

01663



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PRUEBAS DE
INMUNOPEROXIDASA E INMUNOFUOROSCENCIA Y
SU CONCORDANCIA CON LA PRUEBA DE
SERONEUTRALIZACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE LA
RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA.**

**T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS:
MEDICINA PREVENTIVA
PRESENTANDO POR
MVZ ALFA BRACHO CÁRDENAS**

DIRECTOR DE TESIS:
MVZ. MSP. CARLOS JULIO JARAMILLO ARANGO
MVZ. MCV. ARTURO OLGUIN Y BERNAL
MVZ. MC. DR. JUAN ANTONIO MONTAÑO HIROSE
MVZ. MC. DR. JOSÉ JUAN MARTÍNEZ MAYA



MEXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



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.

ÍNDICE

Resumen.....	II
Introducción.....	1
Objetivos.....	8
Hipótesis.....	9
Material y Métodos.....	10
Resultados.....	14
Discusión.....	19
Literatura citada.....	24
Anexo 1.....	31
Figura 1.....	32
Figura 2.....	33

RESUMEN :

El presente trabajo compara la sensibilidad (Se), especificidad (Es), valor predictivo positivo (Vp+) y valor predictivo negativo (Vp-) de las pruebas de inmunoperoxidasa (IP) e inmunofluorescencia directa (IF) para diagnóstico de IBR en fetos bovinos, tomando como prueba estándar el diagnóstico de aislamiento viral (AV), así como la correlación de estos resultados con los de seroneutralización (SN) en los sueros de sus progenitoras. Se evaluaron 49 fetos abortados durante el período de estudio, a cada uno se le tomaron muestra de hígado, bazo, riñón y pulmón; se obtuvieron tres muestras de suero de las madres de cada uno de los fetos con intervalo de un mes entre ellas, tomando la primera el día del aborto. Las muestras se recolectaron en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca Hidalgo y las técnicas diagnósticas se realizaron en el Centro Nacional en Servicio de Diagnóstico en Salud Animal, las cuales se llevaron a cabo conforme a lo establecido en el mismo Centro de acuerdo a la Oficina Internacional de Epizootias. Se obtuvieron 29 aislamientos virales de IBR de 49 fetos analizados. La técnica de IP tuvo Se de 96.7% y Es de 20%, Vp+ del 64.4% y Vp- del 80%; IF tuvo Se de 24.1% y Es de 70%, un Vp+ de 53.8% y Vp- del 38.9%; la correlación para ambas pruebas fue pobre ($K=0.19$, $p=0.002$ y $K=0.0521$, $p=0.6720$ respectivamente). Por órgano las muestras de hígado y riñón fueron las que mejor se evaluarón para diagnóstico de IBR por IF e IP respectivamente. La correlación para SN solo fue significativa en el primer muestreo a un título 1:32 ($K=0.27$, $p=0.04$); IF e IP con respecto al AV no fueron significativas. Los resultados obtenidos no permiten recomendar las pruebas para el diagnóstico de IBR en las condiciones evaluadas, particularmente en animales vacunados. Por lo tanto, es necesario mejorar estas pruebas o desarrollar otras para que tengan una mayor sensibilidad y especificidad aun cuando la vacunación y el deterioro de la muestra estén presentes.

SUMMARY:

This paper compares the sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (Vp+) and negative predictive value (Vp-) of immunoperoxidase (IP) and direct immunofluorescence (IF) tests to diagnose IBR in bovine fetuses, using as a standard test diagnosis through viral isolation (VI), as well as the correlation between these results and seroneutralization (SN) results in their mothers' serums. Forty-nine miscarried fetuses were evaluated during the time the study was conducted; a sample was taken from each fetus' liver, spleen, kidney and lungs; three serum samples were taken from the mother of each fetus with a one month interval between them, with the first sample taken on the day of the miscarriage. The samples were collected at the *Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca Hidalgo* [Agricultural, Livestock and Industrial Complex in Tizayuca Hidalgo], and the diagnostic techniques were conducted at the *Centro Nacional en Servicio de Diagnóstico en Salud Animal* [National Animal Health Diagnostic Service Center], as established in the same center in accordance with the International Office of Epizootics. Twenty-nine IBR viral isolations were obtained in 49 examined fetuses. The IP technique had 96.7% Se and 20% Sp, 64.4% Vp+ and 80% Vp-; IF had 24.1% Se and 70% Sp; 53.8% Vp+ and 38.9% Vp-; the correlation for both tests was poor ($K=0.19$, $p=0.002$ and $K=0.0521$, $p=0.6720$ respectively). By specific organ, the liver and kidney samples were the ones with the best evaluation to diagnose IBR through IF and IP respectively. The correlation for SN was significant only in the first sampling at 1:32 ($K=0.27$, $p=0.04$); IF and IP with regard to VI were not significant. The results obtained do not allow recommending the tests to diagnose IBR in the conditions evaluated, particularly in the case of vaccinated animals. Therefore, it is necessary to either improve these tests or develop other tests with greater sensitivity and specificity, even if vaccination and deterioration of the sample are present.

El autor de consentimiento a la División de Estudios de Postgrado e Investigación de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis este disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

Alfa Bracho Cárdenas

NOMBRE y FIRMA DEL AUTOR

DEDICATORIA:

A LA MEMORIA DE MI MADRE

PARA RICARDO Y ALFITA

AGRADECIMIENTOS:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de Beca-crédito para la realización de los estudios de postgrado.

Al Centro Nacional en Servicios de Diagnóstico en Salud Animal- al laboratorio de Virología y Patología (CENASA). Por el apoyo brindado para la elaboración práctica de la tesis: Estudio comparativo de las pruebas de Inmunoperoxidasa e Inmunofluorescencia y su concordancia con la prueba de seroneutralización para la detección de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina.

Al Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca-Hidalgo: Laboratorio de Patología y Diagnóstico, Sanidad Animal; por la obtención de las muestras.

Al Departamento de Medicina Preventiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

A los profesores del Departamento de Medicina Preventiva de la FMVZ-UNAM.

A la Comisión México estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y Otras Enfermedades Exóticas, al laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la donación de células MDBK.

A mis asesores por el apoyo ofrecido para la realización de este trabajo:

MVZ. MSP Carlos Julio Jaramillo Arango
MVZ .MC Arturo Olguin y Bernal
MVZ .MC. DR Juan Antonio Montaña Hirose
MVZ. MC. DR José Juan Martínez Maya

INTRODUCCIÓN:

El tracto respiratorio del bovino es susceptible a la acción de numerosos agentes infecciosos, los cuales se pueden presentar solos o en combinaciones cuyos cuadros clínicos se caracterizan generalmente por altas tasas de morbilidad y mortalidad, a menudo potenciadas por factores ambientales adversos (Aguilar 1987; Wohlgemuthk 1994; Avila 1995; Babiuk et al., 1996).

Uno de los agentes vírales de importancia en brotes de enfermedades respiratorias del bovino es el Herpes Bovis I de la familia *Herpesviridae*, el cual ocasiona una enfermedad infecciosa llamada rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR). Se han detectado otros tipos de herpes virus presentes en esta enfermedad dependiendo de su análisis genómico y tipo antigénico; así tenemos que el BHV-1 ha sido dividido en BHV-1.1 y BVH-1.2 que a su vez es subdividido en subtipo BVH-1.2a y BHV-1.2b (Barr,2000), cuyas manifestaciones clínicas y curso de la enfermedad dependen del sitio anatómico de la infección, la edad y el estado inmune del hospedador (Bernardo 1994; Van Der Poel y Kramps 1995), produciendo una variedad de manifestaciones clínicas incluyendo un cuadro clínico respiratorio (rinotraqueitis, conjuntivitis) y genital (vaginitis, epididimitis, orquitis e interrupción de la gestación –aborto-), enteritis y enfermedad sistémica (Bernardo 1994; Barr 2000).

