfermedades infecciosas de origen viral.

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas se puede hacer por el aislamiento que es utilizado de forma rutinaria siempre y cuando sea necesario y no sea de gran importancia un diagnóstico rápido, pruebas serológicas como seroneutralización (SN), ELISA, Inmunofluorescencia, Hemoaglutinación (HA) e inhibición de la hemoaglutinación (IHA), peroxidasa, etc (**Carter y Saunders, 2007; Cunningham 1960**).

1.6.1 Pruebas serológicas empleadas en virología.

Las pruebas serológicas para el diagnóstico en el laboratorio ofrecen pros y contras sobre la especificidad y sensibilidad. Entre ellas existe la precipitación, inmunodifusión, Inmunoelectroforesis, aglutinación, inhibición de la aglutinación, fijación del complemento, ELISA, inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, seroneutralización, etc. Estas pruebas son las más utilizadas en el laboratorio (**Pfizer 2000; Morilla A y Bautista C, 1986; Rodríguez y Tamez, 2010; Roitt 2011**).

Las diferencias de sensibilidad, especificidad, capacidad de utilización a gran escala, etc. son algunos de los conceptos más importantes a la hora de seleccionar una u otra técnica. Así, respecto a la sensibilidad podemos observar que hay técnicas con niveles bajos como las de precipitación, de sensibilidad media como las aglutinación bacteriana, fijación de complemento y otras de sensibilidad mayor como el ELISA, la seroneutralización e inmunofluorescencia. La especificidad y sensibilidad de las principales pruebas utilizadas en el laboratorio de virología están en el siguiente cuadro comparativo. (**Sánchez J 2005**).

Cuadro No 3. Sensibilidad de las diferentes técnicas para la detección de anticuerpos (mg/ml)	
MÉTODO	SENSIBILIDAD (mg/ml)
Precipitación en gel	30
Precipitación en anillo	18
Aglutinación bacteriana	0.05
Fijación de complemento	0.05
Hemaglutinación pasiva	0.01
Inhibición de la hemaglutinación	0.005
Inmunofluorescencia	0.005
ELISA	0.0005
Neutralización	0.00005

1.6.2 Diagnóstico de la enfermedad de IBR.

El diagnóstico del virus se puede hacer por las técnicas establecidas según (OIE 2013, Vera *et al.*, 2006; Moraga 1987, Vera y Betancur, 2008; Morilla A y Bautista C, 1986) como son el aislamiento, SN, ELISA, inmunofluorescencia, peroxidasa etc.

1.6.3 Aislamiento.

El aislamiento de virus tiene una sensibilidad y una especificidad muy alta, debido a que sólo se amplifica el virus; la técnica se puede consultar en las publicaciones de los siguientes autores (OIE Pearson, 1998; Carter y Saunders, 2007; Cunningham 1960).

1.6.4 Pruebas serológicas.

Las técnicas inmunológicas pueden utilizarse tanto para la detección de antígenos (métodos directos), como de anticuerpos (métodos indirectos). En el caso de detección de antígenos, se utiliza un anticuerpo específico antiviral (por lo general IgG) a cuya fracción

cristalizable (Fc) se ha conjugado una molécula marcada, que puede ser isotiocianato de fluoresceína en caso de inmunofluorescencia, o una enzima: peroxidasa, fosfatasa alcalina, o biotina-avidina (EIA), para hacer evidente la reacción. Para el procedimiento indirecto (detección de anticuerpos), se emplea un anti-anticuerpo marcado y la reacción se realiza sobre un cultivo celular infectado por el virus en estudio (**Carter *et al.*, 2005; Rodríguez y Tamez, 2010; Morilla A y Bautista C, 1986**).

1.6.4.1 Pruebas serológicas para la detección de la IBR.

Las pruebas serológicas para la detección de IBR se pueden utilizar para diferentes fines en un hato o bien a nivel estado, país o en situaciones internacionales para la exportación e importación de ganado y se pueden sintetizar en los siguientes puntos:

- Para diagnosticar una infección aguda: se examinan en una prueba muestras de suero de las fases agudas y de convalecencia de la infección en los mismos animales.
- Para demostrar la ausencia de infección, por ejemplo, con relación al mercado internacional.
- Para determinar la prevalencia de la infección en estudios seroepidemiológicos.
- Para apoyar programas de erradicación y el control subsiguiente.
- Para propósitos de investigación, por ejemplo, la evaluación de la respuesta de anticuerpos después de la vacunación y de una infección de desafío.

Para detectar anticuerpos contra el BHV-1 en el suero se emplean normalmente pruebas de neutralización vírica (NV) o también llamada seroneutralización (SN) y varios tipos de ELISA. Una prueba serológica alternativa es la inmunofluorescencia indirecta (**Schipper y Chow, 1968**).

Las únicas excepciones a esto son los terneros jóvenes que han adquirido de modo pasivo los anticuerpos por el calostro de sus madres y el ganado no infectado, vacunado con vacunas inactivadas.

Los métodos ELISAs, incluyendo el gE-ELISA, se utilizan cada vez más para detectar anticuerpos en muestras de leche entera, pero presentan algunas limitaciones. Una

prueba e leche negativa indica que menos del 20% de los adultos de la población lechera posee anticuerpos contra BHV-1.

Las pruebas de SN es prescrita para el comercio internacional y se llevan a cabo con varias modificaciones dependiendo del procedimiento a seguir (**Eernisse y Erickson, 1990; OIE Pearson 1998; Burleson *et al.*, 1992**).

Enzimoimmunoensayo (ELISA). Es una prueba prescrita para el comercio internacional. Existen diversas preparaciones comerciales ELISA, para detectar antígeno o anticuerpos y muchas de las cuales son también adecuadas para detectar anticuerpos en la leche. Por razones de estandarización en un país o estado, sería deseable comparar la calidad de las preparaciones comerciales y probar cada lote respecto a criterios definidos previamente en un laboratorio nacional de referencia, antes de su uso en otros laboratorios del país (**OIE Person 1998; Navarrete *et al.*, 2004**).

1.6.4.2 Inmunofluorescencia.

En la prueba de inmunofluorescencia directa, el antisuero monoespecífico se conjuga con isotiocianato de fluoresceína, mientras que en el procedimiento indirecto es el segundo anticuerpo contra la inmunoglobulina bovina el que se conjuga al isotiocianato de fluoresceína. Para obtener los mejores resultados, se necesita muestrear varios animales procedentes de una población que presenten fiebre y una descarga nasal serosa ligera. El tejido recogido post-mortem se puede analizar para la presencia de antígeno de BHV-1 por la prueba de inmunofluorescencia en secciones o cortes congelados (**Morilla A y Bautista C, 1986; Slim y Elazhry, 1983; Cunningham 1960**).

Detección del ácido nucleico por la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la última década se han descrito varios métodos para demostrar la presencia del ADN del BHV-1 en muestras clínicas, el uso de la PCR en el diagnóstico rutinario está creciendo. En comparación con el aislamiento de virus, la PCR tiene la ventaja principal de que es más sensible y más rápida: puede realizarse en 1-2 días. También puede detectar ADN en ganglios sensoriales con infección latente (**Rodríguez *et al.*, 2009; Zapata *et al.*, 2002; Carter y Saunders, 2007; Vera y Betancur, 2008; Aguilar 1987; Dinter y Morein, 1990; Kahrs 2001**).

1.6.5 Histopatología.

El diagnóstico histopatológico, se refiere al estudio del tejido lesionado y del cual se toma una biopsia o muestra siendo analizado retirado en el microscopio, en el cual observamos las características de las células y que alteraciones que presenta y para dar un diagnóstico definitivo (**Carter *et al.*, 2005**).

1.6.5.1 Histopatología para el diagnostico de la IBR.

Durante la necropsia, se recogen para la detección del virus las membranas mucosas del tracto respiratorio y porciones de las amígdalas, pulmones y ganglios linfoides bronquiales. En casos de aborto, se examina el hígado fetal, los pulmones, el bazo, el riñón y un cotiledón placentario. Las muestras se deben enviar al laboratorio en hielo con la mayor rapidez posible. Al observar el tejido afectado en el microscopio se puede observar una necrosis focal de las membranas mucosas nasales, laríngeas, traqueales o genitales. Cuando el virus se replica causa daño en las células y el animal raciona con una respuesta inflamatoria intensa, que se pueden unir formando grandes pústulas que muestran una infiltración masiva de leucocitos. En fetos abortados, se presentan pequeños focos necróticos en diversos tejidos, particularmente en hígado. El tejido fijado en los portaobjetos se pueden someter a una prueba estándar de inmunofluorescencia directa o indirecta, los frotis deben secarse al aire y se fijan con acetona dentro de las 24 horas. Los frotis de los hisopos nasales del ganado bovino con descargas nasales mucopurulentas o hemorrágicas suelen ser negativos (**Roger 2007**).

1.7 Importancia del diagnóstico correcto y a tiempo.

El diagnóstico es de vital importancia pues con ello se pueden controlar las epizootias en estados tempranos, ya que un apropiado método de diagnóstico nos auxiliará para evitar la propagación de la enfermedad y establecer las medidas preventivas convenientes para prevenir un nuevo brote, o bien, un mejor control en donde el diagnóstico clínico no es sencillo.

1.7.1 Aislamientos geográficos.

El aislamiento geográfico se califica como una buena medida para evitar que se siga diseminando la enfermedad e igualmente podremos reducir el número de animales afectados en un área determinada en donde se controla el ambiente de los animales, siendo en regiones, estados o países, controlando el tráfico de ganado, o la movilización tanto de animales como de productos de áreas libres a áreas infectadas de la enfermedad.

1.8 Bancos de sueros.

En 1959 la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el establecimiento de los bancos de suero. Se forman bancos de sueros humano en Estados Unidos, Sudáfrica y Checoslovaquia. Bancos de suero animal se establecen en: Nueva Zelanda, Australia, Louisiana (E.U.A.) y Reino unido (**Timbs 1979**).

La creación de sueros de referencia positivos y negativos es de gran importancia en México y en el mundo ya que sirven como testigos para las diferentes técnicas de diagnóstico serológicas de las enfermedades de los animales. En México hay diferentes organismos e instituciones que cuentan con los sueros de referencia como bancos y producción de los mismos y es el caso del Laboratorio de seroepidemiología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y los clasifican en: Altiplano: bovinos de los estados de México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Querétaro, Aguascalientes y Durango. Bovinos de lidia del estado de Tlaxcala y Guanajuato. Ovinos del estado de Morelos. Caprinos del estado de Puebla y Querétaro. Trópico: bovinos de los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Chiapas y Oaxaca. Ovinos del estado de Veracruz y Tabasco (**Zapata 2009; Sánchez et al., 1992**).

1.9 Prevención y control de la IBR.

Como medidas de control se pueden seguir las publicadas por (**Obando 2006**) quien establece que hay que comprar animales con certificación de seronegativos a IBR y poner en cuarentena a todos los animales antes de ser introducidos al rancho y si se usa semen que sea con certificación libre de la enfermedad. Cuando en los animales se ha detectado la

seropositividad se analiza la posibilidad de eliminar a los positivos o bien separarlos y que sea gradual, remplazarlos por animales que estén libres de IBR, hacer un estudio para la implementación de la vacunación anual y hacer monitoreo serológico de 1 a 2 veces por año.

La vacunación se usa comúnmente para el control del HVB-1. Ciertos países europeos han iniciado programas de erradicación del HVB-1. Dinamarca y Suiza fueron los primeros países reconocidos como libres de HVB-1 en los rebaños nacionales. Las vacunas convencionales contra el HVB-1 son vacunas de virus vivos modificados (atenuados) y vacunas de virus muertos. Es posible formularlas como vacunas monoagentes o vacunas combinadas contra el HVB-1. Las vacunas de virus vivos modificados están destinadas a reproducirse hasta cierto punto dentro del portador, lo cual aumenta la probabilidad de la inmunidad protectora. Las vacunas de virus muertos generalmente necesitan un refuerzo con el fin de alcanzar la reacción de protección. Estas últimas vacunas se recomiendan frecuentemente para las hembras gestantes (**OIE Deregt 1998**).

Se ha propuesto el uso de vacunas marcadoras en los programas de erradicación cuya primera etapa consiste en una campaña de vacunación intensiva contra el HVB-1. También se ha propuesto su uso en los países interesados en la erradicación del HVB-1 pero que tienen una alta seroprevalencia del virus. Lo que se intenta es reducir la transmisión del HVB-1 y permitir la identificación de los animales infectados. Cuando se haya reducido la seroprevalencia del HVB-1 de campo, será posible iniciar un programa de prueba y de apartamiento de los animales seropositivos. El paso final es la suspensión de las vacunaciones (**OIE Deregt 1998**).

2. Objetivo general.

Desarrollar un conjugado fluorescente con isotiocianato de fluoresceína por la técnica directa para el diagnóstico de IBR.

2.1 Objetivos particulares.

- Obtener un suero positivo para el diagnóstico de la enfermedad de IBR por la técnica de seroneutralización.
- Implementar la prueba de inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de IBR.

3. Hipótesis.

La producción de un conjugado y su utilización en el diagnóstico de IBR en el laboratorio facilitará el conocimiento de la prevalencia o comportamiento de esta enfermedad en México.

4. Materiales y métodos.

4.1 Obtención del virus de IBR.

El virus para inocular los animales fue obtenido de American Type Culture Collection (ATCC) en donde certifican la trazabilidad y pureza del virus IBR cepa Colorado -1 (Cooper 1). Este último fue atenuado por medio de pases en cultivo celular en la línea de células de cornete bovino (BT) y posteriormente adaptadas por pases celulares a la línea MDBK.

La cepa de campo fue obtenida por un aislamiento de hígado y pulmón de feto y adaptada a la línea celular MDBK e identificada como Técamac-121208.

4.2 Titulación viral.

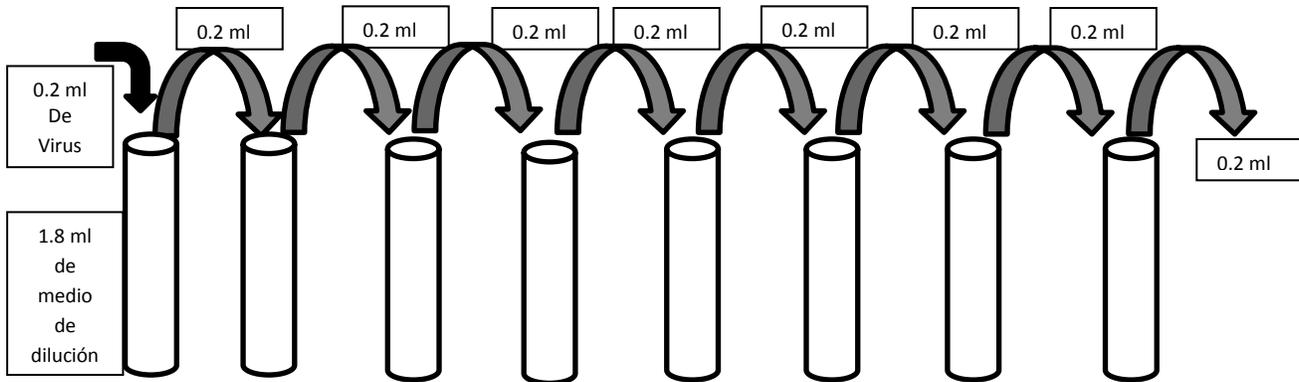
La titulación de los virus se realizó con células en suspensión o cuando el monoestrato tenía una confluencia del 80 al 90%, la concentración celular varia dependiendo del virus que se esta trabajando. Para este trabajo se utilizó células MDBK a una concentración de 3×10^4 y esta puede variar según el virus que se esté trabajando ver en el anexo No 10. La técnica de titulación viral se hizo en la cepa de catálogo y de campo con el siguiente procedimiento:

- a) Se preparó 12 ml de células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) en suspensión para la siembra de la microplaca de 96 pozos con 100µl por pozo.
- b) Se sembró 100µl de suspensión celular MDBK en toda la microplaca y se infectó con diluciones Log base 10 del virus, con 10 pozos e inoculó con 50µl por cada una de las diluciones.
- c) Se metió a incubar a la estufa a 37°C con el 5% de CO₂ durante 5 a 7 días.
- d) Se observó cada 24 horas la microplaca y se le dio seguimiento hasta hacer lectura en el día 5.

