

Diagnóstico de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina mediante Inmunoperoxidasa (Diagnostic of Infectious Bovine Rhinotracheítis by means of Inmunoperoxidase)

Enrique Barrera Calva¹, Alejandro Córdova Izquierdo^{2*} y Felipe de Jesús de la O Ramírez¹ ¹Práctica privada. ²Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Calz. Del Hueso 1100 Col. Villa Quietud C.P. 04960, México, D.F.

*Contactar: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/curriculum/alecordova.htm>
, aci57@prodigy.net.mx

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue diagnosticar Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) mediante la prueba de Inmunoperoxidasa. Se utilizaron 300 muestras de suero bovino, no vacunados, de varias razas, sexo y edad, procedentes de diferentes regiones ganaderas del país. Las muestras utilizadas fueron evaluadas microscópicamente para determinar que estuvieran libres de cualquier contaminación por bacterias, hongos y no hemolisadas, inactivándose posteriormente a 56° C durante 30 minutos en baño maría y congelándose hasta el momento de desarrollarse la prueba. Los sueros se trabajaron por la técnica de suero neutralización (SN) en micro placas de 96 pozos utilizando células MDBK y 200 TCID₅₀ % de virus, la prueba de ELISA se efectuó con un KIT comercial (VETOKINOL) y la prueba de Inmunoperoxidasa se realizó en micro placas de 96 pozos, utilizando como antígeno el virus de IBR cepa los Ángeles con un título de 10 DIC₅₀ % y células MDBK. No hubo diferencias estadísticas significativas entre las pruebas. La prueba de Inmunoperoxidasa puede ser utilizada para el diagnóstico cualitativo rápido, confiable y económico de anticuerpos contra IBR.

PALABRAS CLAVE: Rinotraqueítis Infecciosa Bovina. Diagnóstico. Inmunoperoxidasa.

ABSTRACT

The objective of this work was to diagnose Infectious Bovine Rhinotracheítis (IBR) by means of the test of Inmunoperoxidase. 300 samples of bovine serum were used, not vaccinated, of several races, sex and age, coming from different cattle regions of the country. The used samples were evaluated microscopically to determine that they were free of any contamination for bacteriums, mushrooms and non hemolisadas, inactivated later on to 56° C during 30 minutes in bathroom Maria and freezing until the moment to be developed the test. The serums one worked for the technique of serum neutralization (SN) in micro badges of 96 wells using cells MDBK and 200 TCID₅₀ virus%, ELISA'S test was made with a commercial KIT (VETOQUINOL) and the test of Inmunoperoxidase was carried out in micro badges of 96 wells, using as antigen the virus of IBR stump the Angel with an I title of 10 DIC₅₀ % and cells MDBK. There were not significant statistical differences among the tests.

The test of Inmunoperoxidase could be used for the quick, reliable and economic qualitative diagnosis of antibodies against IBR.

KEY WORDS: Bovine Infectious Rhinotraqueitis. Diagnostic. Inmunoperoxidase.

INTRODUCCION

La Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), es causada por un virus DNA y corresponde a la familia HERPESVIRIDAE, a la especie, herpes virus bovino 1, también conocida como infección por herpes virus bovino 1 (BHV1), Rinotraqueitis Infecciosa Necrótica Bovina, Rinitis Necrótica, enfermedad de la nariz roja, vulvovaginitis pustular infecciosa y exantema coital bovino. Es una enfermedad altamente infectocontagiosa del tracto respiratorio, caracterizada por traqueitis, rinitis y fiebre.

La IBR se describió primero como una enfermedad nueva del tracto respiratorio en ganado de engorda en Western EEUU en 1955, aislándose el virus en 1956, actualmente tiene una distribución mundial (Blood, 1973; Aguilar, 1987; Correa, 1988; Kahrs, 1988; Sashi *et al.*, 1988).

En México la IBR fue diagnosticada en 1971 y a la fecha se ha aislado el virus a partir de bovinos con signos que hacían sospechar de esta enfermedad, correspondientes a hatos de diferentes partes de la República Mexicana, también se han encontrado anticuerpos neutralizantes contra IBR en bovinos del Estado de México, Puebla, Yucatán, encontrándose diseminada por diferentes zonas ganaderas del país (Correa, 1988).

Aparte del ganado bovino no se ha demostrado ningún otro reservorio, sin embargo, los hallazgos en cerdos, cabras y posiblemente venados pueden en raras ocasiones sufrir infecciones naturales por el virus (Blood, 1973, Correa, 1988). Podemos decir que la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la IBR está limitada a las especies que pertenecen a la familia Bovidae y familias cercanas a ésta, como la Cervidae. La susceptibilidad a la IBR parece por consiguiente estar limitada al orden de los Artiodáctilos con afinidad especial hacia la tribu de los Bovinos. Se debe considerar que la transmisión por medio de vectores mecánicos que no sean el semen congelado, tienen en realidad poca importancia, dada la alta susceptibilidad del virus al medio externo (Aguilar, 1987).