Existen evidencias que sugieren la asociación entre los subtipos BHV-1.1 y 1.2 en varios síndromes clínicos; el subtipo BHV-1.1 ha estado ligado a enfermedad respiratoria (IBR) caracterizándose por afectar vías respiratorias altas donde ocasiona edema, hemorragia, inflamación y necrosis de la mucosa del tracto respiratorio, mientras que el subtipo BHV-1.2 ha sido asociado con enfermedad genital como las lesiones pustulosas en los órganos genitales del bovino. El subtipo BHV-5 causa en terneros una encefalitis e infección generalizada con diarrea; en el ganado de engorda una gastroenteritis ulcerativa crónica (Domínguez et al.,1994; Bernardo 1994; Avila 1995; Babiuk et al., 1996, Barr 2000).

Este virus tiene un periodo de incubación de 21 días aproximadamente (OPS,1986). La infección puede ocurrir en forma subclínica (Barr,2000), caracterizándose por la interrupción de la gestación, la cual afecta del 25 al 50% de las vacas gestantes, cuya prevalencia en los hatos depende de varios factores, los más importantes son el estado inmune de la madre, el periodo de la gestación en que ocurra la infección o se manifieste ésta, el tropismo y la virulencia del agente (Barr, 2000). Si la infección se establece tempranamente en la gestación resulta en reabsorción embrionaria, si la muerte ocurre en los dos primeros trimestres de la gestación (cuando la gestación es dependiente del cuerpo lúteo por progesterona) el intervalo entre la muerte fetal, la luteolisis y la expulsión es suficiente para la autólisis fetal. Generalmente el aborto ocurre en el tercer tercio de la gestación, en un tiempo no mayor a tres semanas post-infección en el cual el feto está autolizado (Aguilar 1987; Barajas 1993; Bernardo 1994; Domínguez et al., 1994; Barr 2000).

La transmisión se realiza a través de secreción respiratoria, ocular o del aparato reproductor como el semen, también el transplante de embriones y las operaciones obstétricas (Howard 1993 ; Falcón et al., 1994).

Una característica del virus es su persistencia, se mantiene en los rebaños por infecciones latentes ya que los bovinos se vuelven portadores después de la infección con cepas de campo que se reactivan ocasionalmente bajo diversos estímulos con la consecuente replicación viral a través de los tractos respiratorio y reproductor, lo cual favorece la transmisión a los animales susceptibles. Esta situación hace que sea una enfermedad de gran difusión y de muy difícil control (Pastoret 1982; Aguilar 1987; Howard 1993; Falcón 1994; Justtiny).

La importancia de la IBR 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 (Wholgemonth 1994; Avila, 1995). La IBR pertenece al grupo II de notificación según la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y al grupo B del Código Zoosanitario Internacional; se considera como una enfermedad enzoótica de notificación obligatoria mensual y que tiene efecto significativo en la producción pecuaria e importancia estratégica para las acciones de salud animal en cada país (OPS 1986; Bernardo 1994; OIE 1995).

Esta enfermedad probablemente se introdujo a México por la importación de becerras y semen provenientes de E.U.A. y Canadá, bajo una inadecuada vigilancia epizootiológica en las fronteras (Bernardo 1994; OIE 1995). La primera notificación en México fue en 1971, en un hato del Estado de México que tenía vacas lecheras importadas de E.U.A. Sin embargo se tienen evidencias clínicas de la enfermedad desde 1969. En 1974 se aisló el virus en los estados de México y Puebla, de animales provenientes de Canadá (Brock 1989; Domínguez et al., 1994; Falcón et al., 1994; Avila 1995).

Desde entonces, diversos investigadores la han notificado en 19 estados de la República Mexicana, los cuales encontraron el 57% de positividad (Domínguez et al., 1994; Vilchis et al., 1985). Barajas et al., (1993) encontraron una prevalencia menor al 5% en el trópico. Sin embargo el mismo autor ha encontrado hasta un 55% en el altiplano¹.

En las muestras enviadas al Centro Nacional en Servicio de Diagnóstico en Salud Animal de enero de 1992 a febrero de 1996 se obtuvo una frecuencia de positividad del 56.53% en 18 estados de la república. ²

¹ Comunicación personal, Barajas Rojas, José Alfonso, FMVZ-UNAM, 1999.

² Libro de resultados, Centro Nacional en Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, CENASA.

Con los pocos estudios realizados no se puede determinar con precisión la prevalencia de esta enfermedad, la cual se considera por encima del 40% (Domínguez et al., 1994), pero sí indican que se encuentra en gran parte del territorio nacional.

Las técnicas que comúnmente se utilizan para diagnóstico de la IBR son:

Serológicas:

Seroneutralización

Fijación del complemento

ELISA

Etiológicas:

Virus neutralización

Aislamiento viral

Inmunofluorescencia

Inmunohistoquímica

(Murphy, 1993; Barr, 2000).

En México, las pruebas de seroneutralización y ELISA se realizan en forma rutinaria para el diagnóstico de la IBR y ocasionalmente la prueba de fijación del complemento. Sin embargo algunos autores mencionan que el diagnóstico de abortos solamente puede ser confirmado por examen de tejido fetal (Barr, 2000). Aunque los diferentes aislamientos vírales obtenidos de distintas formas clínicas de la enfermedad difieren en su afinidad por los distintos órganos, resultan serológicamente idénticas (Babiuk et al., 1996).

La prueba de seroneutralización emplea la propiedad de los anticuerpos de bloquear el efecto del virus infeccioso para emplearse en cultivo celular o *in vivo* (Carmel et al., 1992). Según Smith et al. (1990) con una incubación de 24 h esta prueba mostró una sensibilidad del 94.4% y una especificidad del 93.2% y con una incubación de 1 h una sensibilidad del 89.2% y una especificidad cercana al 100% (Smith, 1990). Los títulos de anticuerpos maternos indican los resultados de la prueba a la exposición, pero solamente es certero en hatos donde no tienen historia de vacunación o exposición previa (Barr, 2000).

La prueba de inmunofluorescencia es utilizada para la identificación rápida de antígenos y anticuerpos en material infectado fresco (riñón y glándulas adrenales) o procesado (higado, riñón, placenta, bazo) (Brock y Potgiet 1989; Bratanich et al., 1990; Delgado et al., 1990; Barr 2000), esta prueba utiliza anticuerpos marcados para hacerlos visibles con luz ultravioleta; la prueba indirecta de inmunofluorescencia es más sensible que la directa (Delgado et al., 1992; Babiuk et al., 1996). Esta técnica en examen directo de secciones congeladas de riñón fetal tiene una efectividad de más del 90% para el diagnóstico de la infección por IBR ; la prueba de inmunofluorescencia tiene una sensibilidad del 67% (Smith et al., 1989).

Para la realización de la técnica de inmunoperoxidasa se realizan preparaciones permanentes procesadas en forma convencional en las que se requiere únicamente del microscopio óptico para su observación; el marcado de los anticuerpos se realiza con peroxidasa de rábano picante, que produce una reacción coloreada en presencia del cromógeno (Gimeno et al., 1988; Cheng-feng et al., 1988; Smith et al., 1989, Fenner y Bachmann 1992; Edwards 1994; Ikam M). Esta prueba tiene según Smith et al., (1989) una sensibilidad del 94%.