De forma esquemática se puede observar en el esquema No 1. La realización de las diluciones logarítmicas base 10, en donde como medio de dilución se ocupó MEM 1.8 ml

en cada tubo de 13 X 100 mm y donde se depositó 0.2 ml de virus, solo en el primer tubo y a partir de este último se hizo una transferencia de 0.2 ml al resto de los tubos, conteniendo al final todos los tubos 1.8 ml como volumen final.

Esquema No 1. Procedimiento técnico para hacer las diluciones para la titulación del virus.



Se puede observar la lectura a los 5 días de la microplaca y el cálculo fue realizado por el método de Sperman-Karber (OIE 2013). Se toma como ejemplo de lectura e interpretación de la titulación viral, que se utilizó como virus de trabajo en la SN en el cual se observa las diferentes diluciones y las columnas de control celular, véase en el cuadro No 4 en donde los 10 pozos de la fila (A, B y C) son positivos a ECP, por lo tanto cuentan como una unidad y en donde cada pozo es igual a 0.1 de la unidad, como en la fila (D) en donde tenemos 0.2 de la unidad, lo que sería igual a $3.0 + 0.2 = 3.2 + 0.5$ del factor de corrección = $3.7 + \text{el Log de } 20 = 1.3$ lo que sería igual a: $3.7+1.3 = 5.0 \text{ DICT}_{50}/\text{ml}$. No importa en cuantos pozos inoculemos cada dilución del virus, porque siempre se va a dividir el número total de pozos entre 1 para obtener el valor de cada uno. . Es importante resaltar que el volumen con el que se inoculó fue de 50µl para la titulación del virus y que varía con respecto a otros procedimientos en la literatura vigente, el inóculo puede ser de diferente volumen pero el resultado debe ser el mismo, debido al procedimiento de los cálculos matemáticos para llegar al resultado.

Cuadro No 4. Cálculo de dosis infectiva de cultivo de tejido (TCID₅₀%) por el método de Sberman-Karber.													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10⁻¹	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Control	Control
10⁻²	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
10⁻³	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Monoestrato	Monoestrato
10⁻⁴	D	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-		
10⁻⁵	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Celular	Celular
10⁻⁶	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
10⁻⁷	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Intacto	Intacto
10⁻⁸	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Todas las cepas virales se mantienen en un rango de temperatura de -70 a - 80°C o en nitrógeno líquido. Cuando los virus se van a trabajar, se descongela en un recipiente con agua a 37°C, después se manejan en baño de hielo y dentro de la cabina de bioseguridad tipo 2.

4.3 Animales de experimentación:

Se realizó una selección de diferentes especies animales con el fin de averiguar cuál puede tener la respuesta inmune más alta ante la cepa identificada y de catálogo del CENASA, y otra cepa de campo aislada e identificada Tecámac-121208 en el mismo centro. Las especies utilizadas comprenden 3 grupos de animales en las cuales se encuentran: cabras, borregos y conejos.

Se colectó 10 ml de sangre por punción de la vena yugular para los ovinos y caprinos y en el caso de los conejos 3 a 5 ml por punción cardiaca; mediante jeringas de 10 ml con aguja de calibre 20 x 25, se quitó la aguja y se dejó que la sangre fluya suavemente deslizándose por las paredes del tubo vacutainer de 13x100 mm con tapón convencional siliconado hemorrepeleante, evitando la luz directa del sol. Una vez terminado se inclinaron a 30° aproximadamente en una superficie plana, por 15 a 30 minutos. Todos los tubos se marcaron previamente con la identificación del animal.

Previo a iniciar el esquema de inoculación se verificó que los animales fueran negativos a anticuerpos contra las enfermedades virales más comunes en bovinos, los resultados a la prueba de SN se observan en el cuadro No 5. Los resultados indicaron que fueron negativos.

Cuadro No 5. Resultados de los sueros en el sangrado previo a la inoculación de los animales en donde fueron evaluados por la técnica de SN.				
Identificación de los animales	IBR	PI3	DVB	BRSV
Conejo 1	-	-	-	-
Conejo 2	-	-	-	-
Conejo 3	-	-	-	-
Conejo 4	-	-	-	-
Cabra 1	-	-	-	-
Cabra 2	-	-	-	-
Borrego 2	-	-	-	-
Borrego 3	-	-	-	-
Borrego 4	-	-	-	-
Borrego 5	-	-	-	-
Borrego 6	-	-	-	-
Borrego 12	-	-	-	-

4.4 Elaboración de suero hiperinmune:

Para la elaboración del suero hiperinmune se utilizó virus de la enfermedad de IBR, obtenido de catálogo ATCC y otro de una cepa de campo Tecamac-121208, también se utilizaron 4 conejos de la raza Nueva Zelanda con un peso mayor a 2 kg, 6 ovinos de raza criolla de entre 1 y 4 años de edad, pesando entre 30 a 55 kg y 2 caprinos criollos de 3 años con un peso de entre 30 a 35 kg.

La inoculación se llevó a cabo de la siguiente manera:

Día 0 (primera inoculación):

Se inoculó a los animales por vía im, la cantidad de 2 ml en los rumiantes (ovinos y cabras), 1 ml en los conejos, 0.5 ml por aspersión vía intranasal en cada fosa nasal, de virus vivo atenuado con título de $10^{10.2}$ DICC₅₀/ml en todas las especies. Todos los animales fueron inoculados el mismo día siempre dentro de un horario de las 10 a las 12 horas, todos los días se les proporcionó alimento y acceso de agua *ad libitum*.

Día 7:

Se hizo una sangría con jeringas de 10 ml y se vació en tubos de vidrio vacutainer con tapón siliconado de 5 a 10 ml de sangre en los rumiantes y de 1 a 3 ml para los conejos, y a partir de este día se hicieron sangrías con intervalos de 7 días entre una y otra, se evaluó los niveles de anticuerpos por la técnica de seroneutralización.

Día 14 (segunda inoculación):

Se inoculó nuevamente a todas las especies de animales con Ag vivo por vía subcutánea e intranasal en la misma dosis antes mencionada.

Día 21:

Se hizo una sangría de 5 a 10 ml para los rumiantes y de 1 a 3 ml para los conejos.

Día 28 (tercera inoculación):

Se inoculó a todos los animales Ag vivo de la cepa de campo con adyuvante completo de Freund (ACF) volumen a volumen (v/v) por vía intradérmica.

Día 35 (cuarta inoculación):

Se inóculo nuevamente como en el paso (I), para una absorción mayor del inóculo esperando que los anticuerpos se incrementen.

Día 42 (quinta inoculación):

Al no tener los resultados esperados se opta por inocular nuevamente con virus cepa de campo más ACF esperando no decaiga el título de anticuerpos por tolerancia inmune.

Día 49 (quinta inoculación):

Los niveles de Ac se mantuvieron igual desde el día 42 y se descartaron las cabras y conejos para seguir con las inoculaciones desde este día, pero se siguió evaluando los niveles de anticuerpos.

Día 56:

Se procedió a hacer una sangría con jeringas de 20 ml con aguja de calibre 18 obteniendo un volumen total de 120 ml para la conjugación.

4.5 Procesamiento del suero.

- a) Se obtuvieron 3 tubos de centrifuga de plástico con tapón de rosca con un volumen de 40 ml cada uno, los cuales fueron protegidos de la radiación solar.
- b) Todos los tubos se metieron a incubar a cuarto estufa a 37°C por 30 minutos para que se libere con mayor facilidad el suero, posteriormente se metió a refrigeración por 30 minutos con la finalidad de que el coágulo se contraiga y se libere el mayor suero posible.
- c) Se sacaron los tubos y se centrifugaron a 2500 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos.
- d) El suero que se obtuvo se filtró con membranas de 45 y 22 μm de diámetro de poro, se hizo un pool de los tubos, se tomaron muestras para titular y se almacenó en refrigeración a 4°C en frasco ámbar para protegerlo de la luz.

4.6 Evaluación del suero.

Se hizo la prueba de SN para la valoración de los anticuerpos del suero obtenido, se procedió hacer lectura a las 72 horas, el título del suero fue de 1:128.

No se logró conseguir un suero con título mayor a 1:1024 como se planeaba, ni conseguir un suero hiperinmune con título de 1:5000 o 1:10 000 como lo indica la propia técnica japonesa en la cual se basó para la elaboración del conjugado.

4.7 Técnica de Seroneutralización.

- a) Se preparó 50 ml de Medio Esencial Mínimo (MEM) ajustado el pH con el 2% bicarbonato al 7%, ya que se ajustó y se preparó justo antes de usarse para sembrar las placas y para hacer el medio de virus de trabajo.
- b) Se adicionó 50µl de medio de dilución a cada pozo de la placa, en este trabajo se estandarizó el control de virus, con los pozos de E9 a E12 y de H9 a H12 adicionando 50µl de medio antes mencionado 50 µl de virus y finalmente 100 µl de células en suspensión.
- c) Se adicionó 50µl de suero problema por duplicado con una dilución inicial de 1:2 en la primera columna, para que de ésta en adelante sean diluciones dobles seriadas.
- d) Se homogeneizó la primer dilución y se hizo una transferencia de 50µl a la segunda dilución que corresponde a la segunda columna.
- e) Se hicieron las diluciones de la columna 1 hasta la columna 12 que equivaldría a las diluciones 1:2 hasta 1:4096.
- f) En la dilución final se retiró los 50µl de transferencia para obtener volúmenes iguales en todos los pocillos.
- g) En la placa donde quedó el control de virus estándar se adicionó en el primer pozo 50µl de medio, posteriormente se adicionó 50µl de virus de trabajo en donde se hicieron las diluciones logarítmicas -1, -2 y -3 al final se agregaron 100µl de células.
- h) Se incubó en estufa de CO₂ al 5% a 37°C de 1 a 2 horas.
- i) Se le adicionó a toda la placa 100µl de células para tener 150µl de volumen final
- j) Se incubó nuevamente en estufa de CO₂ al 5% a 37°C durante 5 a 7 días.
- k) Se hizo observación de las placas diariamente y lectura el quinto día.

4.7.1 Dilución del virus para trabajar la seroneutralización.

Una vez que se tiene el título del virus para trabajar la SN ($10^{5.0}$ TCID₅₀ml). Se procedió a obtener las 200 dosis infectantes en un volumen de 50µl, por lo tanto se realizó el siguiente procedimiento ver cuadro No 6.

Cuadro No 6. Cálculo de las dosis teóricas para obtener el virus de trabajo para trabajar la SN.	
Secuencia de los pasos	Resultados
Obtener el logaritmo de 200	2.3
Obtener el logaritmo de 0.05	1.3
Sumar 2 + 1.3	3.6
Restar 5.0 – 3.6	1.4
Obtener el antilogaritmo de 1.4	25.12 ó dilución 1/25

4.8 Elaboración del conjugado.

4.8.1 Purificación de Inmunoglobulina.

- a) Se filtró 30 ml de suero con membrana 0.22 μm de diámetro de poro y se añadió 30 ml de PBS con NaCl, el pH estuvo entre 7.2-7.4 a partir de este punto se trabajó en cuarto frío o bien en cama de hielo a una temperatura de 4°C aproximadamente ver anexo No 1.
- b) Se agregó gota a gota 60 ml de la solución de sulfato de amonio y se mantuvo en agitación lenta por 30 minutos por lo menos, ver anexo No 2.
- c) Se centrifugó a 9000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- d) Se descarto el sobrenadante.
- e) Se disolvió el precipitado (botón) con 30 ml de PBS, se adicionó gota a gota y se mantuvo en agitación lenta con 7.5 ml de solución saturada de sulfato de amonio.
- f) Se centrifugó a 9000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- g) Se repitió los pasos d y e 2 veces.
- h) Se retiró el sobrenadante y se disolvió el precipitado con 7.5 ml de PBS. Se filtró a través de lana de vidrio.
- i) Se sometió la solución de Ig a filtrar con membrana de celulosa ver anexo No 3, en PBS al 0.005 M ver anexo No 4, se mantuvo en agitación lenta por 10 minutos aproximadamente y se cambió el PBS 3 veces para remover el sulfato de amonio durante 3 días en cuarto frío a 4°C.

- j) Se verificó que la solución de Ig ya no contenía solución saturada de sulfato de amonio utilizando para esto una solución de cloruro de bario (BaCl_2) ver anexo No 5.

4.8.2 Determinación de la cantidad de proteína.

- a) Se utilizó un refractómetro para determinar la proteína por su simplicidad.
b) Se guardó en refrigeración para conjugar la Ig con el FITC.

4.8.3 Conjugación de la Ig con FITC.

Para poder llevar a cabo la conjugación de las proteínas con el isotiocianato de fluoresceína se hicieron los cálculos de la cantidad de FITC, de buffer carbonato-bicarbonato y de solución salina requerido según la cantidad de proteína a conjugar.

- a) Solución de proteína = mg/ml.
- $3.75 \text{ g/dl} = 3750 \text{ mg}/100 \text{ ml} = 37.5 \text{ mg/ml}$.
- b) Volumen en el que está contenida la proteína.
- 13.7 ml solución de proteína.
- c) Total de proteína = $AXB = \text{mg}$.
- $AXB = \text{mg} = 37.5 \text{ mg} \times 13.7 \text{ ml} = 513.75 \text{ mg}$.
- d) Volumen de solución de proteína al 2% = $C/20$.
- $C/20 = D \text{ ml} = 513.75 \text{ mg}/20 = 25.6875 \text{ ml}$.
- e) Cantidad de FITC.
- $C/100 = 513.75 \text{ mg} / 100 = E \text{ mg} = 5.1375 \text{ mg}$.
- f) Volumen de buffer carbonato-bicarbonato.
- $D/10 = F \text{ ml} = 25.6875/10 = 2.5687 \text{ ml}$.
- g) Volumen de solución salina que se adiciona a la solución de proteína = $D - (B+F)$.
- $25.6875 \text{ ml} - (13.7 \text{ ml} + 2.5687 \text{ ml}) = 25.6875 \text{ ml} - 16.2687 \text{ ml} = 9.4188 \text{ ml}$.
 - Se disolvió el FITC en buffer de carbonato-bicarbonato pH 9.5 ver anexo No 6, preparado justo antes de usarse y se adiciona gota a gota a la solución de proteínas.