La amplia variedad de manifestaciones asociadas por la infección del virus de la IBR y la variedad en su gravedad son una fuente para confundirse de la infección natural es probablemente determinada multifactorialmente por la edad del animal, la capacidad del virus, la dosis y vía de exposición o inoculación, estado inmunológico del animal expuesto e influencia del medio ambiente (Aguilar, 1987; Kahrs, 1988).

La enfermedad se puede presentar en diferentes formas clínicas, estos cambios en el cuadro clínico epidemiológico, no obstante, pueden resultar de cambios en el manejo zootécnico. Aunque las formas clínicas coinciden ocasionalmente resultando afectado el tracto respiratorio, digestivo, genital, causando vulvovaginitis pustular infecciosa, balanopostitis, como un factor de infertilidad, además produciendo otros signos clínicos como conjuntivitis,

mastitis, además una rinotraqueitis infecciosa bovina sistémica fatal en neonatos (Blood, 1974; Aguilar, 1987; Correa, 1988; Kahrs, 1988).

Los estudios epidemiológicos en México han sido realizados principalmente para determinar la prevalencia de enfermedades, proporción de animales enfermos en una población durante un periodo determinado; la cual mide la frecuencia de la enfermedad que existe y no tiene dimensiones o unidades, es una medida estática, por definición los valores posibles están dentro de cero y uno (García, 1990). La prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), es una herramienta de diagnóstico muy útil en la determinación serológica de anticuerpos o antígenos de manera secuencial. La técnica de ELISA se desarrolló en 1971 y desde entonces ha sufrido modificaciones; sin embargo, el principio de esta técnica involucra la unión e inmovilización de un anticuerpo o antígeno en una fase sólida insoluble (Margni, 1977); en la actualidad, ha tomado gran importancia en el diagnóstico de las enfermedades infectocontagiosas, considerándola como una prueba diagnóstica de laboratorio segura, rápida, sensible y específica. Al aplicar la técnica de ELISA basada en reacción de tipo inmunoenzimático es posible detectar la presencia o ausencia de anticuerpos anti-virales circundantes de muestras serológicas como es el caso de seroneutralización o inmunofluorescencia (Meléndez, 1989; Sierra, 1993).

Las principales ventajas de esta prueba sobre los demás procedimientos serológicos y por lo que se a hecho tan popular es que utiliza el mismo principio para medir anticuerpos contra muchos agentes etiológicos de interés en ganado bovino, requiere de tomar la misma muestra (suero), para cualquier agente que sea necesario y sólo se utiliza una dilución simple, además de ser una metodología desarrollada en el laboratorio automatizada mediante el uso de computadora y lectores de densidad óptica específicos; teniendo una alta sensibilidad de 95 a 100 % y una especificidad de 98 a 100 % (Meléndez, 1989; Margni, 1997).

Cabe destacar que como técnica de diagnóstico, se incrementa día a día la utilización de ELISA en el laboratorio de análisis clínico ya que presenta grandes ventajas respecto a otras técnicas tradicionales. La prueba de ELISA está considerada a ser técnicamente superior a la prueba de seroneutralización para la detección rutinaria de anticuerpos virales de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR). El bajo costo de los reactivos y materiales necesarios para su realización, la gran estabilidad de los conjugados en función del tiempo, la objetividad de los resultados la alta sensibilidad y especificidad, el hecho de que no sea necesario contar con equipo complejo ni con laboratorios y personal autorizados para la realización de la prueba son algunas de las causas de que técnicas como la inmunofluorescencia y la seroneutralización, estén siendo reemplazadas por métodos inmunoenzimáticos.

La prueba de ELISA empezó a desarrollarse en Francia por Aureameas y Uriel en 1960, estableciéndose el método para la cuantificación de inmunoglobulinas por los investigadores Suecos Enguall y Perlmann en EEUU en 1971 (Margni, 1977; Barajas, 1987; Hyun y col., 1991).

En México se han encontrado anticuerpos contra varios de los agentes etiológicos que intervienen en el complejo respiratorio de los bovinos tales como virus de IBR, DVB, PI3, VRSB.

Aparentemente la IBR está ampliamente difundida en las zonas ganaderas de México. Desde el punto de vista económico, es probablemente la más importante, aunque la DVB es económicamente importante específicamente en lotes de ganado de engorda, habiendo pérdidas en vacas lecheras, por abortos, anomalías fetales, reducción en la producción, problemas respiratorios, muertes, gastos de tratamiento, retraso de crecimiento, etc. (Barajas, 1987; Correa, 1988; García, 1990; Bosch *et al.*, 1996).