El aislamiento viral es caro y la identificación del virus precisa al menos una semana; las muestras deben congelarse a -70°C , emplea cultivos celulares en monocapa, homólogos y primarios o de bajo número de pases obtenidos a partir de tejidos fetales los cuales representan el sustrato más sensible para el aislamiento de la más amplia variedad de virus; los cultivos se incuban a 37°C y se observa diariamente para comprobar la aparición de efecto citopático, este efecto debe valorarse en comparación con cultivos no inoculados llamados testigos negativos, especialmente en casos de virus que precisan periodos de incubación superiores a una semana (Piacenza 1988; OIE 1995; Blaha y Thomas 1995).

El "Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines" recomienda la prueba de seroneutralización a nivel oficial, la cual ha sido aceptada internacionalmente como prueba de referencia para la detección de la IBR (Calero 1989; OIE 1995). Sin embargo, las dificultades de su implementación, así como la celeridad en la obtención de los resultados, determinan la optimización de una prueba alternativa de equivalente valor o mejor especificidad y sensibilidad (Kramps et al., 1996). Además, la seroneutralización no hace diferencia entre individuos vacunados o infectados con cepas de campo.

Para validar una prueba y poder discriminar entre individuos infectados y no infectados, se puede medir y expresar su habilidad para clasificar en forma correcta a estos individuos, mediante la sensibilidad y especificidad comparadas con la del criterio de referencia (Hird 1995; Hirsch y Riegelman 1995). El valor predictivo de una prueba en términos clínicos significa la probabilidad de que la enfermedad esté presente o ausente antes y después de obtener los resultados de la prueba; este valor predictivo nos dice qué proporción de animales positivos están realmente infectados y qué proporción de animales negativos realmente no están infectados (Morris 1985; Guerrero et al., 1986; Moreno y Valle 1994; Sacket et al., 1994; Beaglehole y Bonita 1994; Hird 1995; Hirsch y Riegelman 1995).

La prueba en estudio por sí sola no puede considerarse como la demostración definitiva de la infección; es decir, no se puede establecer el diagnóstico si no se compara con otra prueba cuya sensibilidad y especificidad estén ya establecidas. A esta prueba se le han dado varios nombres como: "prueba ideal, prueba de oro, prueba de referencia, estándar diagnóstico ideal, gold standard" entre otras. Casi siempre este estándar diagnóstico ideal es de un alto costo, o bien el riesgo que implica su ejecución es alto, lo cual obstaculiza que se realice en forma rutinaria (Morris 1985; Hird 1995; Hirsch y Riegelman 1995). Los animales en los que no se ha confirmado la certeza del diagnóstico mediante la prueba de oro, lo recomendable es no incluirlos en la investigación, ya que de esta manera se falsea la eficacia de la prueba (Guerrero et al., 1986; Hirsch y Riegelman 1995).

La IBR en la República Mexicana es una de las enfermedades infecciosas de mayor importancia en los hatos lecheros, ya que en la mayoría de los animales la enfermedad transcurre en forma subclínica, la cual tiene como principal característica o secuela el aborto y como consecuencia la pérdida de la cría y la lactancia, afectando los parámetros reproductivos y productivos e incrementando notablemente las pérdidas económicas. Esto contribuye a la importación de leche y animales de reemplazo. De hecho la importación de animales de reemplazo sigue siendo una fuente importante para la transmisión y propagación de la enfermedad y por lo tanto requiere de certificación y vigilancia (Bernardo 1994; Blaha y Thomas 1995). Por tales motivos es necesario contar con otro diagnóstico específico y sensible para detectar apropiadamente a los animales y fetos infectados, ya que los procedimientos actuales de diagnóstico son complicados costosos y generalmente tardíos para ser de algún valor en el control de un brote, de aquí la importancia del diagnóstico temprano y certero de la enfermedad que nos permitiría realizar estudios y establecer alternativas a las condiciones existentes, ya que esta enfermedad tiende a comportarse de diferente manera en cada región geográfica. El presente trabajo tuvo como objetivo comparar la sensibilidad, especificidad y el valor predictivo de las pruebas de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia y su concordancia con la prueba de seroneutralización para detectar a la IBR como causa de aborto, y tener bases suficientes para recomendar la prueba más adecuada para su identificación e implementarla en la red de diagnóstico.

OBJETIVOS:

Objetivo general:

Comparar la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de las pruebas de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia y su concordancia con seroneutralización para diagnóstico de la rinotraqueitis infecciosa bovina en el aborto.

Objetivos específicos:

- 1.- Determinar la frecuencia de IBR mediante las pruebas de inmunoperoxidasa directa, inmunofluorescencia directa y aislamiento viral en fetos abortados de vacas sospechosas a IBR y seroneutralización en los sueros de dichas vacas del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo.
- 2.-Comparar la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de las pruebas de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia con aislamiento viral como estándar diagnóstico.
- 3.-Determinar la concordancia de los resultados obtenidos mediante la prueba de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia en fetos abortados con la prueba de seroneutralización en suero de sus madres.

HIPÓTESIS:

1.-La prueba de inmunoperoxidasa es más sensible y específica que la prueba de inmunofluorescencia para detectar IBR.

2.-Existe correlación entre los resultados obtenidos mediante las pruebas de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia en los fetos abortados y los obtenidos mediante seroneutralización en las madres de dichos fetos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Tipo de estudio: Prospectivo comparativo

Limite de espacio y tiempo: El muestreo se realizó en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAIT) y fueron procesadas en el Centro Nacional en Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA).

Criterios de inclusión: Vacas y vaquillas que abortaron y sus respectivos fetos durante el período de estudio.

Unidad muestral: Hígado, bazo, riñón y pulmón de fetos abortados y suero de sus madres (Aguilar 1987; OIE 1995; Babiuk et al., 1996).

Diseño del muestreo: Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia en el que se incluyeron fetos abortados y las vacas progenitoras de los mismos a lo largo de un año, con la participación voluntaria de los ganaderos, los cuales informaron al laboratorio de patología y diagnóstico del CAIT el evento de aborto con su consecuente colección, tomando el mismo día muestra de la madre de dicho feto.

Obtención y manejo de las muestras: A cada feto recolectado se le realizó necropsia conforme a lo descrito por Aline S. De Aluja (1980), con el objeto de diseccionar aproximadamente 2 cm³ de hígado, bazo, riñón y pulmón, los cuales fueron colocados en frascos de vidrio estériles identificados y guardados en congelación a -4°C. A cada vaca progenitora se le tomaron 10 ml de sangre el día del aborto, mediante punción en la vena coccígea. Obtenida la sangre, se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos, para la obtención del suero el cual se colocó en viales estériles. Este proceso se repitió a los 30 y 60 días después del aborto; las muestras se conservaron en congelación a -4°C.

Las muestras se transportaron en cajas de poliuretano con refrigerantes y la historia clínica correspondiente al CENASA para realizar las pruebas diagnósticas, en el cual, si no se trabajó la muestra inmediatamente, se guardó a - 70°C hasta su proceso. Las muestras se seleccionaron por conveniencia, ya que aquellas en que la autólisis de los órganos fue severa a la observación directa, se excluyeron del muestreo.

Métodos diagnósticos: Aislamiento viral (AV), inmunoperoxidasa en placa (IPP), inmunoperoxidasa directa (IP), inmunofluorescencia directa (IF) y seroneutralización (SN) conforme a las técnicas establecidas en el CENASA (OIE 1990; OIE 1995; FAO).

Proceso de las muestras: Para el AV se realizó un macerado con aproximadamente 0.5 g de cada órgano de feto (2g en total) en 18 ml de MEM y 0.2 ml de bicarbonato al 2%, se homogenizó y se filtró en una membrana de 0.22 μm y posteriormente en una membrana de 0.45 μm de porosidad; la técnica se realizó según la OIE (Gimeno 1988; OIE 1990; OIE 1995; Macías et al., 2000; Justtiny).