- Se adicionó solución salina al 0.1 M (ver anexo No. 7), el pH se dejó en 9.5, mantener en frasco ámbar y en agitación lenta en cuarto frío a 4°C por 24 horas. Se guardó en refrigeración para conjugar la Ig con el FITC.

4.8.4 Purificación del conjugado en columna sephadex.

- a) Se puso el conjugado una vez preparada la columna de sephadex G25 para filtrarlo (ver anexo No. 8).
- b) Se puso el PBS 0.005 M en la columna, posterior a que pasó completamente el conjugado por la cama de sephadex G25 y se continuó agregando el mismo buffer gota a gota hasta que en el último tubo la lectura de proteína decaiga por el refractómetro.
- c) Se pusieron los tubos con mayor cantidad de proteína a filtrar en columna de DEAE-celulosa.

4.8.5 Purificación del conjugado por DEAE-celulosa.

- a) Se puso el conjugado una vez preparada la columna de DEAE-celulosa para filtrarlo, ver anexo No 9.
- b) Se puso el PBS 0.005 M en la columna, posterior a que pasó completamente el conjugado por la cama de DEAE-celulosa y se continuó agregando el mismo buffer gota a gota hasta que en el último tubo la lectura de proteína por el refractómetro decaiga o bien se colectó las fracciones de color verde-amarillo brillante ya que la proteína unida al FITC están en estos últimos.
- c) Se fraccionó en criotubos y se conservó en refrigeración a 4°C hasta su titulación.

4.8.6 Determinación del título del conjugado.

- a) Se preparó una suspensión celular infectadas con IBR con una concentración de (200 DICT₅₀/ml). Se sembró cada pozo con 200 µl células MDBK en laminillas Labtec de 8 pocillos y se metieron a incubar en estufa a 37°C con 5% de CO₂ por 48 horas.
- b) Se sacaron de incubación y se observaron en microscopio de campo claro para ver si hay ECP.

- c) Se hicieron diluciones dobles seriadas del conjugado con PBS iniciando con la dilución 1:2 hasta 1:512.
- d) Se decantaron las laminillas Labtec y se adicionó con cada dilución del conjugado experimental y el conocido en este último a dilución conocida de trabajo el cual se utilizó de testigo para comparar la tinción entre uno y otro. La adición se hizo tanto a los pozos infectados como a los controles.
- e) Se metió a incubar en cámara húmeda a 37°C con 5% de CO₂ por 1 hora.
- f) Se hicieron 3 lavados con PBS y uno más con agua destilada por inmersión.
- g) Se fijaron las células con solución de acetona al 70% por 1 hora.
- h) Se colocó la solución de montaje de glicerina al 10% y el cubre objetos para su observación y evaluación.

Se debe utilizar 3 criterios para la evaluación del conjugado:

- 1.- Intensidad de la tinción específica.
- 2.- Cantidad de inclusiones y polvo antigénico fluorescente.
- 3.-Tinción inespecífica de fondo.

El conjugado policlonal experimental debe tener las características mínimas expresadas en el cuadro No 10.

4.8.7 Conservación:

La conservación se hace con la finalidad de Cuidar el anticuerpo fluorescente y se puede hacer de la siguiente manera:

- 1. Adicionar 0.2% a 0.1% de Ácida de sodio.
- 2. Conservar a 4°C siempre y cuando se vaya a utilizar al instante o sino se recomienda fraccionar y congelar a -20°C.
- 3. Liofilización.

5 Resultados

5.1 Virus de trabajo.

Después de ser titulado el virus de catálogo de ATCC y el de campo, con títulos de ($10^{10.2}$ DICT₅₀/ml) y ($10^{7.6}$ DICT₅₀/ml) respectivamente el virus fue utilizado en la prueba como virus de trabajo y el mismo se fraccionó con 0.5 ml en criotubos a -70°C e identificado para su utilización para la valoración de anticuerpos de los sueros que se trabajaron y por el mismo centro para la pruebas de rutina.

5.1.2 Títulos de los sueros.

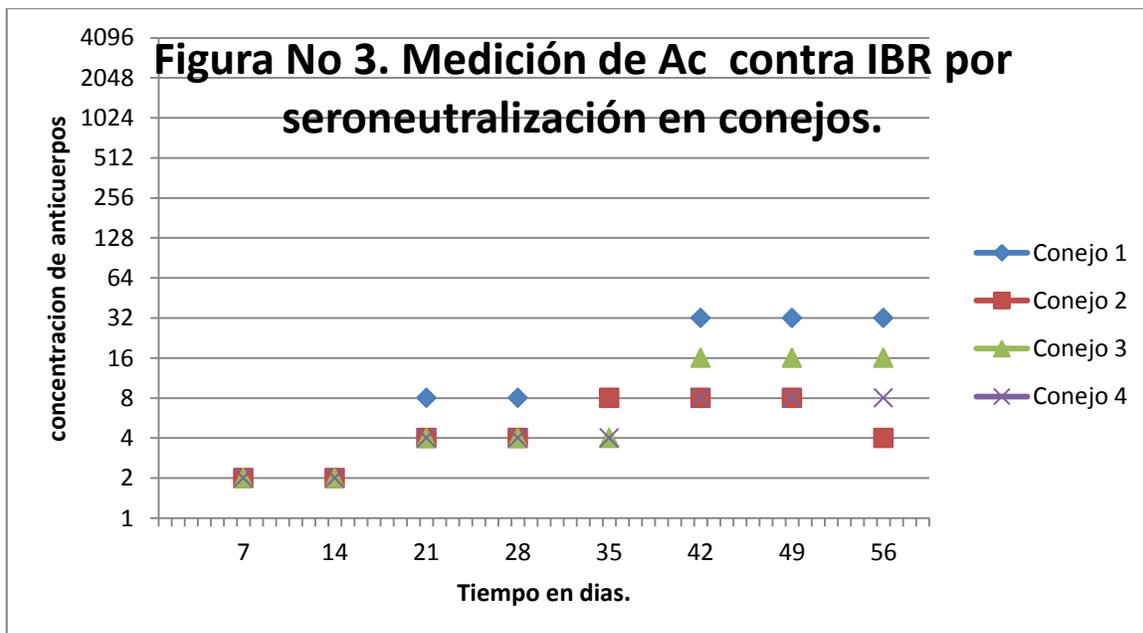
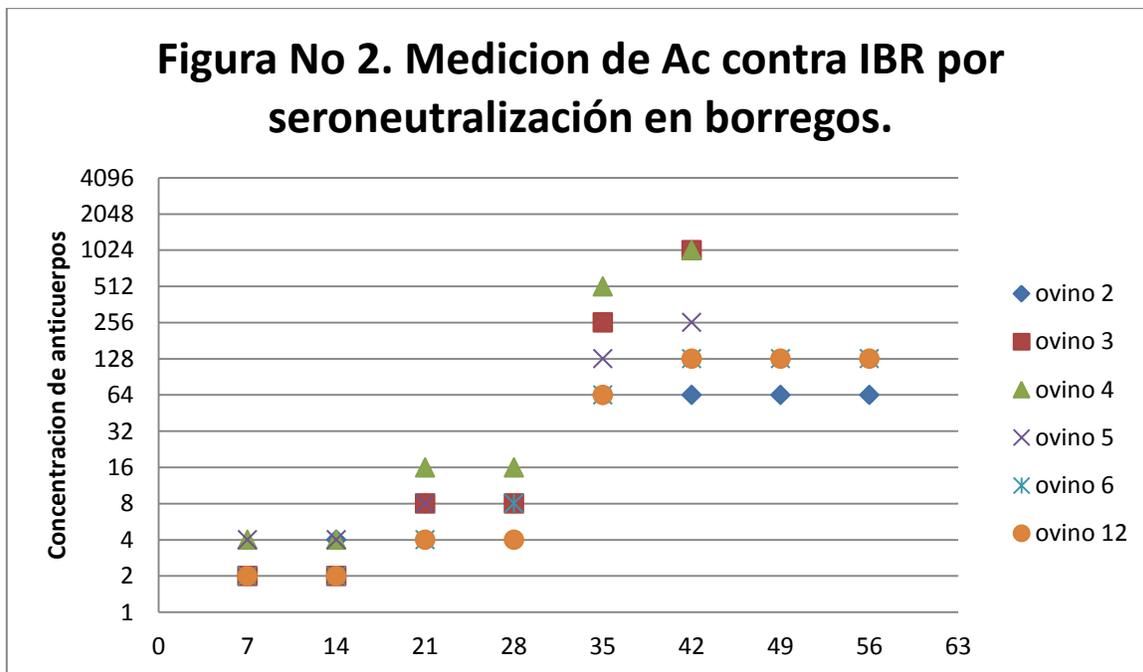
El título de anticuerpos obtenidos en la prueba de SN de los sueros de las diferentes especies se muestra en los cuadros 7, 8 y 9.

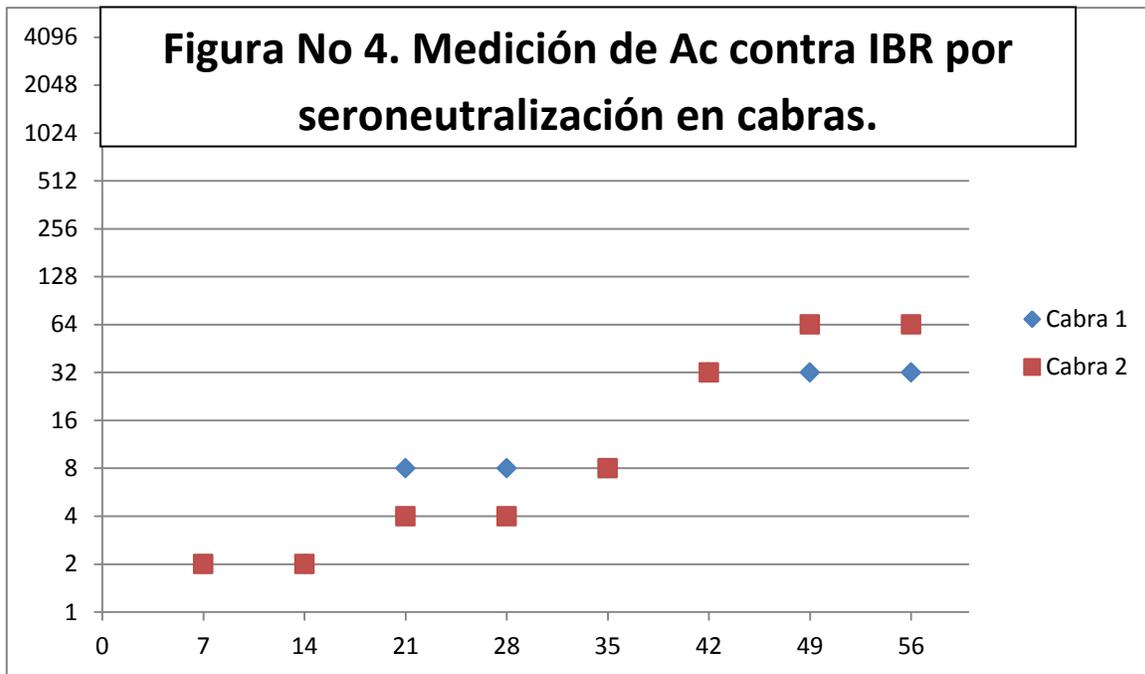
Cuadro No 7. Título de anticuerpos medidos por la prueba de SN en conejos.		
Identificación	Título	Días de sangrado
1	1:32	42
2	1:32	42
3	1:16	42
4	1:8	42

Cuadro No 8. Evaluación de Ac medidos por la prueba de SN en cabras.		
Identificación	Título	Días de sangrado
1	1:64	42
2	1:32	42

Cuadro No 9. Evaluación de Ac medidos por la prueba de SN en borregos.		
Identificación	Título	Días de sangrado
2	1:64	56
3	1:1024	49
4	1:1024	49
5	1:256	49
6	1:64	56
12	1:128	56

Los resultados anteriores se proyectan en las siguientes gráficas ver (figura No 2,3 y 4) en donde encontramos la representación de la concentración de anticuerpos medida cada 7 días por la técnica de SN.





La respuesta inmune que se obtuvo de los conejos y cabras fue parecida pero menor en comparación con los ovinos en los cuales a pesar de un idéntico calendario de inoculación se puede observar que los animales no respondieron de igual forma, ver (figura No 2,3 y 4).

Se tomaron temperaturas rectales de los animales para ver el comportamiento de las mismas y asociarlas de algún modo con las inoculaciones en las cuales podemos ver en la (figura No 5a y 5b) que no hubo incremento drástico de la temperatura en ninguno de los animales, sobre todo cuando se inoculó el virus con el adyuvante completo de Freund (ACF) ya que se pensaría que causaría una ligera fiebre por la respuesta inmune que produce en el organismo. Recordando que la toma de temperatura rectal fue realizada en un tiempo determinado que fue entre las 10 y las 12 del día para tratar de que no se viera afectada por alguna situación medioambiental, ya que sabemos que entre más pasado del medio día hace más calor y normalmente los animales ya comieron.

Figura No 5a. Relación de TC e inoculación viral

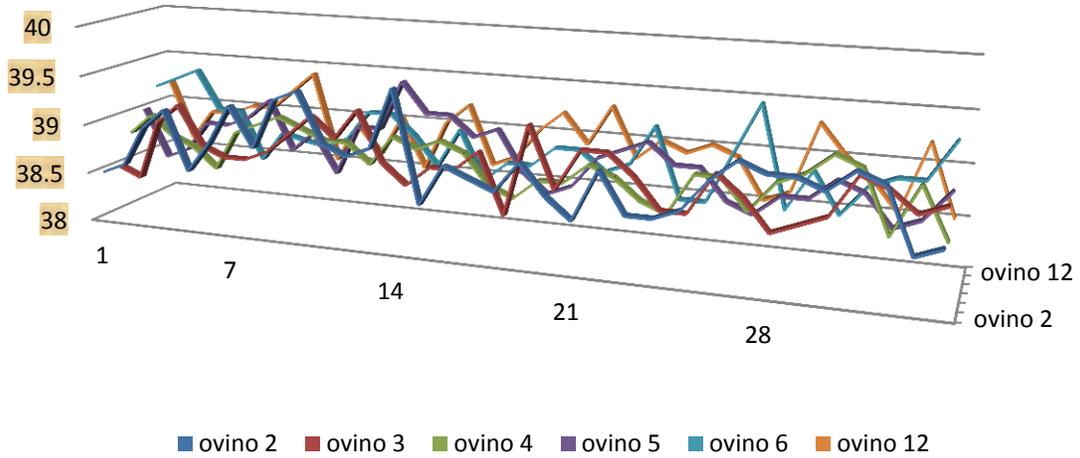
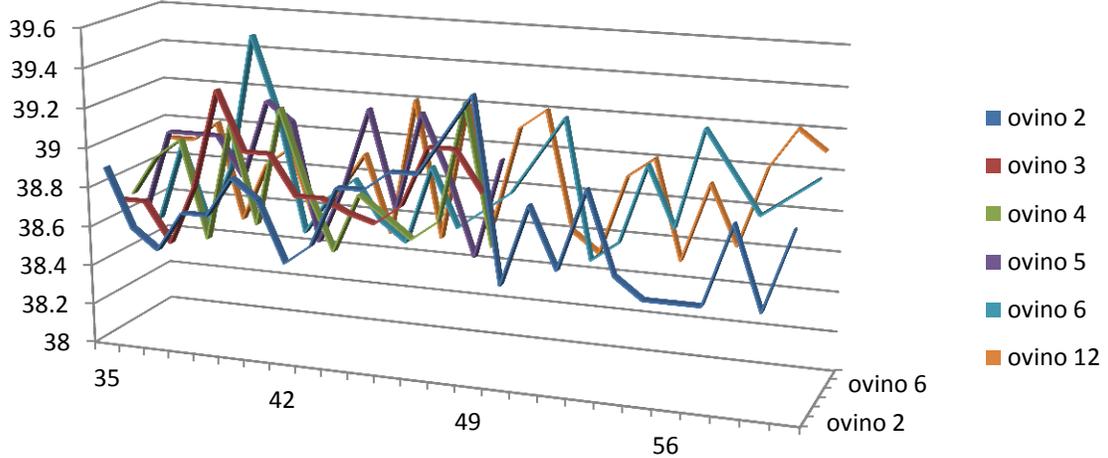


Figura No 5b. Relación de TC e inoculación viral



5.2 Evaluación del conjugado.

Se hacen varias diluciones del conjugado comenzando de 1:2 y de ahí en base 2 logarítmicas hasta 1:512. Se tomaron fotos en cada una de las diluciones y como control un conjugado importado para compararlo con el obtenido en éste trabajo.