La importancia de este tipo de estudios radica en que esta prueba serológica sirve como un tamiz para tratar de detectar focos de infección de un hato con problemas reproductivos y respiratorios, diagnosticando el tipo de agente infeccioso presente, para diagnosticar la prevalencia de dichas enfermedades en las distintas zonas ganaderas del país y poder establecer las medidas profilácticas adecuadas en las Unidades de Producción Animal.

El objetivo de este trabajo fue diagnosticar Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) mediante la prueba de Inmunoperoxidasa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 300 muestras de suero bovino de varias edades, sexos, y raza remitidos al Laboratorio procedentes de diferentes regiones del país; libres de hemólisis y contaminación por bacterias y hongos.

Los sueros seleccionados se trabajaron por la técnica de seroneutralización (SN), ELISA, y la técnica de tinción por Inmunoperoxidasa (IP). Para el desarrollo de las pruebas de SN e IP se elaboró el antígeno utilizando virus IBR cepa Los Ángeles con título de $10^{5.0}$, DICC 50 % y cultivo celular de la línea MDBK- UNAM pase 110, se incubó por 48 horas en cámara húmeda a 37° C con 5 % de CO₂. La prueba de SN se efectuó en micro placas de plástico de 96 pozos utilizando células MDBK- UNAM pase 110 y 200 TCID 50 % de virus cepa los Ángeles, con diluciones dobles del suero a partir de 1:2. La prueba de ELISA se efectuó con el KIT-FOR SERODIAGNOSIS OF ANTIBIODES AGAINST IBR VIRUS INFECTIONS BY ELISA de la marca comercial vétoquinol. La prueba de Inmunoperoxidasa se desarrolló en micro placas de 96 pozos utilizando células MDBK- UNAM pase 100, se incubó por 48 horas en cámara húmeda a 37° C con 5 % de CO₂, con una dilución del antígeno de 1:10. Finalmente se compararon y analizaron los resultados.

RESULTADOS

En las tablas 1, 2 y 3 se presentan los resultados obtenidos con las técnicas de SN, ELISA y IP.

Tabla 1. Resultados con la técnica de sueroneutralización para la detección de anticuerpos contra IBR.

TECNICA	TOTAL (+)	TOTAL (-)	% DE (+)	% DE (-)
SN	178	122	59.3	40.7

Tabla 2. Resultados con la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos contra IBR.

TECNICA	TOTAL (+)	TOTAL (-)	% DE (+)	% DE (-)
ELISA	199	101	66.3	33.7

Tabla 3. Resultado con la técnica de Inmunoperoxidasa para la detección de anticuerpos contra IBR.

TECNICA	TOTAL (+)	TOTAL (-)	% DE (+)	% DE (-)
IP	179	121	59.7	40.3

DISCUSIÓN

Es necesario el uso de técnicas de diagnóstico que sean confiables, certeras y de bajo costo. Dentro de las tendencias del proceso de adaptación tecnológica, se pretende evitar la dependencia de reactivos de importación, por lo que es imprescindible la búsqueda de sustancias alternativas y de óptimo funcionamiento. Los métodos inmunoenzimáticos son ampliamente usados en los laboratorios por ser altamente sensibles y específicos; sin embargo, es necesario cuidar cada parámetro involucrado en su procedimiento como la sustancia amortiguadora (Buffer) utilizada, pH, temperatura y periodos de incubación, sustrato empleado, etc. Se ha tratado de estandarizar la técnica de inmunoperoxidasa para detectar anticuerpos anti IBR en bovinos y uno de los pasos más importantes para la eliminación de resultados falso-positivos es el bloqueo de ciertos elementos inespecíficos que puedan interferir con la prueba. Por primera vez, se reporta su uso en un método inmunoenzimático, siendo ésta de bajo costo y fácil acceso a todos los laboratorios regionales del país, como a laboratorios de países en vías de desarrollo tecnológico. Las pruebas conocidas como ELISA, rápidamente se ha convertido en uno de los procedimientos de laboratorios clínicos y bioquímicas más utilizados para la identificación de anticuerpos, antígenos o haptenos (Meléndez et al., 1978; Krech y Willhelm, 1979; Czerkinsky et al., 1984; Demmler, 1987).