Se utilizaron las líneas celulares MDBK y PK15 inoculándose 5 botellas de 5 ml por línea celular y por muestra, las cuales se observaron diariamente durante cinco días para detectar efecto citopático. Si no hubo efecto durante estos días se realizaron de tres a cinco pases por muestra de feto; simultáneamente se realizó inmunoperoxidasa en placa de 96 pozos para evidenciar que el aislamiento viral fuera de IBR, por lo cual se utilizó un microscopio con objetivo panorámico seco débil y seco fuerte.

Para las técnicas de IP e IF se realizaron tres cortes por congelación de 3-5 μm por órgano/muestra para cada prueba. Se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Zeiss 466301-9901) y un microscopio óptico con objetivos seco débil, seco fuerte e inmersión (Olympus) para IF e IP respectivamente (Justtiny; OIE 1995; FAO).

Se consideró una muestra positiva cuando al menos en una de las cuatro muestras de órgano de un solo feto dio una reacción positiva a IP y a IF directa .

La prueba de SN se realizó conforme a lo establecido por la OIE (OIE 1990; Edwards 1994; OIE 1995; Eernisse y Erickson; FAO) con un título de corte de negativo arriba de 1:128. El suero hiperinmune utilizado para la realización de las pruebas se trabajó con una dilución de referencia de 1:520 (Perrin et al., 1994).

Para la comparación de las pruebas, el AV se utilizó como estándar diagnóstico ideal (prueba con sensibilidad y especificidad cercana al 100%) (Guerrero et al., 1986; Cheng-feng et al., 1988; Gimeno et al., 1988; Piacenza 1988; Beaglehole y Bonita, 1994; Hird 1995; Hirsch y Riegelman, 1995; Greenberg 1995).

Variables de estudio: Diagnósticos positivos o negativos de las pruebas de aislamiento viral, inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia (variables cualitativas nominales) y títulos de anticuerpos de la prueba de seroneutralización (variable cuantitativa continua).

Estandarización: Inicialmente, para estandarizar la prueba de IP se utilizó un becerro raza Holstein-Friesian de 2 meses de edad, no calostrado ni vacunado, que fuera libre de IBR, para lo cual fue probado por ELISA y SN para confirmar su estado no inmune contra el virus.

El becerro se instaló en las corraletas de alta seguridad del CENASA; una vez ambientado, a los dos días se le inoculó por vías nasal y conjuntival un total de 5 ml de HVB-1 (herpes virus bovino-1) cepa Colorado 758 con un título de $10^{6\pm 1}$ DL₅₀ /ml. Además se le aplicaron corticoesteroides durante tres días (Pastoret et al., 1980, 1982; Edwards et al., 1983; Moraga et al., 1990). A las 24 h de la aplicación se identificaron signos característicos de la enfermedad en vías respiratorias altas como secreción nasal, conjuntival, tos, alza de temperatura y laceraciones en rodetes dentarios (Pastoret et al., 1980; 1982).

Se tomó diariamente la temperatura, así como muestras de suero el día cero, 8 y 16 post-inoculación para detectar la respuesta inmune por medio de la técnica de SN, encontrando valores 1:2, 1:4, 1:8 respectivamente (Perrin et al., 1994; Kramps et al. 1996).

El becerro se sacrificó humanitariamente cuando presentó una temperatura de 41.5°C (viremia) y mediante la necropsia se obtuvieron muestras de hígado, bazo, pulmón y riñón para histopatología y virología; tanto a la necropsia como a la histopatología no se encontraron cambios patológicos aparentes (Pastoret, 1982). En el laboratorio de virología del CENASA, las muestras obtenidas se sometieron a las pruebas de IP directa e indirecta, IF directa y AV para confirmar la presencia del virus (Edwards et al., 1983). Los controles negativos se obtuvieron de vacas libres a IBR que se encontraban en las áreas de producción de inmunógenos en el CENASA; estas áreas están libres de todo patógeno infeccioso. Los órganos se compararon con órganos de animales de engorda de una zona libre de IBR los cuales se consiguieron en el rastro.

Análisis Estadístico:

Al comparar IP e IF directa con el AV se obtuvieron las proporciones de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos, falsos negativos y en consecuencia la sensibilidad, especificidad y valores predictivos en cada prueba. Con estos resultados se compararon las pruebas de IP e IF y se calculó el Índice de Concordancia Bruta (ICB) y la concordancia por prueba de Kappa (K) con SN (Guerrero et al., 1986; Galen et al., 1986; Piacenza 1988; Thrusfield 1990; Morton y Hebel 1993; Beaglehole y Bonita 1994; Hird 1995; Hirsch y Riegelman 1995).

Los resultados de SN se analizaron conforme a lo descrito por Rodman y White (1973).

Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa EPIinfo 6.

Las fórmulas empleadas para el cálculo de la Se, Es, Vp+ y Vp- se muestran en el anexo 1.

RESULTADOS.

En el periodo de estudio se obtuvo un total de 86 muestras de fetos abortados, de las cuales sólo fue posible analizar 49, debido al grado de autólisis que presentaron algunas muestras.

Aislamiento Viral:

De las 49 muestras de fetos analizadas, en 29 (59%) fue posible obtener el aislamiento del virus de la IBR (cuadro 1).

Inmunofluorescencia e Inmunoperoxidasa:

El 26.5% de las muestras fueron positivas por IF y el 89.7% a IP (cuadro 1).

Al analizar cada prueba por órgano, se encontró que para IF la frecuencia de positividad varía del 13% al 18% para riñón e hígado respectivamente, sin encontrar diferencia significativa ($p=0.9205$) (cuadro 2).

Para IP por órgano se encontró una variación de positividad del 42% al 74% en hígado y riñón respectivamente, dicha variación fue significativa ($p=0.012$) (cuadro 2).

Sensibilidad, Especificidad y Concordancia entre Aislamiento Viral e Inmunofluorescencia:

La prueba de IF presentó Se de 24.1% y Es de 70%, $Vp+$ de 53.8% y un $Vp-$ de 38.9%; la concordancia por índice de Kappa entre ambas pruebas fue de -0.052 la cual no fue significativa ($K=-0.052$, $p=0.64$) (cuadro 3).

Por órgano, IF presenta muy baja Se ya que va del 10 al 20% mientras que la Es va del 79 al 88% para bazo y pulmón respectivamente, en todos los órganos la concordancia por índice de Kappa con el aislamiento viral no fue significativa (cuadro 4).

Sensibilidad, Especificidad y Concordancia entre Aislamiento Viral e Inmunoperoxidasa:

La prueba de IP presentó Se del 96.6% y Es del 20% un Vp + de 64.6% y un Vp - de 80%; La concordancia por índice de Kappa entre ambas pruebas fue 0.187 la cual no fue significativa (K=0.187, P= 0.02) (cuadro 3).

Por órgano, IP presenta variaciones en su sensibilidad, especificidad y valores predictivos, teniendo la mejor respuesta en hígado con una concordancia significativa (K=0.3827, p= 0.0033) (Cuadro 4).

Seroneutralización:

De los 49 fetos analizados sólo fue posible obtener muestras de suero de 38 de sus madres en el primer muestreo, 34 en el segundo y 26 en el tercero, ya que los ganaderos no permitieron la toma de más muestras.

El valor promedio de anticuerpos contra IBR de los animales que abortaron en general fue de 1:32 mientras que por muestreo fue de 1:25, 1:32 y 1:27 respectivamente (Pastoret, 1980).

Al comparar SN con AV se encontraron variaciones en su Se y Es las cuales fueron determinadas por diferentes puntos de corte. Los resultados mostraron una concordancia significativa sólo al considerar como positivos aquellos sueros del primer muestreo con valores de 1:32 o mayor (K = 0.27, P = 0.04), y aun en ese caso, destaca señalar que la sensibilidad fue de 68% y la especificidad de 61.5% (Cuadro 5)

Cuadro 1

Resultados obtenidos de 49 muestras de fetos abortados, por las pruebas de inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa y aislamiento viral para IBR, CAIT; México, 1997.