En la evaluación se deben utilizar 3 criterios para la evaluación del conjugado:

- 1.- Intensidad de la tinción específica.
- 2.- Cantidad de inclusiones y polvo antigénico fluorescente.
- 3.-Tinción inespecífica de fondo.

Estos criterios son tomados de la OMS en la cual se basó para la evaluación y titulación del conjugado y se resumen en el cuadro No 10.

Cuadro No 10. Grado de intensidad tintorial específica y de tinción no específica en el conjugado policlonal.										
Criterios de fluorescencia		Diluciones del conjugado								
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
Muestra infectada		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
Intensidad tintorial específica	*C	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	++++
	*M	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	++++
Inclusiones y polvo fluorescente	*C	++	++	+	+	+	-	-	-	-
	*M	++	++	+	+	+	-	-	-	-
Tinción específica de fondo	*C	+++	+++	++	+++	++	++	++	++	+
	*M	+++	++	+++	++	++	+	++	++	+
*C-control celular, M- muestra infectada.										
+ bajo, ++ regular, +++ bueno, ++++ muy bueno.										

Los resultados obtenidos de cada una de las diluciones así como los controles negativos y el conjugado de referencia se pueden observar en el apéndice de figuras en donde podemos ver cada una de las fotos en donde se aprecia y se puede comparar mejor.

El conjugado fue probado con células MDBK infectadas por virus de IBR y se obtuvieron resultados satisfactorios utilizando y corroborando la dilución de trabajo 1:512.

6 Discusión

El conjugado obtenido ha contrastado con resultados publicados con otros autores tanto en técnicas empleadas como calendarios de inoculación para la extracción del mismo suero, materia prima que es indispensable para formular el conjugado. Comparando este trabajo con lo que ya se ha hecho y publicado no solo en el país sino en otros países; podemos encontrar publicaciones como la de **(Schiper 1968)** quien por medio de suero de conejo con el cual se hizo un conjugado con dilución de trabajo de 1:20. En otro trabajo de **(Archiwum 1975)** publicó la elaboración de un conjugado para el diagnóstico de IBR el cual lo preparó a partir de suero hiperinmune de toro de acuerdo con el método CVL Weybridge para la preparación de conjugados anti peste porcina, en donde su dilución óptima para la utilización de su conjugado fue entre 1:8 y 1:16, con el cual demostró que servía para el diagnóstico de la enfermedad.

El conjugado que se elaboró ha resultado ser de mayor concentración que el que se obtuvo en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) obtenido por **(Mejía 1993)**. En el cual el conjugado fluorescente con una concentración de 1:10 y cosechado por inoculaciones repetidas por una cepa vacunal en bovinos y que en estos el título de anticuerpos de algunos animales fueron 1:64 y en otros 1:128 al igual que nuestro título de anticuerpos de los ovinos con el cual se hizo el conjugado. Otros resultados obtenidos esta vez por **(Ortiz 2006)** en donde realizó en el CENASA un conjugado por la misma técnica japonesa con la cual realizó todo el desarrollo del conjugado para la detección de la enfermedad de Fiebre Porcina Clásica para uso del mismo centro y en la cual fue obtenida por inoculaciones repetidas con cepa vacunal y en la cual obtuvieron un suero con un título de anticuerpos de 1:256 por la prueba de SN, y que la dilución final para la utilización del conjugado fue de 1:4.

Dentro de las técnicas para la obtención de sueros hablando de calendarios diversos de inoculaciones con intervalos diferentes entre una y otra inoculación y cantidades utilizadas para cada uno con el propósito de extraer éste con títulos de anticuerpos altos para la elaboración de un conjugado, hay muchas variantes e inclusive utilizando técnicas muy similares hay diferencias en resultados hablando de la preparación de conjugados

fluorescentes. Inclusive se tomó la decisión de seguir una técnica japonesa (**Kawamura 1977**) en donde aseguran que su técnica da mejores resultados en todos los aspectos con otras desarrolladas. Tiene mejores resultados que la técnica de Clarck and Shepard y la técnica de Coons (**Kawamura 1977**). En el desarrollo de la técnica hay muchos aspectos a considerar ya que hay que tener cierta capacitación y experiencia para el desarrollo de la misma e inclusive la supervisión de gente con mayor experiencia para resolver algunos problemas técnicos durante el proceso de la conjugación. Cabe mencionar que uno de tantos aspectos a considerar en primera instancia es la especie utilizada para la obtención del suero ya que hay que pensar sobre todo en la sustentabilidad de la especie seleccionada sobre todo por la alimentación y todos los aspectos de confort que debe tener el animal. De las tres especies utilizadas la que tuvo mayor respuesta inmune son los ovinos los cuales se recomendarán como selección para futuros trabajos ya que inclusive son más manejables que las cabras y se puede obtener mayor volumen de sangre que los conejos y que inclusive al sangrar a estos últimos en volúmenes grandes se corre el riesgo de causarles la muerte. La técnica japonesa indica que para la elaboración de un excelente conjugado es necesario adquirir un suero con títulos de 1:5000 o hasta 10000 (**Kawamura 1977**). Aunque en este trabajo no se consiguió el título citado, si se consigue tener un buen conjugado y a una buena concentración. La diferencia de este conjugado se hace notar en la concentración que se tiene ya que a pesar de no tener una cantidad mayor de proteína se logró filtrar la mayor cantidad de inmunoglobulinas de tipo (IgG), las cuales fueron conjugadas con el colorante FITC, y la cual se puede decir sin tener con exactitud los métodos utilizados por otros autores que la diferencia lo hace la extracción y procesamiento de la sangre para la cosecha del suero a trabajar, que en el caso de (**Ortiz 2006**) se almacenó y guardó por congelación a -20°C y después se procesó, en este trabajo el suero se trabajó el día de la extracción, se almacenó a 4°C y al día siguiente se comenzó a procesar para la conjugación. La temperatura juega un papel importante en la función que tiene cada uno de los reactivos a utilizar y en el mismo suero también, y desde luego que en este trabajo se checó los pH de cada uno de ellos y los que no estaban dentro de los parámetros establecidos por la técnica se ajustaron.

7 Conclusión

- De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que la concentración de 1:512 obtenida como dilución de trabajo del conjugado sirve para el diagnóstico por la técnica inmunofluorescencia directa, y no necesariamente se debe tener un suero con títulos tan altos para la elaboración de un conjugado. La técnica empleada es superior a las de la literatura citada ya que el conjugado que se logró, tiene un rendimiento mayor que otros con los que se analizó según lo ya establecido por otros autores.
- De las tres especies utilizadas se recomienda hacerlo con ovinos para la realización de futuros sueros hiperinmunes ya que son animales nobles y de un mejor acceso tanto para sustento de los mismos como para la obtención de grandes volúmenes de sangre y además porque en este trabajo fueron los animales que más cantidad de anticuerpos pudieron desarrollar por una mejor respuesta inmune de acuerdo por el calendario de inmunización establecido: día 0; im, 2 ml más 0.5 ml por aspersion intranasal, día 14; 2 ml subcutáneo más 0.5 por aspersion intranasal, día 28; 0.3 ml por vía intradérmica en cuatro puntos diferentes de virus más ACF (v/v), día 35; im 2 ml más aspersion vía intranasal 0.5 ml, día 42; 0.3 ml por vía intradérmica en cuatro puntos diferentes de virus más ACF (v/v) .
- Se recomienda tanto el protocolo de inoculación utilizado, como volúmenes y vías de administración empleadas. En gran parte para obtener una buena respuesta inmune es la utilización del adyuvante completo de Freund.
- El conjugado desarrollado se utilizará como una prueba complementaria para el diagnóstico de la enfermedad de IBR y así se pretende que sea pieza clave para poder tener un mejor panorama de la presencia de la enfermedad en todo el país, según lo planteado con la hipótesis de este trabajo.
- Existe falta de información del productor y médicos veterinarios acerca de la presencia de esta enfermedad y su repercusión económica, así como un adecuado diagnóstico, por lo cual con este trabajo se considera se pudiera ayudar a la comunidad ganadera con un proyecto de comercialización y servicio de asesoramiento, diagnóstico e implementación de efectivos calendarios de

vacunación para las diferentes etapas del ganado en el hato, siendo específico y adecuado para cada lugar.

- Se recomienda a la SAGARPA que se utilice este conjugado para la realización de un estudio para saber cual es la seroprevalencia y comportamiento de la enfermedad de la IBR en México, haciendo llegar el conjugado a los diferentes laboratorios regionales por medio del centro de referencia que es el CENASA en donde fue desarrollado este conjugado fluorescente.
- La disposición de los animales empleados para este trabajo fueron borregos aunque se puede concluir que la especie ideal a trabajar son los bovinos ya que es la especie específica y susceptible a la enfermedad de IBR por lo que tendrá una mayor respuesta inmune y por lo tanto será de una mayor concentración el conjugado.
- El protocolo fue aceptado por el comité interno del CICUAL en el CENASA en el mes de enero del 2012.
- Todo el material con el cual se trabajo para la realización de los inoculos y las excretas de los animales y los animales que murieron fueron incineradas siguiendo los procedimientos técnicos del CENASA siguiendo las normas establecidas como son: ISO-14001 sistema de gestión ambiental, NOM-085-ECOL-1994, Contaminación atmosférica-Fuentes fijas-Para fuentes fijas que utilizan combustibles fósiles sólidos, líquidos y gaseosos, NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-Infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo, NOM-098-SEMARNAT-2002, Protección ambiental-Incineración de residuos, especificaciones de operación y límites de emisión de contaminantes. Manual de sistema de gestión (CNSADIM02).

BIBLIOGRAFÍA.

1. Aguilar J. Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (Bovid Herpesvirus 1): Propiedades y vacunación. Ciencia veterinaria 4-1987 artículo 1987 REVET México.
2. Anderson R, May R (1982). Population biology of infectious disease agents. Dahlem Konferenzen. Berlin: Springer-Verlag.
3. Ávila M, Rodríguez M, Díaz H, Barrera M. (2008) Diagnóstico virológico de herpesvirus bovino tipo-1. ISSN 1695-7504 Vol. IX, N°3.
4. Barrera B, Córdova A, De la O F (2005). Diagnóstico de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina mediante Inmunoperoxidasa. REDVET vol. VI, No 11.
5. Bracho A. (2002) Estudio comparativo de las pruebas de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia y su concordancia con la prueba de seroneutralización para la detección de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina. (Tesis POSGRADO). DF. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
6. Briones V, Goyache J, Domínguez L (2006). Enfermedades emergentes humanas y animales: Importancia cuantitativa y factores condicionales. Profesión Veterinaria, 64:20-25. Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid.
7. Burleson F, Chambers T, Wiedbrauk D. Virology a laboratory manual. Ed AP. INC 1992 USA libro 1992 USA
8. Carter GR, Wise DJ, Flores EF. International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), visitado: 8-feb-2005; a3404.0205.ES.
9. Carter J, Saunders V (2007). Virology principles and applications. John Wiley & Sons Inc., 111 River Street, Hoboken, NJ 07030, USA.
10. Cleaveland S, Laurenson K, Taylor H (2001). Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. Phil. Trans. R.Soc. Lond. B. 356, 991-999.
11. Correa MAP. (1981) Enfermedades virales de los animales domésticos. Poligástricos. 5ª edición. México, Paradigmas. p.p. 45-90.