Se observó que de las 300 muestras séricas trabajadas por la técnica seroneutralización en placa fueron de un 59.3 % de positividad, con títulos de anticuerpos mayores a 1:2 (tabla 1). Mientras que estas mismas muestras trabajadas por la técnica de ELISA fueron de 66.3

%positivos y 33.7 % de negativos (tabla 2). En el caso de Inmunoperoxidasa, se encontró un 59.7 % de sueros positivos, contra un 40.3 % de sueros negativos (tabla 3). Lo anterior manifiesta la susceptibilidad de emplearse la inmunoperoxidasa para estudios epizootiológicos, no así la seroneutralización, ya que esta técnica no detecta reactores positivos a IBR con títulos de anticuerpos inferiores a 1:2, alterando así los resultados de un diagnóstico, que puede proporcionar falsos negativos. Con respecto a ELISA su alto costo y la utilización de equipo sofisticado la hace una técnica poco usual. Sin embargo, dicha técnica de Inmunoperoxidasa es práctica y de fácil procedimiento, susceptible de emplearse como una prueba tamiz en los casos que se sospeche de IBR para tratar de detectar la huella digital de la enfermedad en las poblaciones de animales que orienten a estudios más completos y específicos. La técnica de Inmunoperoxidasa, permite hacer esta identificación sin la necesidad de que se tenga un aparato lector de placas de ELISA observando los resultados a simple vista en forma calorimétrica o en un microscopio óptico invertido. No obstante, hacen faltas pruebas para valorar la durabilidad de las placas, con el fin de utilizarlas en el diagnóstico de anticuerpos contra IBR en el futuro.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, S.J. Álvaro. 1987. El virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina. *Ciencia Veterinaria*, 4: 161-190.
2. Barajas, R.Y., Bermúdez, R.M., Riemann, H. 1987. Prevalencia de anticuerpos contra diarrea viral bovina y rinotraqueitis infecciosa bovina en ganado Holstein cebú en el trópico húmedo de México. p.p. 61-62.
3. Blood, D.C.; Radostitis, O.M. 1976. *Medicina Veterinaria Interamericana*. 3ª Edición México, D.F. p.p. 909-922, 967-974.
4. Bosch, J.C., Kaashoek, M.J., Kroese, A.H., Oirschot, J.T. 1996. An attenuated Bovine herpesvirus 1 Marker Vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccine. *Veterinary Microbiology*, 52: 223-224.
5. Correa, G.P. 1988. *Enfermedades virales de los animales domésticos Poligástricos*. 5a edición. Paradigmas, México. p.p. 45-90.
6. Cserkinsky, C.C., Tarkowski, A., Nilsson, L.A., Ouchterlony, O., Nygren, H., Andgretzer, C. 1984. Reverse enzyme-linked immunospot assay (RELISPOT) for the detection of cell secreting immunoreactive substances. *J. Immunol. Meths.* 72:489.
7. Demmler, G.J., Steinberg, S.P., Blum, G. and Gershon, A.A. 1987. Rapid. enzymelinked immunosorbent assay for detecting antibody to varicella zoster virus. *J. Infect. Dis.* 157. 1:211.
8. García, V.Z. 1990. *Epidemiología veterinaria y salud animal*. Limusa. México p.p.58-68

9. Hyun, J. Cho., Saad A. Masri., Dirk Deregt., Sang-Geon Veo., Elizabeth J. Golsteyn Thomas. 1991. Sensitivity and specificity of an Enzyme – Linked Immunosorbent assay for the Detection of bovine viral Diarrhea virus Antibody in cattle. Can J Vet Res. 55:56-59
10. Kahrs, Robert F. 1988. Viral Diseases of Cattle. Printed by Iowa State University press, Ames, Iowa. U.S.A.
11. Krech, O., Wilhelm, J.A. 1979. A Solid Phase Immunosorbent Technique for the Rapid Detection of Rubella IgM by Haemagglutination Inhibition. J. Gen.Viral. 44:281
12. Margin, Ricardo Anibal. 1977. Inmunología e Inmunoquímica Médica. 4ª edición. México. Panamericana p.p. 571-586.
13. Meléndez, L.V. Schuring, G.G., Alejandro A. Schudel, Judy E. Devery Pocius., Linda m., Dellers. 1989. Manual de Diagnóstico Rápido de Enfermedades Virales de los nímales Utilizando Métodos Inmunoenzimáticos . IICA. Serie Salud Animal. Publicación Científica. Buenos Aires Argentina.
14. Sashi, B., Mohoanty., Sukanta, K. Dutta. 1983. Virología Veterinaria. México. Interamericana p.p. 101-163.
15. Sierra, R.N. Alvarado, V.M., Bojórquez, N.L. 1993. Aplicación de ELISA. Para diagnóstico de Algunas Enfermedades Virales de Repercusión Reproductiva en bovinos. CENID-Microbiología – INIFAP- SARH y Pronabive. México. D.F p.p. 20-22.

Trabajo recibido el 16/10/2005, nº de referencia 110515_RED VET. Enviado por su uno de sus autores, [acordova](#), miembro de la [Comunidad Virtual Veterinaria.org](#)® . Publicado en [REDVET](#)® el 01/11/05.

[Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](#)®, ISSN 1695-7504 - [Veterinaria.org](#)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](#)® - Veterinaria Organización S.L.®

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org - www.veterinaria.org y [REDVET](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)® www.veterinaria.org/revistas/redvet y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](#) 1996-2005