Resultados	IF	%	IP	%	AV	%
Positivos	13	26.5	44	89.7	29	59.1
Negativos	36	73.46	5	10.20	20	40.8
Total	49		49		49	

CAIT: Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca- Hidalgo; México.

Cuadro 2

Órganos de feto donde se probó la presencia del antígeno de IBR por las técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa, CAIT; México, 1997.

Órgano	Inmunofluorescencia				Inmunoperoxidasa			
	Positivo	Negativo	Total	%	Positivo	Negativo	Total	%
Hígado	8	36	44	18	18	25	43	42
Bazo	5	34	39	13	27	15	42	64
Riñón	6	31	37	16	31	11	42	74
Pulmón	6	35	41	14.6	19	20	39	49

CAIT: Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca- Hidalgo; México.

Cuadro 3

Sensibilidad, especificidad y valor predictivo de las pruebas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa y su concordancia con la prueba de aislamiento viral, CAIT; México, 1997.

	Se.%	Es.%	vp+.%	VP-.%	Con.Bru.%	Kappa	P
IF	24.1	70	53.8	38.9	42.8	0.0521	0.6720
IP	96.7	20	64.4	80	65.3	0.19	0.002

CAIT: Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca- Hidalgo; México.
Con.Bru.=concordancia bruta.

Cuadro 4

Sensibilidad, especificidad y valor predictivo de las pruebas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa y su concordancia con aislamiento viral por órgano, CAIT, Tizayuca-Hidalgo; México, 1997.

	INMUNOFLUORESCENCIA					
	Se.%	Es.%	Vp+ %	Vp- %	Kappa	p
Hígado	20	84	62.5	44.4	-0.0254	0.5999
Bazo	11.1	78.9	33.3	48.4	-0.1011	0.7938
Riñón	10	84.2	40	47.1	-0.5677	0.7055
Pulmón	16.7	88.2	66.7	42.9	0.0424	0.3308
	INMUNOPEROXIDASA					
	Se.%	Es.%	Vp+ %	Vp- %	Kappa	p
Hígado	59.3	88.4	84.2	56	0.3827	0.0033
Bazo	73.1	47.1	67.9	53.3	0.2055	0.0877
Riñón	84.6	41.2	68.8	63.6	0.2746	0.0290
Pulmón	42.9	44.4	47.4	40	-0.1259	0.7855

Se= sensibilidad
Es= especificidad
Kappa = Correlación

Vp+ = Valor predictivo postvivo
Vp-- = Valor predictivo negativo
p = Intervalo de Confianza

CAIT= Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca- Hidalgo; México

CUADRO 5

Resultados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de seroneutralización y concordancia con aislamiento viral CAIT; México, 1997.

Muestreo	1:4			1:8			1:16			1:32			1:64			1:128		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Sensib	96	100	94.4	92	91.3	88.9	76	78.3	77.8	68	69.6	55.6	48	50	44.4	40		
Esp	7.7	0	12.5	30.8	9.1	12.5	38.5	27.3	12.5	61.5	54.5	37.5	76.9	70	62.5	84.6		
Vp+	66.7	67.7	70.8	71.9	67.7	69.6	70.4	69.2	66.7	77.3	76.2	66.7	80	75	72.7	83.3		
Vp(-)	50	0	50	66.7	33.3	33.3	45.4	37.5	20	50	46.2	27.3	43.5	43.8	33.3	42.3		
Kappa	0.046		0.08	0.26	0.0048	0.01	0.15	0.16	-0.11	0.27	0.23	-0.06	0.21	0.17	0.05	0.19		
P	0.31	?	0.26	0.6	0.48	0.45	0.17	0.36	0.71	0.04	0.08	0.62	0.06	0.15	0.37	0.06		

CAIT, Centro agropecuario e industrial de Tizayuca-Hidalgo, México.

DISCUSIÓN:

En general las coloraciones obtenidas en los tejidos por IP fueron similares a las encontradas por Theodoris et al., (1985), (Figura 1). Incluso en una de las muestras se encontró una tinción intranuclear lo cual concuerda con lo señalado por Barr (2000) que pudo deberse al tipo de herpes virus presente en esta muestra (Moraga 1990 y Smith 1990) debido a que evidencias recientes sugieren que el análisis del virus con anticuerpos monoclonales permite clasificar al HVB-1 en varios subtipos, los que estarían relacionados con diferentes efectos dependiendo del lugar donde se encuentre éste habitualmente (Theodoris 1985 y Barr 2000).

Con relación a las características de la IP como prueba diagnóstica se encontró que la Se obtenida fue mayor (96.7%) a la encontrada por Smith et al.,(1990) y Delgado et al., (1992) los cuales determinaron una Se del 96% por avidina-biotina y del 83.3% por la técnica directa respectivamente. Sin embargo la Es encontrada (20%) fue menor a la notificada por Delgado et al., (1992) la cual fue cercana al 100% . La alta cantidad de falsos positivos derivada de la baja especificidad posiblemente se debió a una coloración inespecífica focal que proporciona la muestra y que da la morfología de los vasos sanguíneos y la presencia de glóbulos rojos en éste, como lo ha mencionado Theodoris (1985) y Smith (1990). Otra posible explicación es que el suero y/o la muestra estuviesen contaminados con otro tipo de proteínas, como las de origen bacteriano y también a la posible reacción cruzada con otros herpes virus (Kelling, 1973). Otra causa en la variación de los resultados podría ser una baja concentración de anticuerpos en el suero que se emplea para revelar la presencia del antígeno, como lo menciona Kramps (1996). Además, puede no ser visible la coloración si la concentración de antígeno en el tejido es mínima, impidiendo que el conjugado detecte su presencia como lo señalan Kelling (1973) y Delgado et al.,(1992).

La IP realizada en placa para confirmar el aislamiento viral, favorece la posibilidad de encontrar el antígeno, ya que para elaborar esta técnica se realiza un macerado de todos los órganos ("pool"), mientras que la técnica directa en corte por congelación no garantiza que en la porción de tejido evaluada se encuentre el antígeno en animales seropositivos. Posposil et al., (1996) han demostrado la presencia del virus en el hígado, riñón, pulmón y otros órganos de fetos abortados de animales seronegativos y en algunos seropositivos infectados experimentalmente. En casos severos de autólisis y a la lisis provocada por la conservación de la muestra a -4°C, las muestras no pudieron ser evaluadas por IP ni por IF debido a que el tejido se desprendía al momento de lavarlo durante el proceso de las técnicas.

En los cortes de tejidos congelados, si bien no siempre se apreciaba la anatomía del órgano evaluado debido a la autólisis, esta condición no interfirió con la interpretación de la prueba de IP, ya que la coloración obtenida en los casos positivos fue muy evidente, por lo que todos los tejidos pudieron ser evaluados, no así con IF, en la cual ante condiciones de autólisis se observó coloración inespecífica de color rojizo, dificultando en la interpretación de los resultados, coincidiendo con Reed et al., (1970) y Theodoris et al., (1985). Cabe señalar que en las muestras que no presentaron una severa autólisis la fluorescencia encontrada fue focal y poco brillante distribuida uniformemente en núcleo y citoplasma, encontrándose consistentemente en riñón lo cual concuerda con lo encontrado por Reed et al., (1970) (Figura 2).