12. Cunningham C (1960). A laboratory guide in virology. Fourth Edition. Burgess Publishing Company. Minnessota USA.
13. Dinter Z, Morein B. Virus Infections of Rumiants. Vol.3. Elsevier Science 1990. libro 1990 Ámsterdam.
14. Eernisse K, Erickson G. Microtitration serology methods for bovine virology. Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) neutralization test. Apuntes 1990 CENASA.
15. Figueroa M, Vargas L, Mendoza L, Acevedo O, Chavarria M, Fonseca E, Moya F (1984). Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos en Centroamérica. San José, C.R. : EUNED.
16. García J, Agüero J, Parra J, Santos M (2010). Enfermedades infecciosas. Medicine 10(49):3251-64 - vol. 10 núm. 49.
17. García V. 1990. Epidemiología veterinaria y salud animal. Limusa. México p.p.58-68.
18. Kahrs R (2001). Viral diseases of cattle. The Iowa state university press. 4 ed 2001. pp.324 USA
19. Kawamura A. (1977) Fluorescent antibody techniques and their applications. University of Tokyo Japón 292 pp.
20. Lazo L, Francos M, Calero I, Valdés C (2010). La vigilancia epizootiológica como garantía de la salud de la población animal en sistemas de producción integrados con promiscuidad de especies. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504.
21. Magaña A, Solorio J L, Segura J C (2005). Rinotraqueítis Infecciosa Bovina en hatos lecheros de la región Cotzio-Téjaro, Michoacán, México. Téc. Pecu. Méx. 2005;43(1):27-37.
22. Mejia P.; Alvarado A.; Paz O.; Aguilar A. (1993). Elaboration and evaluation of a conjugate the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) by immunoflorescence. AGRIS 2012 - FAO of the United Nations. Reunion Nacional de Investigacion Pecuaria. Jalisco, Guadalajara, Jal (México), 27-30 Sep 1993.
23. Moraga L, Ruidíaz E, Zurita L (1987). Reproducción experimental de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina. I. Inoculación de dos cepas del virus Herpes

- Bovino tipo 1 aisladas en Chile. Avances en ciencias veterinarias - Vol. 2, No 1:26-32.
24. Morilla A, Bautista G (1986). Manual de inmunología 1ª. ed. México, Editorial Diana.
 25. Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E (2007). Bovine herpesvirus-1 infection and infections bovine rhinotracheitis. Vet. Res., 38:181-209.
 26. Navarrete J, Vera V, Ramírez G, Villamil L. Evaluación de la prueba ELISA usando una cepa de campo como antígeno, para detectar anticuerpos contra el virus de la Rinotraqueitis Bovina Infecciosa. Nova, Enero-Diciembre, año/vol. 2, número 002. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca Bogotá, Colombia. pp. 33-39 artículo 2004 Colombia.
 27. Obando C. Jornadas de investigación – Universidad Lisandro Alvarado. Barquisimeto, IIV-CENIAP-INIA 2006.
 28. Office International des Epizooties (1998). Revue Scientifique et Technique, Laboratorios Veterinarios para las enfermedades Infecciosas. Volume 17-2, rue de Prony - 75017 Paris Francie: OIE, coordinado por J.E Pearson.
 29. OIE. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina y Diarrea Viral Bovina: repercusiones en la salud animal y el comercio internacional. Conf. OIE 1998, 147-156. Deregt D.
 30. OIE., 2013. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina. Organización Internacional de Epizootias. web.oie.int/esp/normes/ [acceso 15 enero 2013].
 31. Ortiz BM. Producción de un conjugado para la fiebre porcina clásica (tesis licenciatura).Estado de México, México: Universidad Tecnológica de Tecámac, 2006.
 32. Pfizer Hernández A (2000). Manual de inmunología.
 33. Prats G (2007). Microbiología Clínica. 1ª. ed. Argentina; Madrid, Médica Panamericana.
 34. Ramos J.; Gómez L. Mecanismos inmunológicos en la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR). Ed Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, 1984.
 35. Reyes M, Vázquez R, García J (2004). Seroprevalencia de IBR y DVB en hatos muestreados en México, 2002 – 2003. [resumen]. XXVIII Congreso. Nacional de Buiatría. 112

36. Rodríguez C, Tamez R (2010). Manual de inmunología. México Ed Trillas.
37. Rodríguez M, Ávila M, Diaz H, Barrera M (2009). Development and evaluation of a polymerase chain reaction assay to detect bovine herpesvirus 1. Journal of Agricultural Research. 7(1), 59-66 ISSN: 1695-971-X. Available online at www.inia.es/sjar
38. Roger S. Microscopical lesions and antigen distribution in bovine fetal tissues and placentae following experimental infection with bovine herpesvirus -1 pregnancy journal 2007 Elsevier.
39. Roitt I, Delves P, Martin S, Burton D (2010). Roitt Inmunología: fundamentos. 11ª. ed. Argentina, Médica Panamericana.
40. Sánchez J (2005). Curso de introducción a la inmunología porcina. 2ª edición Diez capítulos. www.sanidadanimal.info ISBN: 84-688-5927-3.
41. Sánchez M, Gutiérrez F, Tapia G (1992). Banco nacional de sueros Salud Pública de México [fecha de consulta: 15 de enero de 2013]
42. Schiper A, Chow L. Detection of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) by immunofluorescence. Can J Comp Med. 1968 April; 32(2): 412–415. PMID: PMC1319262.
43. Schynts F, McVoy M, Meurens F, Detry B, Epstein A, Thiry E (2003). The structures of bovine herpesvirus 1 virion and concatemeric DNA: implication for cleavage and packaging of herpesvirus genomes. Virology, 314:326-335.
44. Shors T (2009). Virus: estudio molecular con orientación clínica. 1ª ed. Argentina, Médica Panamericana.
45. Slim A, Elazhry M. Detection of Infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine Viral Diarrhea Viruses in the Nasal Epithelial Cells by the Direct Immunofluorescence Technique. Can J Comp Med 1983; 47: 18-22 article 1983 Canada.
46. Timbs, D (1979). The New Zealand National Bovine Serum Bank. Proceedings of the 2nd International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics. Available at www.sciquest.org.nz
47. Trinidad H. Seroprevalencia y factores de riesgo de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina en ranchos ganaderos de las Choapas, Minatitlán y Moloacán ubicados en la

- zona sur del Estado de Veracruz, México. (tesis licenciatura). Veracruz México: Univ Veracruzana, 2010.
48. University of Southern California (2012). Procesos patológicos Reproductivos Disponible en: Minerva.usc.es/bitstream/9788498873542_content.pdf.
 49. Vera V, Betancur C. (2008) Aislamiento del virus herpes bovino tipo 1 en bovinos del departamento de Córdoba – Colombia. Revista MVZ Córdoba (en línea) vol. 13 (citado 2012-11-12).
 50. Vera V, Ramírez G, Villamil L, De Sandino M, Jaime J (2006). Biología molecular, epidemiología y control de la Rinotraqueitis Bovina Infecciosa y de la Diarrea Viral Bovina. 1ª ed. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
 51. Wojciechowski KJ. Immunofluorescent studies with IBR/IPV virus on cell culture. Pol. Arch. Weter. 1975; 18(2):189-200.
 52. Zapata G (2009). Estándares de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB), Buenas prácticas de manufactura. México. Takecontrol Año 6 No. 17.
 53. Zapata, J.; Ossa, J.; Bedoya, G. (2002) Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB). Caracterización de una cepa Colombiana de Herpes Bovino tipo 1. RevColCiencPec Vol. 15 1,2002 REVCOL.

Glosario

Adyuvante: sustancia que, cuando se administra junto con el antígeno, intensifica la respuesta inmunitaria normal.

Antígeno: sustancia que puede inducir una respuesta inmune.

Bacterina: preparación de bacterias muertas que se utiliza para inmunización. Actualmente se puede usar el término de vacuna de bacterias muertas o vacuna muerta.

Epítopo o determinante antigénico: área en una molécula de una molécula de antígeno que estimula una respuesta inmunitaria específica y contra la cual esa respuesta está dirigida.

Inmunidad: estado de resistencia a una infección.

Patógeno: microorganismo causante de la enfermedad.

Respuesta inmune: respuesta inmunitaria que se presenta después de una exposición a un antígeno.

Sistema inmune: conjunto de órganos, tejidos, células, proteínas y otras sustancias que se encargan de defender el organismo ante la presencia de un agente extraño o antígeno.

Serología: es la ciencia que estudia la detección de anticuerpos (Ac) en los destinos líquidos corporales tales como lágrimas, secreciones bronquiales, líquido sinovial, leche, calostro, plasma seminal, moco vaginal, suero sanguíneo, plasma, etc.

Plasma: es la fracción líquida y acelular de la sangre, es decir, se obtiene al dejar a la sangre desprovista de células como los glóbulos rojos y los glóbulos blancos.

Abreviaturas

µm	Micrómetro
Nm	Nanómetro
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
Ig	Inmunoglobulina
Fc	Fracción cristalizable
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
OMS	Organización Mundial de la Salud
AABB	Asociación Americana de Bancos de Sangre
CENASA	Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
BHV-1	Herpesvirus Bovino tipo-1
EIA	Enviromental Investigation Agency
VPI	Vulvovaginitis Pustular Bovina
BPI	Balanopostitis Pustular Infecciosa
DVB	Diarrea viral bovina
PI3	Parainfluenza tipo-3
BRSV	Virus sinsitial bovino
IBR	Rinotraqueitis infecciosa bovina
MDBK	Madin-Darby de riñon bovino
ECP	Efecto citopatico
NV	Neutralización del virus
MAbs	Anticuerpos monoclonales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

Anexos

Anexo No 1. Solución amortiguadora de PBS al 0.1 M pH 7.2-7.4

Compuesto	Cantidad	Peso molecular (PM)
KCl	0.2 g	74.56
Na ₂ HPO ₄	1.15 g	141.96
KH ₂ PO ₄	0.2 g	136.09
Agua destilada	1000 ml.	

Para preparar con solución salina justo antes de usarse el PBS se adiciona 8.0 g de NaCl
PM= 58.

Anexo No 2. Solución saturada de sulfato de amonio. Debe prepararse mucho antes, ya que el sulfato de amonio tarda varias horas para que sea totalmente saturado.

- (NH₄)₂SO₄ agregar 400 g en 500 ml de agua destilada (previamente calentada a 70-80°C).
- Se deja en agitación durante 20 minutos y se deja a enfriar a temperatura ambiente en donde los cristales de sulfato de amonio formaran un botón en el recipiente, mientras que el sobrenadante será saturado, el pH será de 5 aproximadamente y deberá ajustarse a 7.0 con una solución de amonio al 28%. En este caso se utilizó amoniaco liquido NH₃ y se mezclaron 28 ml de este con 72.2 ml de agua destilada.

Anexo No 3. Preparación de la membrana de diálisis por el método de ebullición.

Componente	cantidad
Membrana de diálisis de 20/30	30 cm
Bicarbonato de sodio	0.3 a 0.5 g
EDTA	0.05 g
Agua destilada	1000 ml

- a. Se pone la membrana en agua de diálisis en el agua destilada y se le adiciona el bicarbonato de sodio y el EDTA, para ponerse a hervir.
- b. Al hervir la mezcla se retira del calor y se deja enfriar.
- c. Se retira el agua y se lava la membrana dos veces con agua destilada.
- d. Colocar la membrana de diálisis en 1000 ml de agua destilada de 20 a 30 minutos antes de utilizarla.

Anexo No 4. PBS (solución amortiguadora de fosfatos) al 0.005 M

Se prepara una solución al 0.1 M pH 7.2:

- Solución A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ PM= 156
 - Para preparar 2 litros: se mezclan 31.2 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 200 ml de agua destilada.
- Solución B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ PM=358
 - Para preparar 3 litros: se mezclan 107.4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 3000 ml de agua destilada.
 - Se mezclan 1000 ml de la solución A + 2000 de la B = 3000 ml de PBS al 0.1 M.
 - Para preparar una solución de PBS al 0.005 M se diluye el PBS al 0.1 M relación 1:20 y se le adiciona 5.8 g de NaCl en 1000 ml de PBS quedando una molaridad final de 0.005 M con NaCl al 0.1 M y se debe ajustar el pH a 7.2.

Anexo No 5. Solución de cloruro de bario al 0.5 M

- BaCl_2 PM= 4.325 y se agrega a 50 ml de agua destilada y se agita hasta disolver

Anexo No 6. Solución de buffer de carbonato – bicarbonato al 0.5 M pH 9.5

Componente	Cantidad	Peso molecular
Solución de carbonato NaCO_3	52.99 g en 1000 ml agua destilada.	105.99
Solución de bicarbonato NaHCO_3	42 g en 1000 ml de agua destilada.	84.01

Para preparar el buffer carbonato – bicarbonato se mezcla un volumen de carbonato por tres volúmenes de bicarbonato y se ajusta el pH a 9.5. La mezcla se prepara justo antes de usarla.

Anexo No 7. Solución salina al 0.1 M

- NaCl 5.8 g se disuelven en 1000 ml de agua destilada en agitación.

Anexo No 8. Columna de SEPHADEX.

- Se adiciona 1 g de sephadex en 4 a 6 ml de PBS y se agita hasta que se disuelva, se deja reposar y posteriormente se adiciona a la columna y se deja sedimentar hasta que se vea el sephadex compacto.

Anexo No 9. Columna de DEAE celulosa.

- Se adiciona 1g de DEAE celulosa en 4 a 6 ml de PBS y se agita hasta que se disuelva y se deja reposar. Posteriormente se adiciona a la columna y se deja sedimentar hasta que se observe la celulosa compacta.

Anexo No 10. Concentración celular para la prueba de titulación viral en diferentes enfermedades virales de los bovinos.

Concentración celular recomendada para la prueba de titulación viral en diferentes enfermedades virales de los bovinos.		
Enfermedad	Tipo de células	Concentración celular (Cel / ml)
Rinotraqueitis Viral Bovina	Células de origen bovino derivadas de riñón, testículo, pulmón y tráquea. La línea celular establecida más comúnmente utilizada es la de riñón bovino Madin-Darby (MDBK)	3×10^4
Diarrea Viral Bovina	Células turbinadas derivadas de los cornetes nasales o células de testículo bovino ya sea línea celular o cultivo primario.	3×10^5
Lengua Azul	Líneas celulares de riñón de hámster bebe (BHK 21), riñón de mono verde (VERO) y células de mosquito Aedes Albopictus (L929)	10^4

Explicación del apéndice de fotos.

a-1. En el campo visto a 40 X se puede observar que ya no hay continuidad del monoestrato y el redondeo de las células. Hay un ECP evidente.

a-2. En el campo visto a 40 X se puede observar que se encuentra la monocapa íntegra pero el ECP no es tan claro como en la foto a-1.

a-3. En el campo visto a 40 X se puede observar la dilución 1:2 del conjugado en la cual se observa una saturación de la tinción.

a-4. En el campo visto a 40 X se puede observar que la dilución 1:2 control negativo hay saturación del colorante y puede dar falsos positivos.

a-5. en el campo visto 20X se puede observa aun la saturación del colorante en la dilución 1:4.

a-6. En el campo visto a 40X se puede observar que a pesar de ser control negativo puede confundirse con un positivo en la dilución 1:4.

a-7. En la dilución 1:8 control negativo se observa aun saturación de colorante visto a 40X .

a-8. En la dilución 1:8 control positivo aun hay saturación de tinción visto a 40X.

a-9 En la dilución 1:16 control positivo aun hay saturación de tinción visto a 40X.

a-10. En el control negativo de la dilución 1:16 hay saturación de tinción visto a 40X.

a-11 La dilución 1:32 control positivo comienza a verse diferente del control negativo. 40X.

a-12. Hay buena coloración y se comienza a ver el detalle celular, visto a 40X.

a-13. En 1:64 se nota una colonia grande positiva, visto a 40X.

a-14 En la tinción del control negativo se comienza a observar detalle celular, visto a 40 X.

a-15. Son más claras las colonias positivas y ya no hay tanta saturación de colorante. 1:128 visto a 40X.

a-16. ya hay una clara tinción que permite ver detalle celular en el control negativo, visto a 40X.

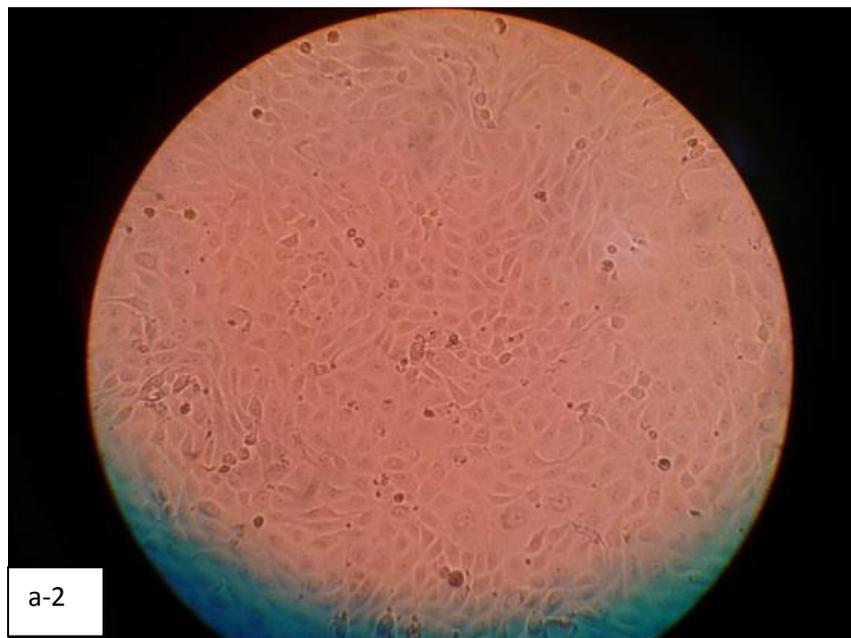
a-17. En 1:256 ya comienza a verse una tinción marrón de contraste y una colonia clara positiva, visto a 40X.

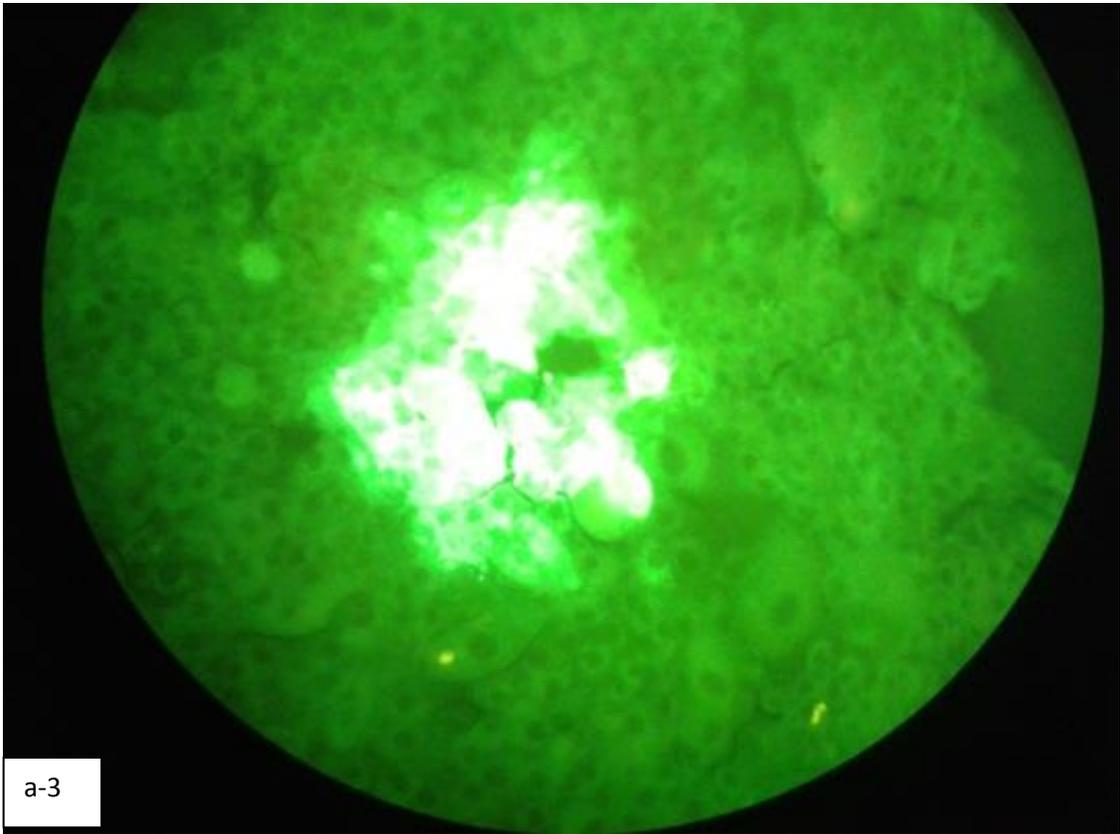
a-18. El control permite ver buen detalle celular y hacer distinción del positivo, visto a 40X.

a-19 y 21 Esta dilución 1:512 ya es muy claro la tinción específica e inclusive ya no se confunde con un falso positivo. Hay una tinción contrastante marrón de las células negativas.

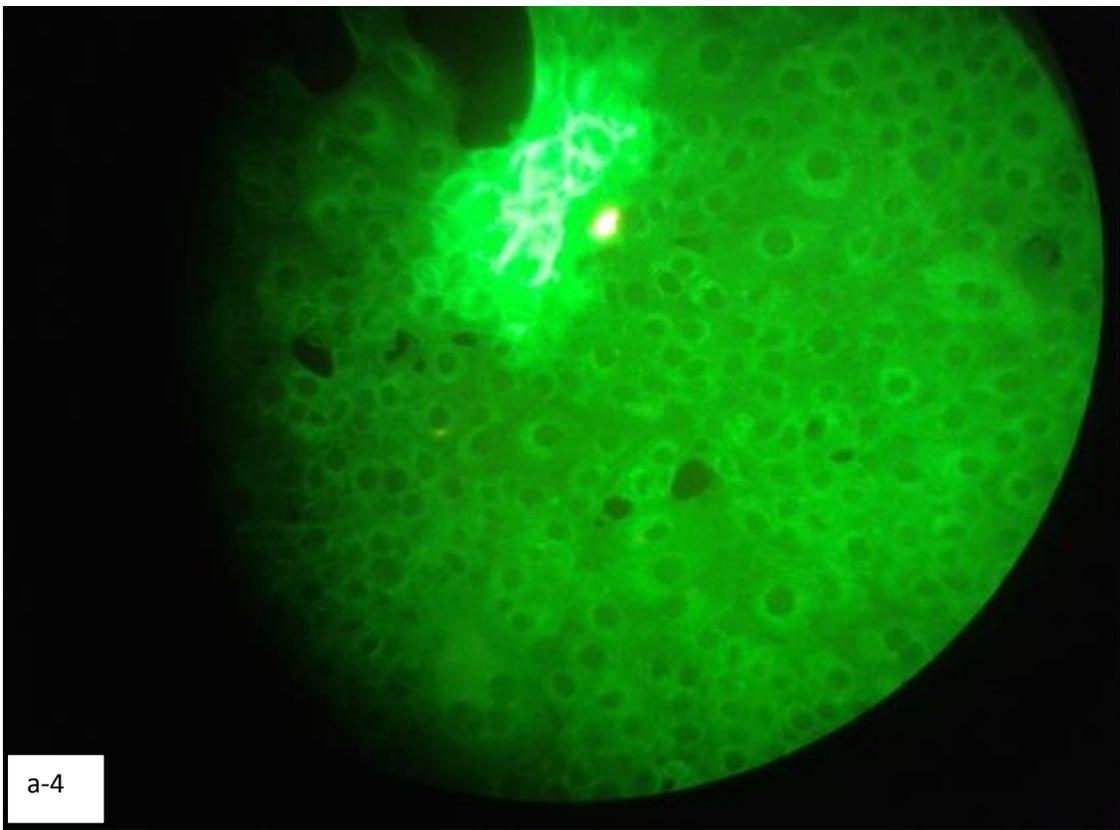
a-20. Se puede observar claramente las células negativas a 40X.

a-22 y 23. Conjugado de referencia positivo y negativo respectivamente y visto a 40X.

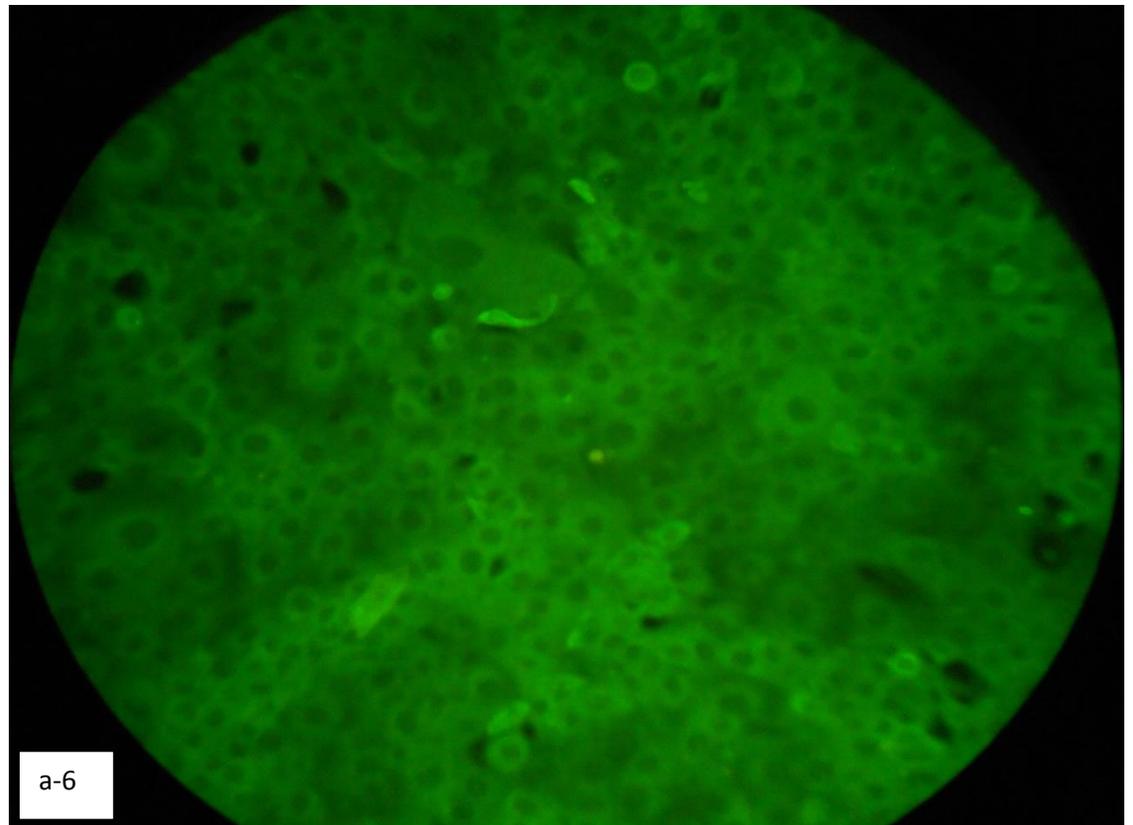
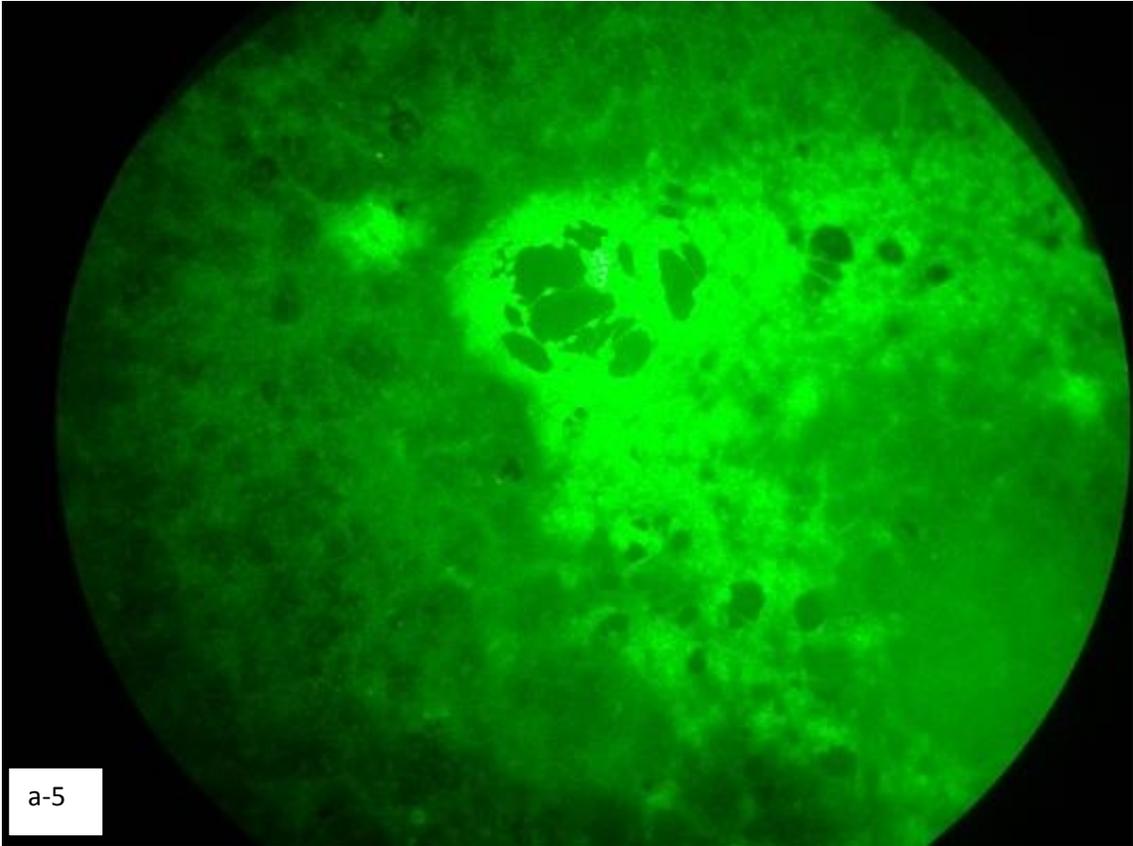


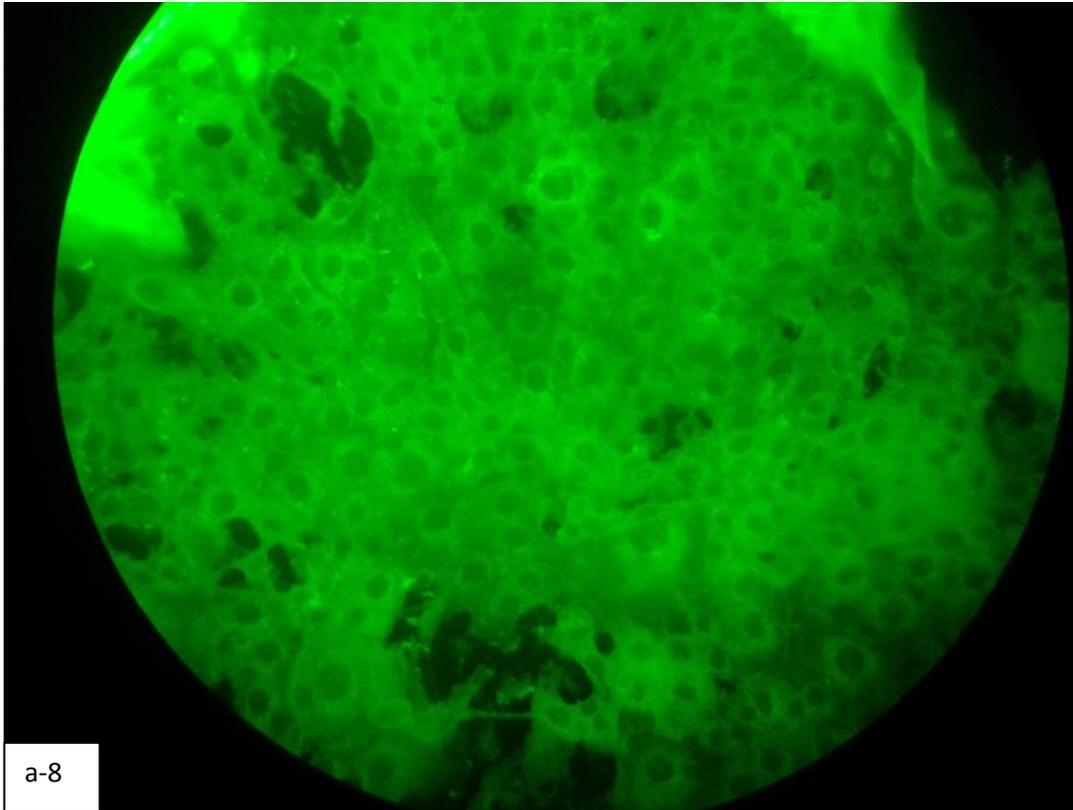
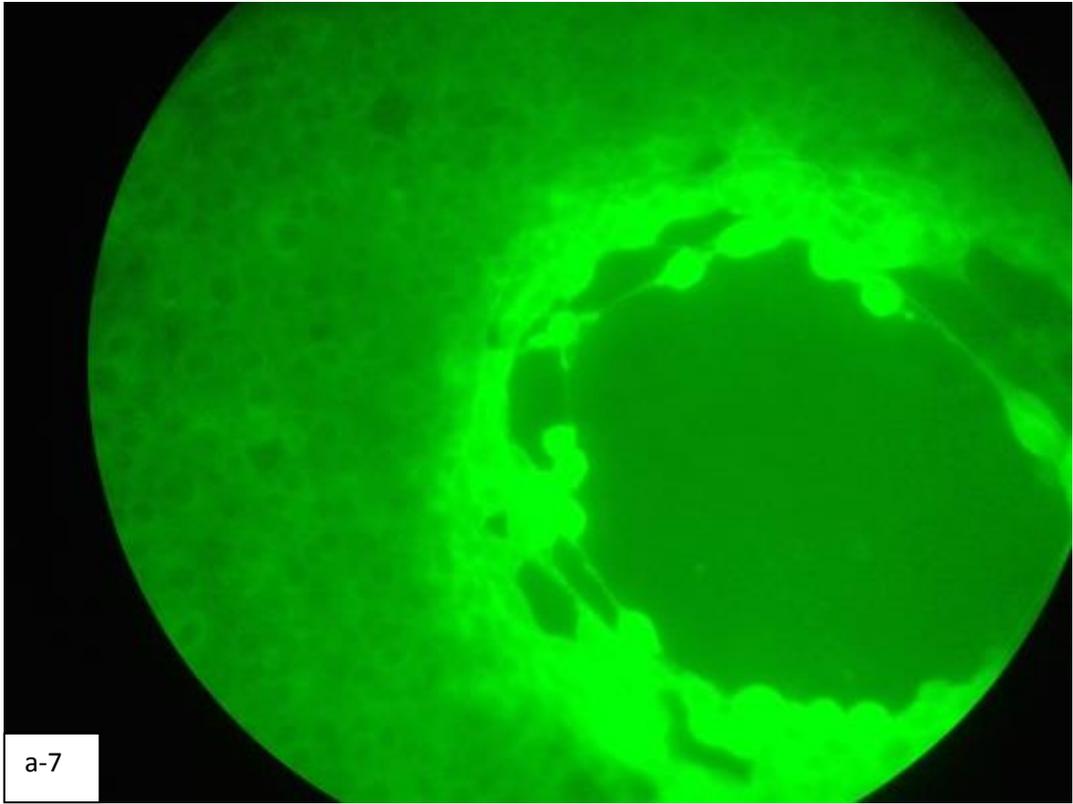


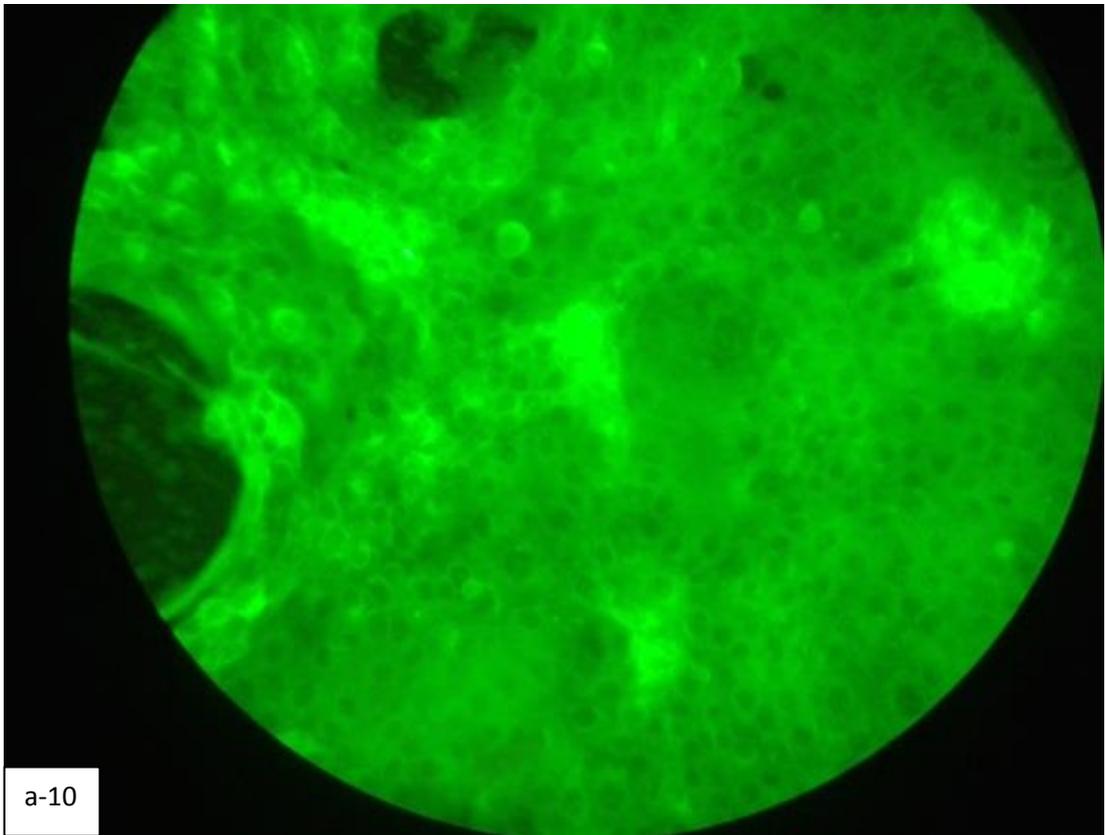
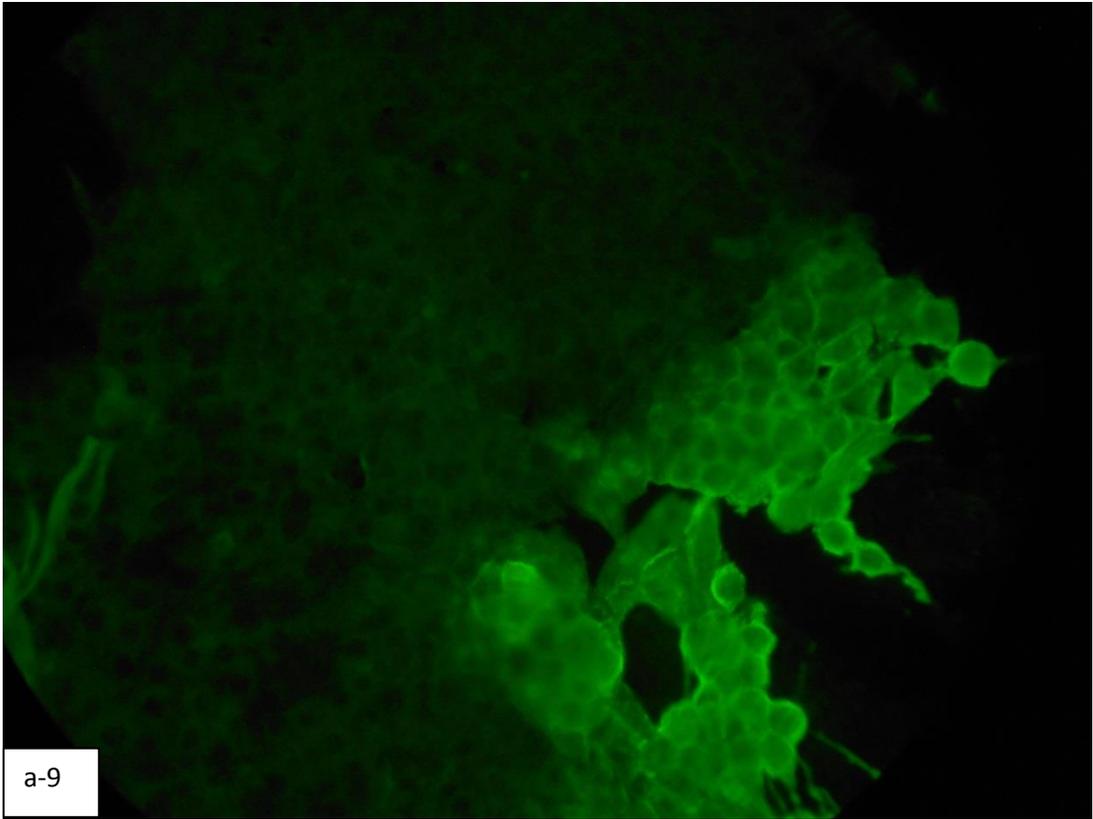
a-3

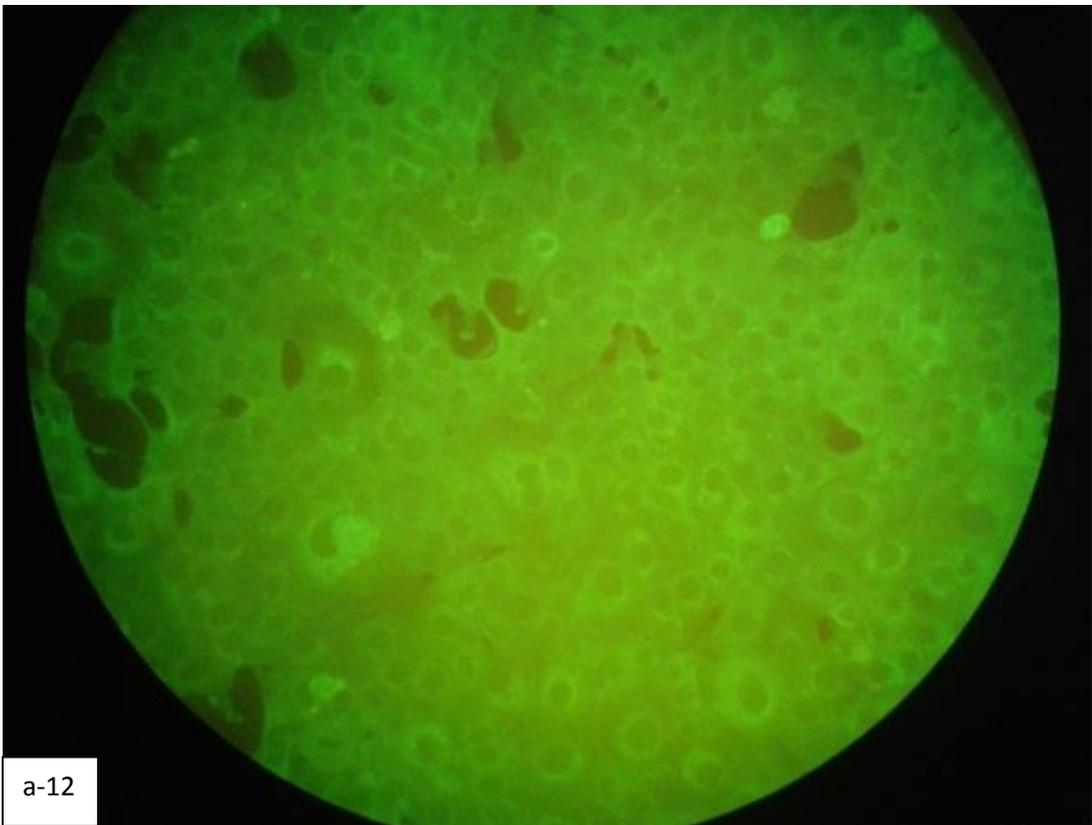
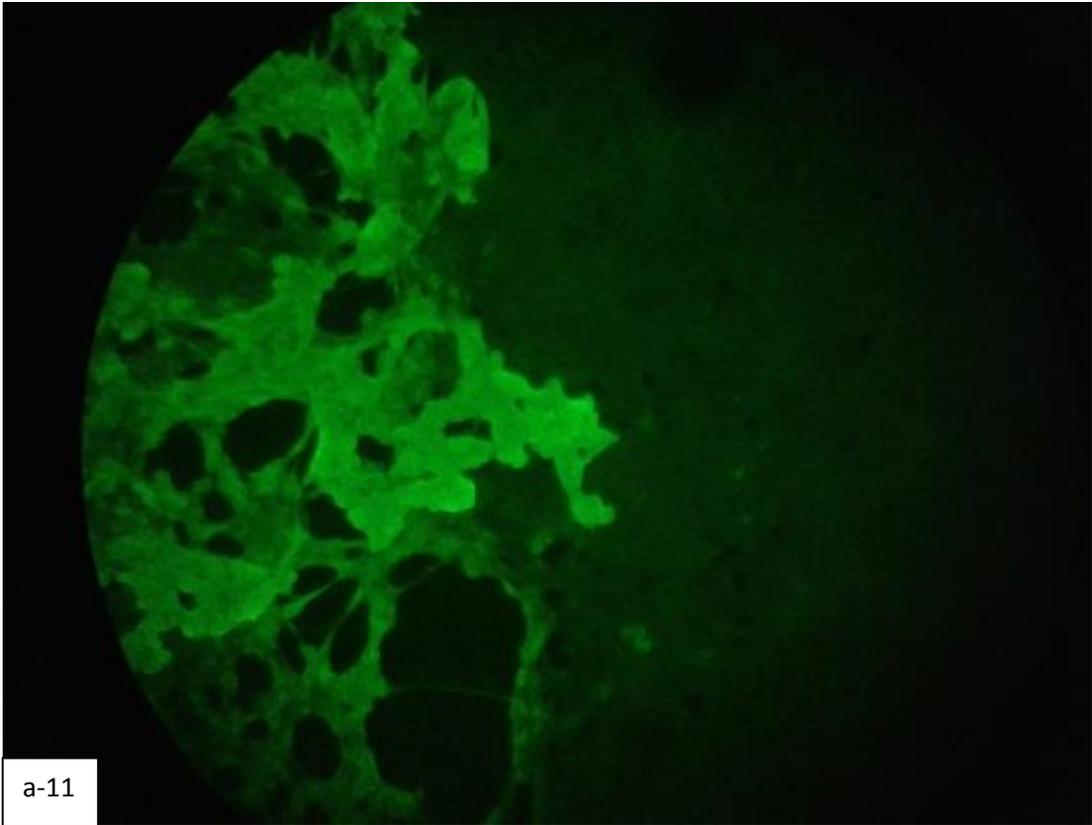