La Se y Es obtenidas por IF (24.1%, 70%) fueron menores a las encontradas por Smith et al., (1990) y Delgado et al., (1992) quienes obtuvieron una Se del 67% y 83.3% respectivamente, no así la Es ya que Delgado et al., (1992) encontró 100% bajo condiciones de laboratorio. La baja Se pudo ser debida a la autólisis de las muestras, así como a las mismas razones descritas para IP, así como al tratamiento que se le da a la muestra el cual puede afectar el sitio antigénico, y a

la calidad de los anticuerpos en el suero para revelar la presencia del antígeno (Kelling et al. 1973).

La correlación entre el aislamiento viral y la IF encontrada por Reed et al., (1970) fue de un 50%. Por su parte Bratanich et al., (1990) menciona una concordancia de 83%, la cual fue mayor a la encontrada en el presente estudio de sólo 42.9%.

En este estudio los órganos de elección para envío de muestras al laboratorio fueron el hígado, riñón y pulmón, lo que concuerda con lo señalado por Smith et al., (1990).

La variación en los valores de SN que van de 1:2 hasta mayores de 1:128 en las vacas al momento del aborto, coinciden con lo señalado por S. Van Drunen et al., (1997). Un problema con la evaluación serológica estuvo dado al tratar de diferenciar los sueros positivos, debido a que podían encontrarse anticuerpos inducidos por infección natural o por vacunación, sobre todo si se considera que los títulos pueden ser semejantes en la vacunación como en la infección natural (Kaashoek, 1996). Cabe señalar que en el CAIT al principio del muestreo algunos animales fueron inoculados con vacuna atenuada termosensible, y durante el estudio en todas las vacas se utilizó vacuna inactivada o modificada, incluso en algunos casos los animales fueron vacunados con los dos tipos de vacuna.

Destaca el hecho de que cualquiera de las vacunas aplicadas genera una respuesta observable hasta por más de treinta meses (Kelling 1973; Sweat 1983; Van der poel 1995; Kaasshoek 1996; Baker 1998; Pfahler et al.).

Si bien se ha mencionado que ciertos tipos de vacunas puede provocar aborto, algunos autores mencionan que en hatos de reciente infección, los animales infectados presentan serología negativa, por lo que cabe destacar que en el CAIT

hubo dos animales con valores mayores a 1:128 en el momento del aborto y que presentaban signos respiratorios sugestivos de IBR, y no estaban vacunados, lo cual evidencia la circulación del virus en el área estudiada (Pastoret et al., 1992; Van Der Poel et al., 1995; S van Drunen et al., 1997; Mars et al., 1998).

Los títulos altos de éstos y otros animales encontrados y que presentaron aborto, pudieron deberse a que se infectaron en el lugar de origen, ya que se ha encontrado que el tiempo transcurrido entre la infección materna y la fetal es variable y puede fluctuar desde 8 días hasta varios meses (Moraga et al., 1990).

No fue posible evaluar la concordancia de SN con las pruebas de IP e IF, ya que los resultados obtenidos indican la presencia del antígeno en el feto de madres inmunizadas con vacuna inactivada en un tiempo no mayor a seis meses entre vacunación y el aborto, no concordando con Posposil (1996) quien indica que el aplicar una vacuna de este tipo evita que el virus llegue al feto tanto en animales seropositivos como seronegativos; sin olvidar los mecanismos de defensa del huésped y el agente, por otra parte se conoce que la interacción entre IBR y DVB tiene efecto inmunosupresor para la activación de IBR en ganado infectado latentemente (Biuk, 1998).

Podemos concluir que la IP e IF directa no fueron métodos rápidos y confiables para la detección del herpes virus bovino en tejidos fetales. Ambas pruebas tuvieron una especificidad limitada para detectar al virus; cabe señalar que tanto la IP como la IF resultaron ser métodos menos laboriosos y costosos que el AV para la detección del herpes virus bovis I. Se encontró que la inmunofluorescencia es más subjetiva y puede presentar más fondo que la inmunoperoxidasa, ya que para la IF se necesita un técnico especializado para la interpretación de la prueba.

Otras variables que pueden afectar el resultado de las pruebas son el tiempo que transcurre desde la toma de la muestra hasta la realización de la prueba

diagnóstica, la autólisis, la calidad del conjugado, el tiempo de vacunación y el momento del aborto donde la excreción viral es mínima.

Con los resultados obtenidos no se encontró relación entre los resultados de IP e IF con respecto a los de seroneutralización. Con respecto a la segunda hipótesis la IP en las condiciones del estudio solo fue más sensible que la prueba de IF.

La prueba de seroneutralización ha sido aceptada internacionalmente como el método de referencia para la detección de anticuerpos contra IBR, este hecho hace necesaria su disponibilidad en los laboratorios del país, teniendo cuidado de definir el estado endémico del área de influencia del laboratorio.

Es necesario continuar con los estudios para aumentar la confiabilidad de las pruebas diagnósticas como lo es la técnica de inmunoperoxidasa en placa y la técnica de avidina-biotina para tratar de disminuir los falsos positivos debidos al efecto de los glóbulos rojos presentes en los tejidos, incluso es necesario evaluar el comportamiento de los anticuerpos en una población de animales infectados y animales vacunados durante todos los episodios de la enfermedad, fase de recuperación y reactivación del virus en diferentes zonas lecheras, para poder determinar la relación existente de los resultados con el comportamiento de la enfermedad y poder determinar la mejor prueba para su diagnóstico, lo cual redundaría en una mejor posibilidad de establecer diagnósticos situacionales.

LITERATURA CITADA:

- Aguilar AS. El virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina(Bovid herpesvirus1): propiedades y vacunación. *Ciencia veterinaria* 1987; 4:161-202.
- Aluja SA. Necropsias en Mamíferos Domésticos. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - Universidad Nacional Autónoma de México, 1980.
- Avila G. Abortos Causas y Prevención. Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatría; 1995 agosto. Torreón (Coahuila) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Especialistas en Bovinos, AC, 1995:58-62.
- Babiuk LA, S. Van Drunen; Tikoo S K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microb* 1996; 53: 31-42.
- Baker JC, Steven RR, Walker DR. Transmission of a vaccinal strain of infectious bovine rhinotracheitis virus from intranasally vaccinated steers commingled with nonvaccinated steers. *Am J Vet Res* 1989; 50(6): 814-816.
- Barajas J; Riemann H, Franti C. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for epidemiological studies of diseases of livestock in the tropics of Mexico. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1993; 12(3): 717-732.
- Barr BC, BonDuarte RH. Viral Diseases of the fetus. En: Youngquist RS. *Bovine theriogenology*. W.B. Saunders Company, 1997:373-381.
- Beaglehole R, Bonita R. *Epidemiología Básica*. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud, 1994.
- Bernardo T, Schuyler C. *HandiSTATUS: Help with world animal disease status*. San José (Costa Rica): Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Programa V; Sanidad Agropecuaria, 1994.
- Biuk RN, Cvetnic S, Madic J, Rudan D. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. *Theriogenology* 1998; 875-881.

- Blaha, Thomas. *Epidemiología Especial Veterinaria*. Zaragoza-España: ACRIBIA, 1995.
- Bratanich A, Sardi S, Smitsaar E, Estevez M, Schudel A. Comparison of three serological techniques for the diagnosis of bovine herpesvirus type 1: serumneutralization, enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence. *Rev. Arg. Microb.*1990;22: 192-198.
- Brock K, Potgieter N. Rapid fluorescence detection of in situ hybridization with biotinylated bovine herpesvirus-1 DNA probes. *J Vet Diag Inv* 1989; 1:34-38.
- Calero RJ. *Método Epidemiológico y Salud de la Comunidad*. Madrid-España: Interamericana, McGrawhill, 1989.
- Carmel DK; Barao S M and Douglas L W. Effects of vaccination against 18 immunogens in beef replacement heifers at weaning. *J A V M A* 1992; 201(4): 587-591.
- Cheng-feng Z, Oliver RE, Fobers SD. Comparison and evaluation of three serological tests for detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis. *N Z Vet J* 1988; 36: 204-205.
- Delgado I; Barrera M; Tuero C y Rodríguez N. Comparación de tres métodos de detección de antígeno para el diagnóstico de herpes bovino tipo 1. *Salud Animal*,1992;14: 143-148.
- Domínguez J, López L, Hernández J. La Presencia en México de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), diarrea viral bovina (BVD), virus respiratorio sincicial bovino (BRSV) y parainfluenza 3 (PI3) en ganado de carne y leche. *Memorias del XVI Congress on Veterinary Sciences PANVET; 1994 ; Acapulco (Guerrero) México (DF): 1994: 554.*
- Edwards S. Screening for bovine herpesvirus 1 (IBR virus) *Cell and Tissue*
- Edwards S. Experimental infectious bovine rhinotracheitis; comparison of four

- antigen detection methos. Rech Vet Scie 1983; 34: 42-45.
- Eernisse KA, Erickson GA. Microtitration serology methods for bovine virology, Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) neutralization test.
- Falcón N; Alvarado I, Aguilar S. Estudio serológico de la rinoatraqueitis infecciosa bovina (IBR), en el municipio de Aldama Tamaulipas. Memorias del XVI Congress on Veterinary Sciences PANVET. Acapulco(Guerrero) México (DF): Asociación Mexicana de Médicos especialistas en Bovinos, AC, 1994: 130.
- Fenner F; Bachmann P. Virología Veterinaria. Zaragoza España: ACRIBIA, 1992.
- Galen R S. Use of predictive value theory in clinical immunology. Manual of clinical laboratory immunology.. 3a. Washington D.C EUA: A Soc Micro 1986.
- Gimeno E, Belak K, Massone A, Echeverria M, Ibargoryen G. Técnicas inmunohistoquímicas en patología Veterinaria: Aspectos Teóricos y Prácticos. Veterinaria Argentina 1988; 5(41):332-338.
- Greenberg R S. Epidemiología médica. México: Manual Moderno SA de CV, 1995.
- Guerrero R; Gonzales C, Medina E. Epidemiología. . Wilmington, Delaware, E.U.A: Addison-Wesley Iberoamericana,1986.
- Hird D. Interpretación de Pruebas Serológicas. Memorias del curso intermedio de epidemiología Veterinaria. 1995 octubre 82-87; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México (D.F):Universidad Nacional Autónoma de México, 1995: 1-98.
- Hirsch R, Riegelman R. Cómo estudiar un estudio y probar una prueba: lectura crítica de la literatura médica. 2nd ed. Washington D.C : Organización Panamericana de la Salud,1995.
- Howard J. Current Veterinary Theraphy 3: Food Animal Practice. México, DF : Saunders Company,1993.
- Ikam M. Microbiology for veterinary technicians. Hill Technical. Joann colville, Book ed. Paulw; Production man. California, E.U.A: Am Vet.

- Justtyny BS. National Veterinary Services Laboratories. Iowa USDA, APHIS.
- Kaashhoek JM, Rijsewijk JT. Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection. *Vet Micro* 1996;53: 103-110.
- Kelling CL, Schipper IA, Haugse CN. Antibody response in calves administration of attenuated infectious bovine rhinotracheitis (IBR) Vacci. *Can J Com Med* 1973; Vol 37: 309-312.
- Kramps JA, Perrin B; et al. A European inter-laboratory trial to evaluate the reability of serological of bovine herpesvirus 1 infections. *Vet Micro* 1996; 53:156-161.
- Macías GM, Guerrero JA, Miranda S A, González SC y Delgadillo AJ. Aislamiento del Virus de la fiebre porcina clásica en microplacas evidenciado por inmunoperoxidasa. Macías G M, Guerrero J A, González SC, Delgadillo A J. inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de fiebre porcina clásica en cortes por congelación. Ramírez L R; Guerrero J A; Macías G M; De la O R F ; González SC y Delgadillo A J. prueba de inmunoperoxidasa para la detección de anticuerpos contra el virus de la fiebre porcina clásica. *Memorias del Simposium Internacional, La FPC en las Américas. SAGAR, inifap, IICA, FVPPUE (fundación produce puebla) Puebla.méxico (D.F) 2000: 353-363.*
- Mars MH, Brusckhe CJ, Van Oirschot JT. Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Vet Micro* 1999; 66: 197-207.
- Moraga BL; Berrios P E; Zurita L A y Celedón M; Guajardo U; Ortega A. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina III. Infección experimental en vaquillas gestantes. *Avances en Ciencias Veterinarias*1990;5(2):129-135.
- Moreno A, Valle C. *Epidemiología Clínica*. 2nd ed. México D.F: Interamericana-McGraw-Hill, 1994.
- Morris JN. *Aplicaciones de la Epidemiología*. Barcelona-España: Salvat, 1985.

- Morton A, Hebel C. Bioestadística y Epidemiología. 3a ed. México D.F: Interamericana, Mc Graw-Hill, 1993.
- Murphy B. Bovine Abortion Diagnosis .; Aguilar S. Recomendaciones para la prevención contra la rinotraqueitis infecciosa bovina (Bovis herpesvirus 1, BHV-1). Memorias del V curso Internacional de reproducción Bovina;1993 234-240; Distrito Federal (México) México (DF): Academia de la investigación en biología de la reproducción, AC, 1993: 253:260.
- Oficina Internacional de Epizootias. Manual d recommended diagnostic techniques and requeriments for biological products for list A an B diseases. 1990; Vol.II.
- Organismo Internacional de Epizootias. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Organismo Internacional de Epizootias 1995; 322-328.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Red de Cooperación Técnica Entre: Laboratorios de investigación y diagnóstico veterinario: Manual de técnicas para diagnóstico virológico. Centro de Investigaciones de ciencias veterinarias INTA, Argentina.
- Organización Panamericana de la Salud- Organización Mundial de la Salud. Programa de adiestramiento en salud animal para América Latina, Cuarentena Animal. Organización panamericana de la salud 1986; 1: 174-177.
- Pastoret PP, Babiuk LA, Misra V, Griebel P. Reactivation of temperature-sesitive and non temperature-sensitive infectious bovine rhinotracheitis vaccine virus with dexamethasone. Inf and Inm 1980; 29(2): 483-488.
- Pastoret PP, Thiry E, Brochier B, Derboven G. Bovid herpes virus infection of cattle: phathogenesis, latency, consecuencias of latency. Ann Rech Vet 1982;13 (3):221-235.
- Perrin B, Calvo T, Cordioli P, Edwards S, Eloit M, Guerin B et al. Selection of european union standard reference sera for use in the serological diagnosis

- of infectious bovine rhinotracheitis. Rev Sci Tech Off Int Epiz 1994;13 (3):947-960.
- Pfahler W, Hoffman F, Iribarren F, Breglia J. Respuesta serológica de bovinos vacunados contra IBR. Medicina veterinaria.Vol 78 (2): 81-83.
- Piacenza A. Diagnóstico de la rinotraqueitis infecciosa bovina. Vet Arg 1988;5(41): 60-65.
- Posposil Z, Krejci J, Machatkova M. Development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. Vet Microb 1996; 53: 199-206.
- Posposil Z, Krejci J, Machatkova M, Zendulkova D, Lany P, Cihal P. The efficacy of an inactivated IBR vaccine in the prevention of intra-uterine infection and its use in a disease-control programme. J Vet Med 1996; 43:15-21.
- Reed DE, Bicknell EJ, Larson CA, Knudtson WU, Kikbride CA. Infectious bovine rhinotracheitis virus-induced abortion: rapid diagnosis by fluorescent antibody technique. A J Vet Res 1971, 32: 1423-1426.
- Rodman PS, White C. Serological Epidemiology. New York EUA: Academic press, 1973.
- S.Van Drunen, Van den Hurk, Tikoo SK, Babiuk LA, Donkersgoed JV. Protective immunity in cattle following vaccination with conventional and marker bovine herpesvirus-1 (BHV1)vaccines. Vaccine 1997; 15(1): 36-44.
- Sacket D, Haynes R. Epidemiología clínica- ciencia básica para la medicina clínica. Buenos Aires- Argentina:Medica Panamericana,1994.
- Smith DR. Veterinary clinical epidemiology: A problem oriented approach. Buenos Aires- Argentina: University of Illinois E.U.A, 1990.
- Smith GH, Collins KJ, Carman J. Use of immunoperoxidase test for the detection of bovine herpesvirus-1 in aborted fetal tissue. J Vet Diag Invest 1989;1:39-44.