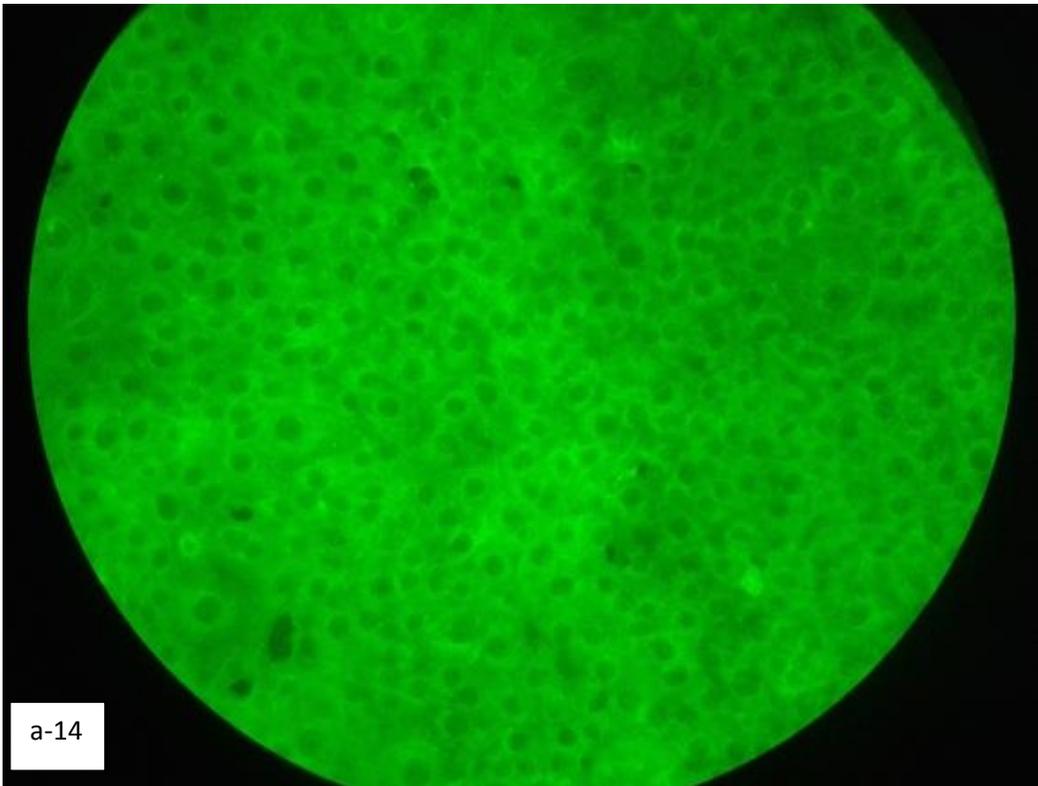
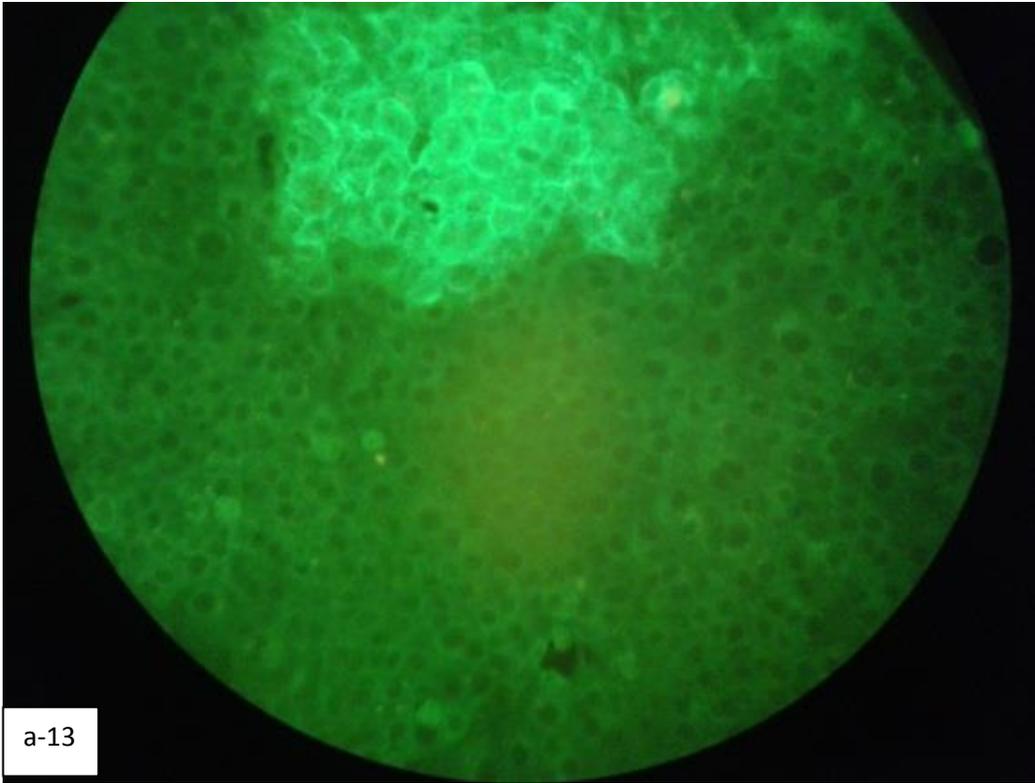
a-4

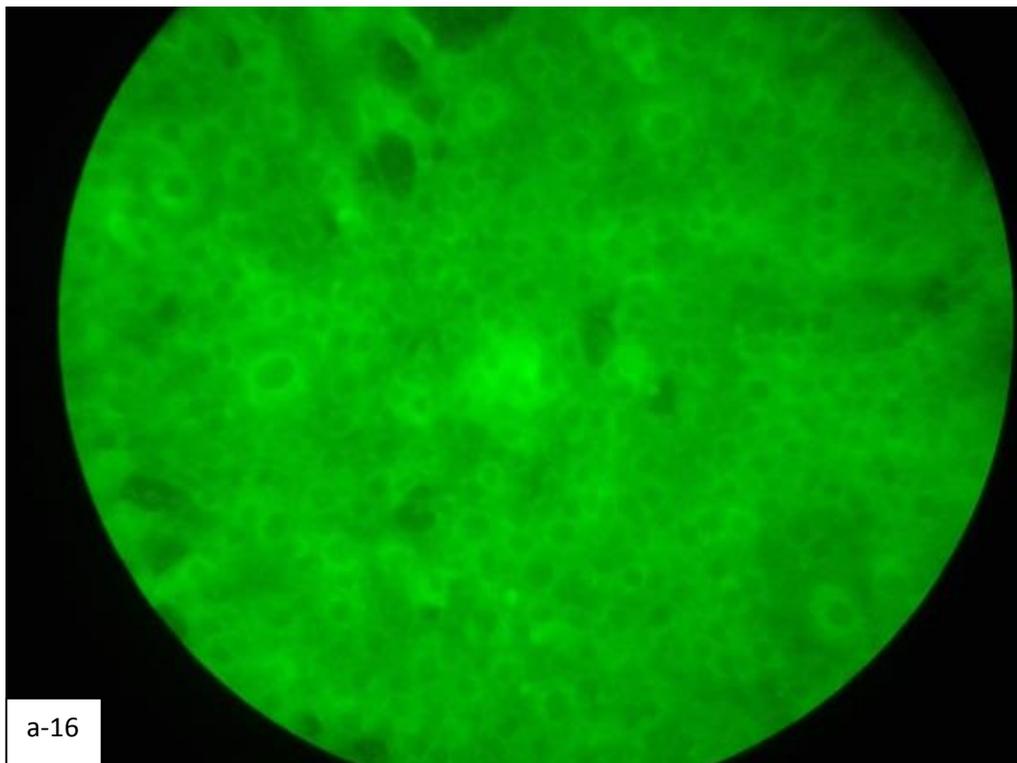
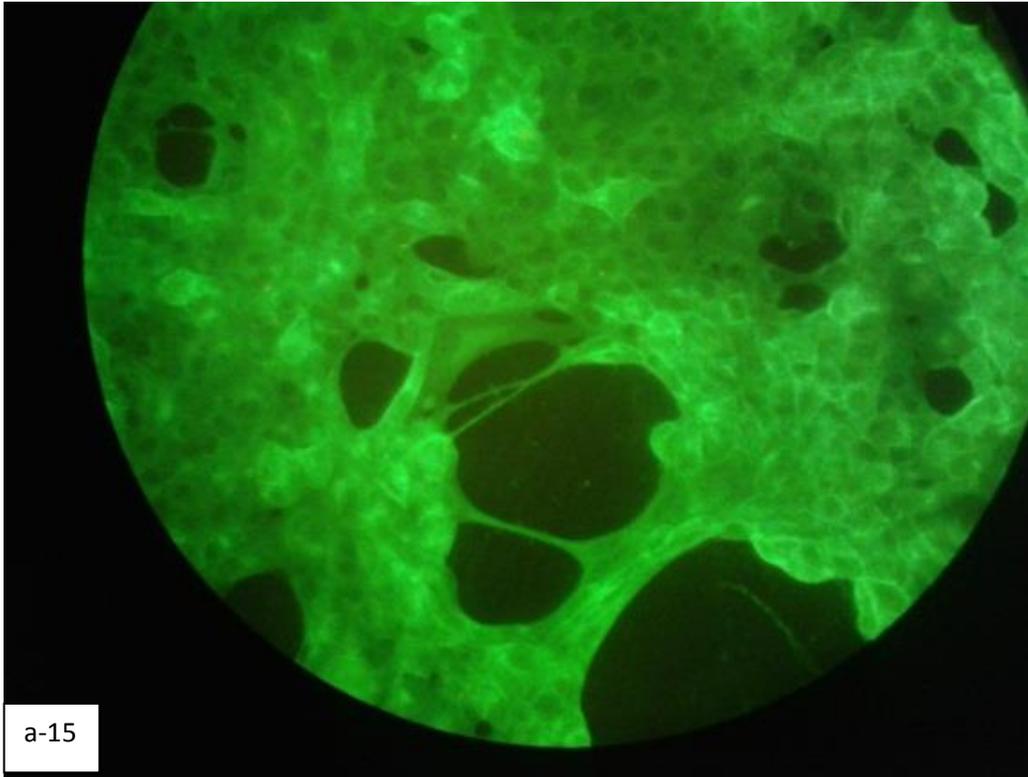


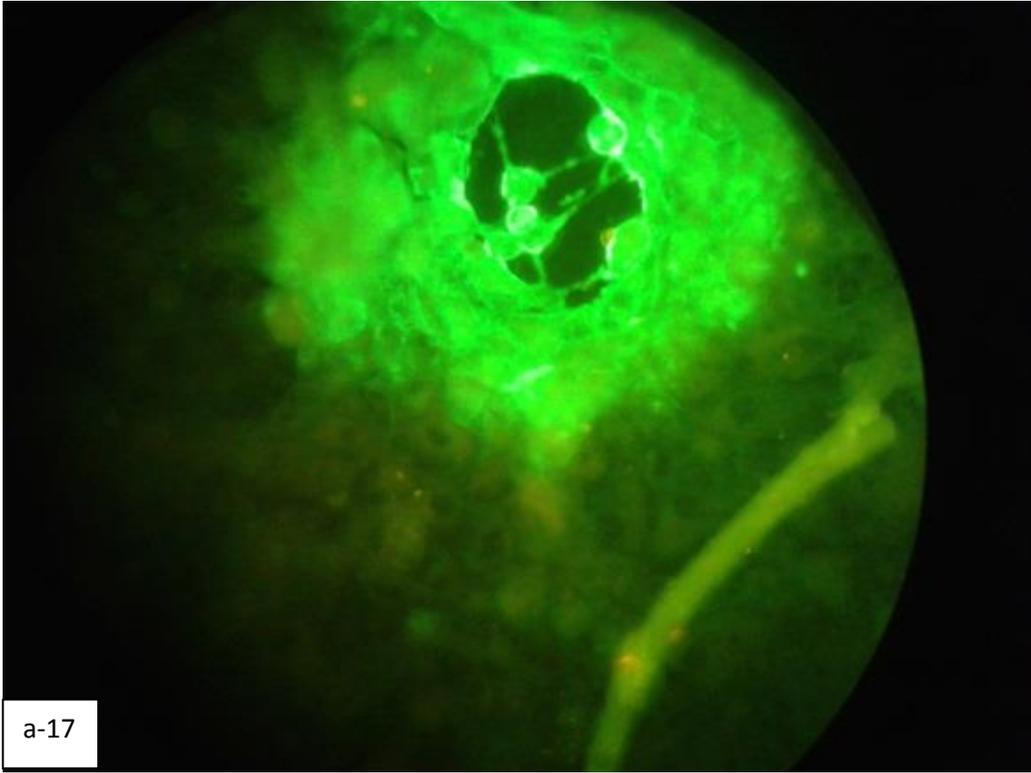




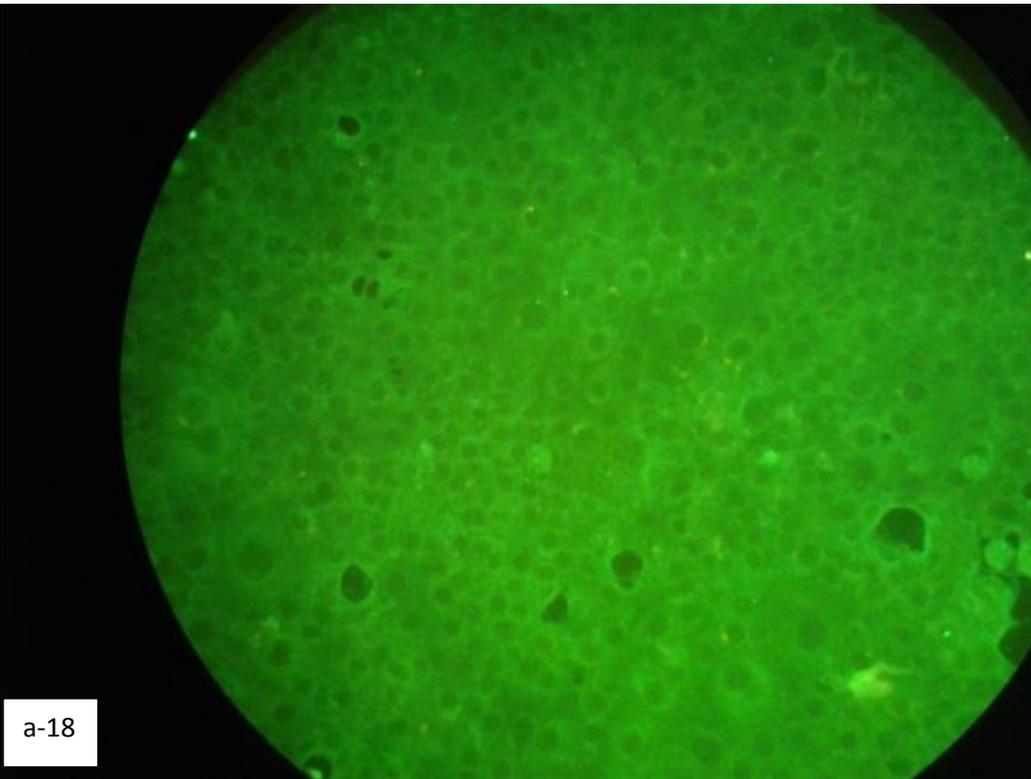








a-17



a-18