- Sweat RL. Persistence of antibodies and anamnestic response in calves vaccinated with inactivated infectious bovine rhinotracheitis virus and parainfluenza-3 virus vaccines. *J A V Med* 1983; 1:182, 8:809-811.
- Theodoris A. Studies on bovine herpesviruses. Part 1. Isolation and characterization of viruses isolated from the genital tract of cattle. *Onderstepoort J Vet Res* 1985; 52:239-254.
- Thrusfield M. *Epidemiología Veterinaria*. Zaragoza-España: Acribia, 1990.
- Van der Poel W H, Kramps JQ, Brand A, Van Oirschot JT. Persistence of bovine herpesvirus-1-specific antibodies in cattle after intranasal vaccination with a live virus vaccine. *Vet Rec* 1995; 137: 347-348.
- Vilchis C, Susan V, Rosales C, Aguilar S, Vargas V. Estudio epizootológico de la rinotraqueitis infecciosa bovina en ganado productor de leche y productor de carne. *Técnica Pecuaria México* 1985; 49:106-115.
- Wohlgemuth K. Enfermedades infecciosas del tracto respiratorio del ganado de leche. *Memorias de la Décima Conferencia Internacional sobre Ganado Lechero, CIGAL*. Holstein-México, D.F, 1994: 67-71.
- Wohlgemuth K, Domínguez J, López L. El complejo respiratorio bovino: etiología viral. *Memorias del XIV Congress on Veterinary Sciences. PANVET*. Acapulco (Guerrero) México, 1994; 430-432.

Anexo 1

Sano

+	-
a	b
c	d

a=positivo

b=falso positivo

c=falso negativo

d=negativo

Fórmulas:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a+c}$$

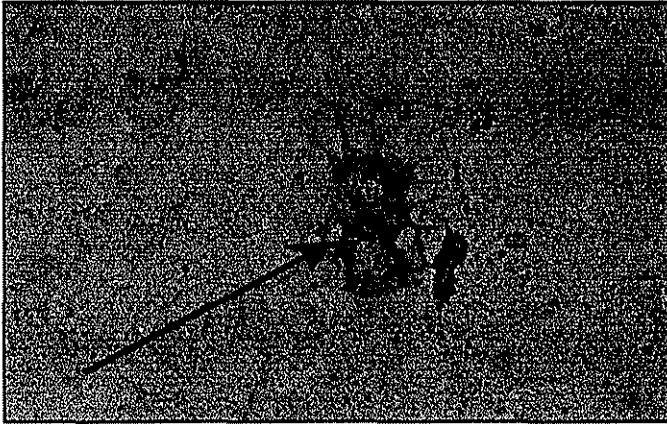
$$\text{Especificidad} = \frac{d}{b+d}$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{a}{a+b}$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{d}{c+d}$$

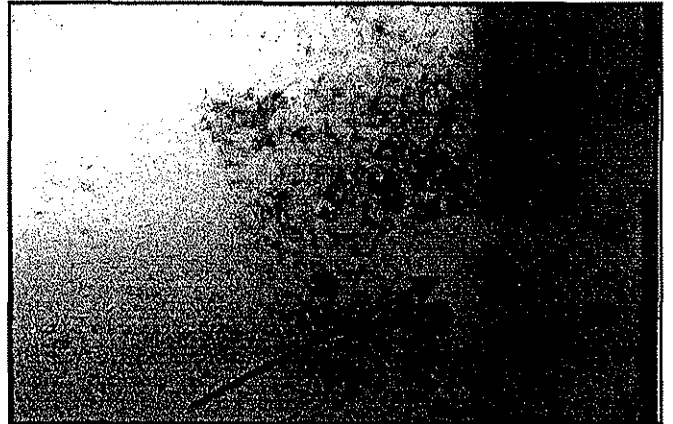
Figura 1

Resultados positivos a inmunoperoxidasa



a) Cultivo celular células MDBK.

➔ Tinción intracitoplasmática, lo que revela la presencia del antígeno.

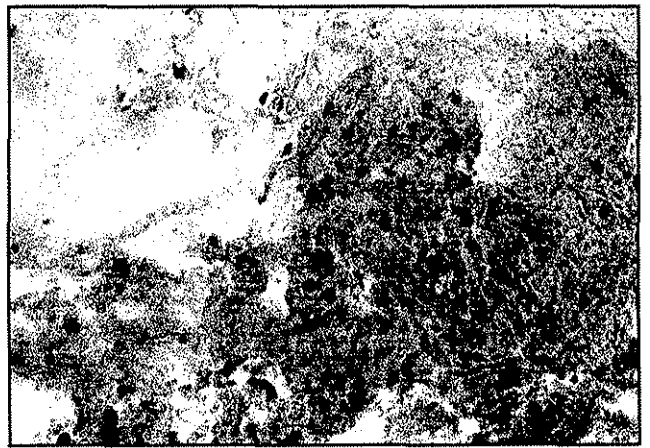


b) Cultivo celular células MDBK.

➔ Efecto citopático



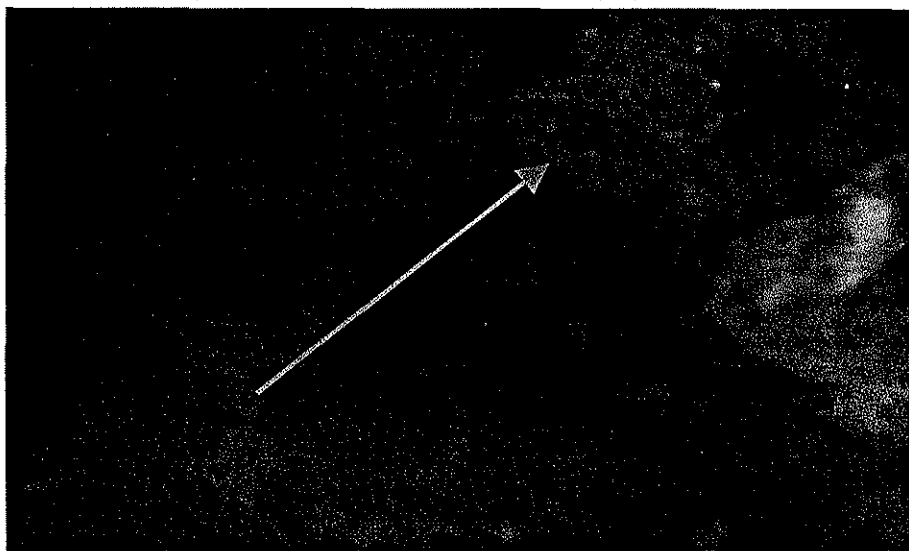
c)



d)

Cy d).- Corte de tejido por congelación. Se observa el antígeno intracitoplasmático teñido de color rojizo.

Figura 2
Resultados positivos a inmunofluorescencia
cortes por congelación



→ Fluorescencia focal y poco brillante dispersa en núcleo y citoplasma.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN