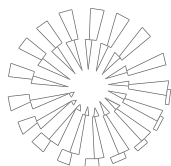


## Comparación de tres pruebas diagnósticas para el aborto por rinotraqueítis infecciosa bovina en hatos lecheros\*



### Comparison between three diagnostic tests to detect abortion caused by infectious bovine rhinotracheitis in dairy herds

Alfa Bracho Cárdenas\*\* Carlos J. Jaramillo Arango\*\* José Juan Martínez Maya\*\*  
Juan Antonio Montaña Hirose\*\*\* Arturo Olgún y Bernal\*\*

---

#### Abstract

The present study compares the specificity (Sp) and sensibility (Se), as well as the positive (+PV) and negative predictive (-PV) values of immunoperoxidase (IP) and immunofluorescence (IF) tests for the diagnosis of abortions caused by IBR, as well as their concordance with serum neutralization in the dams of the fetuses, compared against a standard test of viral isolation. (VI) Forty-nine aborted fetuses, obtained over a one-year period, were evaluated. Liver, spleen, kidney and lung samples were collected from each fetus. Serum from the dams was collected on three occasions, one month apart, starting immediately after the abortion. Samples were taken from animals in "Agricultural and Industrial Complex of Tizayuca (CAIT)" Tizayuca, Hidalgo, and the diagnostic technique was carried out in "National Center of Diagnostic Services in Animal Health (CENASA)" as prescribed by the World Organization for Animal Health (OIE). A total of 29 viral isolations of IBR were obtained. The immunoperoxidase (IP) and immunofluorescence (IF) techniques had a sensitivity of 96.7% and 24.1%, respectively, and a specificity of 20% and 70%, respectively. The positive predictive values for these were 64.4% and 53.8%, respectively, while the negative predictive values were 80% and 38.9%, respectively. The concordance for both tests was bad. Of the organs sampled, the liver and kidney were the best for IF and IP diagnosis of IBR, respectively. Concordance for serum neutralization, immunofluorescence and immunoperoxidase in relation to viral isolation was not significant ( $P > 0.05$ ).

**Key words:** IBR, DIAGNOSIS, ABORTION, DIAGNOSTIC TEST.

#### 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 (IF) para el diagnóstico de abortos causados por rinotraqueítis infecciosa bovina, así como la concordancia de los resultados con los de seroneutralización (SN) en las madres de dichos fetos, tomando como prueba estándar de diagnóstico el aislamiento viral (AV). Se evaluaron 49 fetos abortados, obtenidos a lo largo de un año. A cada uno se le tomaron muestras de hígado, bazo, riñón y pulmón; de las madres se obtuvieron tres muestras de suero, con intervalo de un mes, obteniendo la primera a partir del aborto. Las muestras se tomaron en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca (CAIT), en Tizayuca, Hidalgo, México; las técnicas diagnósticas se realizaron en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA) conforme lo establecido en el mismo centro y por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Se obtuvieron 29 aislamientos virales de IBR del total de las muestras. La prueba de IP tuvo una Se de 96.7% y Es de 20%, VP(+) de 64.4% y VP(-) de 80%. La prueba de IF tuvo una Se de 24.1% y una Es de 70%, un VP(+) de 53.8% y VP(-) de 38.9%. La concordancia para ambas pruebas fue mala. Respecto del órgano, la muestra de hígado y riñón fueron las mejores para diagnóstico de IBR por IF e IP, respectivamente. La concordancia para SN, IF e IP con respecto al AV no fue significativa ( $P > 0.05$ ).

**Palabras clave:** IBR, DIAGNÓSTICO, ABORTOS, PRUEBAS DIAGNÓSTICAS.

---

Recibido el 5 de julio de 2005 y aceptado el 11 de enero de 2006.

\* Este trabajo forma parte de la tesis de maestría del primer autor.

\*\* Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

\*\*\* Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 43600, Tulancingo, Hidalgo, México.

## Introduction

A viral agent associated to outbreaks of respiratory diseases of bovines, is the Herpes bovis 1 (BHV-1) of the family Herpesviridae which provokes infectious bovine rhinotracheitis (IBR). According to the genomic and antigenic type, the BHV-1 divides in BHV-1.1 and BHV-1.2, which, consequently, subdivides in BHV-1.2a and BHV-1.2b.<sup>1</sup> The clinical manifestations and give way of the disease depend on the anatomical site of the infection, age, and immunological condition of the host,<sup>2,3</sup> provoking from a mere respiratory profile (rhinotracheitis, conjunctivitis), genital (vaginitis, epididymitis, orchitis and abortion), enteritis, to a systemic disease.<sup>1,2</sup>

The disease has an average incubation period of 21 days.<sup>4</sup> When the disease occurs in a subclinical presentation,<sup>1</sup> it is manifested by the interruption of gestation, which is seen in 25% to 50% of pregnant cows; if the infection is early manifested during the gestation period it can provoke embryonic reabsorption, but if the death occurs during the first quarters of pregnancy (when this is dependent on the corpus luteum by progesterone) the interval between fetal death, luteolysis and expulsion is enough for the fetal autolysis. Generally, abortion occurs during the third quarter of pregnancy, in a period of time no longer than three weeks in which the fetus is autolyzed.<sup>1,2,5,6</sup>

The prevalence in herds depends on factors as: the immune state of the dam, the period of gestation in which the infection occurs or if it manifests itself, the tropism and virulence of the agent.<sup>1</sup>

In samples sent to the National Center of Diagnostic Services in Animal Health, between January 1992 to February 1996, a frequency of 56.53% positives was obtained in 18 states of the Mexican Republic.

The transmission of the virus is carried out through the respiratory secretions, ocular or reproductive system such as: semen, embryo implants and obstetric procedures.<sup>7</sup>

The virus can be latent preserved in herds, by the presence of carrier bovines of field strains that are occasionally reactivated by diverse stimuli with the consequent viral replication through the respiratory and reproductive tracts, which favors the transmission to susceptible animals. This situation makes IBR a disease of great diffusion and very difficult control.<sup>5,7,8</sup>

From an economical point of view, the importance of IBR has not been completely evaluated, but it is calculated that in ten years 18% of the herd is removed by infectious diseases, from which abortion is relevant.<sup>9</sup> The IBR is an enzootic disease with obligatory notification in Mexico, due to its significant effect in

## Introducción

Un agente viral asociado a brotes de enfermedades respiratorias del bovino es el herpes bovis 1 (BHV-1) de la familia Herpesviridae que ocasiona la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR). Según el análisis genómico y tipo antigénicos, el BHV-1 se divide en BHV-1.1 y BHV-1.2, que, a su vez, se subdivide en subtipo BVH-1.2a y BHV-1.2b.<sup>1</sup> Las manifestaciones clínicas y curso de la enfermedad dependen del sitio anatómico de la infección, la edad y el estado inmunológico del portador,<sup>2,3</sup> produciendo desde un cuadro clínico respiratorio (rinotraqueítis, conjuntivitis), genital (vaginitis, epididimitis, orquitis y aborto), enteritis y hasta enfermedad sistémica.<sup>1,2</sup>

La enfermedad tiene un periodo de incubación de 21 días, en promedio.<sup>4</sup> Cuando la infección ocurre en forma subclínica,<sup>1</sup> aquella se caracteriza por la interrupción de la gestación, lo cual sucede en 25% al 50% de las vacas gestantes; si la infección se establece tempranamente en la gestación puede provocar reabsorción embrionaria, pero si la muerte ocurre en los dos primeros trimestres de la gestación (cuando ésta 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 en el que el feto está autolizado.<sup>1,2,5,6</sup>

La prevalencia en hatos depende de factores como el estado inmunitario de la madre, el periodo de la gestación en que ocurra la infección o si se manifiesta ésta, del tropismo y la virulencia del agente.<sup>1</sup>

En muestras enviadas al Centro Nacional en Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, entre enero de 1992 a febrero de 1996, se obtuvo una frecuencia de positivos de 56.53% en 18 estados de la República mexicana.

La transmisión del virus se realiza a través de las secreciones respiratorias, oculares o del aparato reproductor, como el semen, implante de embriones y las operaciones obstétricas.<sup>7</sup>

El virus puede mantenerse latente en los rebaños, por la presencia de bovinos portadores de 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 la IBR sea una enfermedad de gran difusión y de muy difícil control.<sup>5,7,8</sup>

Desde un enfoque económico, la importancia de la IBR aún no ha sido evaluada completamente, pero se calcula que en diez años se renueve 18% del hato por enfermedades infecciosas, de las cuales

livestock production. Besides, it belongs to group B of the International Zoosanitary Code for its strategic importance for the health animal actions in each country.<sup>4,10</sup>

In Mexico, the IBR is an infectious disease of great importance for dairy herds, since in the majority of the animals, the disease goes through a subclinical form; its main characteristic is the abortion and consequently the loss of the product and milk production, affecting the reproductive and productive parameters and increasing the economic losses.

The common techniques for the IBR diagnosis are: seroneutralization, complement fixation, ELISA, viral neutralization, viral isolation, immunofluorescence and immunohistochemistry.<sup>1,11</sup>

The seroneutralization test has the purpose to search for neutralized antibodies in the animals' serum. If the conventional incubation of virus is used during 1 hour at 37°C, the test presents an 89.2% of sensibility and a near specificity of 100%. Nevertheless, if the reactors are incubated during 24 h, it is possible to increase the sensibility up to 94.4%, but the specificity decreases to 93.2%.<sup>12</sup> A limit to this test is that it is only certain in non vaccinated herds.<sup>1</sup>

The immunofluorescence test is used for the identification of antigens or antibodies in fresh material (kidney and adrenal glands).<sup>1,13-15</sup> The indirect test is more sensible, but not enough to justify its use, because it is slower.<sup>15,16</sup> In the direct exam of frozen sections of fetal kidney, the test has superior specificity of 90% and a sensibility of 67%.<sup>15,16</sup>

For the immunoperoxidase technique impressions of suspect tissue were made on slides. This last ones are incubated with antibodies against the IBR virus, combined with an enzyme, generally radish peroxidase. After being rinsed, the impression is treated with the substrate of the enzyme and a chromogene which its products provoke a colored reaction directly proportional to the quantity of antigen present in the sample.<sup>17,18</sup> According to Smith *et al.*,<sup>17</sup> this test has a sensibility of 94%.

This technique has two advantages for the diagnosis; the first one does not need equipped microscopes for the observation with ultraviolet light, and second, the infected cellular cultures can be fixed directly in the same microplates utilized for the viral isolation.

Viral isolation is another diagnostic test that has the inconvenient of its slowness, since it delays at least a week; it requires equipment, material and specialized personnel. If the samples are not immediately processed, they should be frozen at -70°C. Cultures of monolayers, homologous or primary cells are incubated at 37°C and are daily observed to compare the apparition of the cytopathic effect, this effect must be valued in comparison with non-inoculated cul-

es relevante el aborto.<sup>9</sup> La IBR es una enfermedad enzoótica de notificación obligatoria en México por su efecto significativo en la producción pecuaria. Además, pertenece al grupo B del Código Zoosanitario Internacional por su importancia estratégica para las acciones de salud animal en cada país.<sup>4,10</sup>

En México, la IBR es una de las enfermedades infecciosas de gran importancia en los hatos lecheros, pues en la mayoría de los animales la enfermedad transcurre en forma subclínica; tiene como principal característica 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

Las técnicas comunes para el diagnóstico de IBR son: seroneutralización, fijación del complemento, ELISA, neutralización viral, aislamiento viral, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.<sup>1,11</sup>

La prueba de seroneutralización tiene como propósito buscar anticuerpos neutralizantes en el suero de los animales. Si se utiliza la incubación convencional del virus de una hora a 37°C, la prueba presenta una sensibilidad de 89.2% y especificidad cercana a 100%. Sin embargo, si los reactivos se incuban durante 24 h, es posible aumentar la sensibilidad a 94.4%, pero la especificidad disminuye a 93.2%.<sup>12</sup> Una limitante de esta prueba es que sólo es certera en hatos donde no se vacuna.<sup>1</sup>

La prueba de inmunofluorescencia se utiliza para identificar antígenos o anticuerpos en material fresco (riñón y glándulas adrenales).<sup>1,13-15</sup> La prueba indirecta es más sensible, pero no lo suficiente para justificar su uso, ya que es más demorada.<sup>15,16</sup> En el examen directo de secciones congeladas de riñón fetal, la prueba tiene especificidad superior a 90% y sensibilidad de 67%.<sup>15,16</sup>

Para la técnica de inmunoperoxidasa se realizan impresiones en láminas portaobjetos a partir de los tejidos sospechosos. Estos últimos se incuban con anticuerpos contra el virus de IBR conjugados con una enzima, generalmente peroxidasa de rábano picante. Después de lavada, la impresión es tratada con el sustrato de la enzima y un cromógeno cuyos productos provocan una reacción coloreada directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra.<sup>17,18</sup> Según Smith *et al.*,<sup>17</sup> esta prueba tiene sensibilidad de 94%.

Esta técnica tiene dos ventajas para el diagnóstico; una es que no se necesitan microscopios equipados para la observación con luz ultravioleta y otra es que pueden fijarse directamente los cultivos celulares infectados en las mismas microplacas utilizadas para el aislamiento viral.

Otra prueba diagnóstica es el aislamiento viral, que tiene por inconvenientes su lentitud, ya que

tures called negative controls, especially in the case of viruses that need incubation periods longer than a week.<sup>10,19,20</sup>

Some authors mention that the abortion diagnosis is only confirmed by fetal tissue examination.<sup>1</sup> Although the different viral isolations obtained from diverse clinical presentations of the disease differ in its affinity for different organs, result serologically identical.<sup>16</sup>

Officially, the IBR diagnosis must utilize the seroneutralization test, which has been internationally accepted as reference test.<sup>10,20</sup>

As consequence of the last mentioned, it is necessary to count with an alternative test of equal value or better specificity, sensibility and faster, in order to appropriately detect infected animals and fetuses in the existing field conditions.

## Material and methods

The study is carried out in the Agricultural and Industrial Complex of Tizayuca (CAIT), Tizayuca, Hidalgo, Mexico, by means of a convenient non-probabilistic sampling in which the aborted fetuses were evaluated and obtained from the notification of employees or owners, or both, of the stables to the laboratory of pathology of CAIT, as well as serum of the progenitor cows of the fetuses through the study period.

The obtained fetuses were subjected to necropsy as described by Aluja,<sup>21</sup> dissecting the following: liver, spleen, kidney and lungs, obtaining approximately 2 cm<sup>3</sup> of each one, placing them in labeled sterile glass jars and maintaining them frozen at -4°C, during one or two days, until their arrival to the National Center of Diagnostic Services in Animal Health (CENASA), where they were analyzed.

The day in which each cow had an abortion, 10 mL of blood were extracted from the coccygeal vein. The serum was clarified by centrifugation at 1 875 g during 15 minutes and was deposited in sterile recipients; this process was repeated 30 and 60 days after the abortion. The samples were frozen conserved at -4°C until their analysis.

## Organ analysis

Each organ sample was subjected to tests: viral isolation (VI), immunoperoxidase on plate (IPP), direct immunoperoxidase (IP) and direct immunofluorescence (IF).

For the diagnosis by VI a maceration was performed with approximately 0.5 g of each organ (2 g total) in 18 mL of MEM (minimal essential medium), containing 0.2 mL of bicarbonate at 2%. It was filtered through a membrane of 0.45 µm, the technique

tarda al menos una semana; requiere de equipo, material y personal especializados. Si las muestras no se trabajan inmediatamente o son almacenadas, deben congelarse a -70°C. Cultivos de células en monocapa, homólogas o primarias se incuban a 37°C y se observan diariamente para comprobar la aparición de efecto citopático, este efecto debe valorarse en comparación con cultivos no inoculados llamados testigos negativos, en especial en casos de virus que precisan periodos de incubación superiores a una semana.<sup>10,19,20</sup>

Algunos autores mencionan que el diagnóstico en abortos sólo se confirma por examen de tejido fetal.<sup>1</sup> Aunque los diferentes aislamientos virales obtenidos de distintas formas clínicas de la enfermedad difieren en su afinidad por los distintos órganos, resultan serológicamente idénticos.<sup>16</sup>

A nivel oficial, para diagnóstico de IBR se debe utilizar la prueba de seroneutralización, que ha sido aceptada internacionalmente como prueba de referencia.<sup>10,20</sup>

Como consecuencia de lo anterior, es necesario una prueba alternativa de equivalente valor o mejor especificidad, sensibilidad y más rápida para detectar apropiadamente a los animales y fetos infectados en las condiciones existentes en campo.

## Material y métodos

El estudio se llevó a cabo en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca (CAIT), en Tizayuca, Hidalgo, México, mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia en el que se evaluaron los fetos abortados obtenidos mediante la notificación de los encargados o dueños, o ambos, de los establos al laboratorio de patología del CAIT, y los sueros de las vacas y vaquillas progenitoras de aquéllos a lo largo del periodo de estudio.

A los fetos obtenidos se les realizó la necropsia conforme a lo descrito por Aluja,<sup>21</sup> disecando: hígado, bazo, riñón y pulmón, de cada uno se obtuvieron aproximadamente 2 cm<sup>3</sup>, que se colocaron en frascos de vidrio estériles identificados y mantenidos en congelación a -4°C durante uno a dos días hasta su traslado al Centro Nacional en Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA), donde se analizaron.

El día en que cada vaca abortó, se le tomaron 10 mL de sangre mediante punción en la vena coccígea. El suero se clarificó por centrifugación a 1 875 g durante 15 minutos y 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 hasta su análisis.



was performed within the established by the World Organization Animal Health (OIE).<sup>18,19</sup>

MDBK and PK15 cellular lines were used, inoculating five bottles of 5 mL for each cellular line and sample; the bottles were daily observed during five days in order to detect cytophatic effect. If there was non effect during those days, three to five passes for each fetus sample was performed; simultaneously, IPP on plate of 96 wells was done to put in evidence the IBR viral isolation.

The IP and IF techniques were carried out as recommended by the OIE and Food and Agriculture Organization (FAO),<sup>19,20</sup> which basically consisted in cutting and placing an organ sample (liver, spleen, kidney or lung) of approximately 1 cm<sup>2</sup> with gelatin and freezing it in a cryostat to perform three cuts of 3-5 µm of thickness, placing them on a slide, and fixing them with acetone at 30%, freezing them during 10 minutes.

### **Immunofluorescence**

Each slide was washed with PBS, decanted and dried, then 25 µL of conjugate against IBR was added and incubated at 37°C during 30 minutes in humid chamber, later on they were washed with PBS and dried in order to mount them with buffered glicerine to be observed at the epifluorescence microscope.

### **Immunoperoxidase**

Each slide was washed with SL solution (PBS and Tween), decanted and dried in order to add conjugate (reference serum) and be incubated for an hour at 37°C in humid chamber in a CO<sub>2</sub> stove; later on, they were decanted and washed three times with SL solution, then dried and conjugated G protein was added, they were one more time incubated for 30 minutes at 37°C in humid chamber in a CO<sub>2</sub> stove, and were washed three times with SL solution.

Fifty µL of 3,9 aminoethylcarbazol were added, as diluted indicator in sodium phosphate and citric acid solutions, plus the substrate, and incubated for 20 minutes at room temperature (the indicator was prepared at the moment of usage); it was washed and observed in optic microscope with dry low, dry high and immersion objective.

For both tests, a positive sample was considered, when at least one of the four organ samples of only one fetus gave positive reaction to IP and to direct IF.

### **Serum analysis**

For the dams' serum, seroneutralization test was per-

## **Análisis de los órganos**

A cada muestra de órgano se le realizaron pruebas de: aislamiento viral (AV), inmunoperoxidasa en placa (IPP), inmunoperoxidasa directa (IP) e inmunofluorescencia directa (IF).

Para el diagnóstico por AV se realizó un macerado con aproximadamente 0.5 g de cada órgano (2 g en total) en 18 mL de MEM (medio esencial mínimo), conteniendo 0.2 mL de bicarbonato al 2%. Se filtró en una membrana de 0.45 µm, la técnica se realizó según la OIE.<sup>18,19</sup>

Se utilizaron las líneas celulares MDBK y PK15, inoculándose cinco botellas de 5 mL por línea celular y por muestra; las botellas se observaron diariamente durante cinco días para detectar efecto citopático. Si no hubo efecto durante esos días, se realizaron de tres a cinco pases por muestra de feto; simultáneamente se realizó IPP en placa de 96 pozos para evidenciar que el aislamiento viral fuera IBR.

Las técnicas de IP e IF se llevaron a cabo según lo recomendado por la OIE y la FAO,<sup>19,20</sup> las cuales consistieron básicamente en: Se cortó y montó una muestra de órgano (hígado, bazo, riñón y pulmón) de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> con gelatina y se congeló en un criostato para realizar tres cortes de 3-5 µm de espesor, los cuales se colocaron en un portaobjetos (laminilla), y se fijaron con acetona al 30% en congelación durante 10 minutos.

### **Inmunofluorescencia**

Cada laminilla se lavó con PBS, se decantó y secó, después se agregaron 25 µL de conjugado contra IBR, se incubó a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda, luego se lavó con PBS y se secó para montarlos con glicerina amortiguada y observarlos al microscopio de epifluorescencia.

### **Inmunoperoxidasa**

Cada laminilla se lavó con solución de lavado SL (PBS y Tween), se decantó y se secó para agregar conjugado (suero de referencia), se incubó una hora a 37°C en cámara húmeda en una estufa de CO<sub>2</sub>; posteriormente se decantó y lavó con SL durante tres veces, se secó y se le adicionó proteína G conjugada, se incubó de nuevo durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda en estufa de CO<sub>2</sub>, y se lavó en tres tiempos con solución SL.

Se agregaron 50 µL de 3,9 aminoetilcarbazol como indicador diluido en solución de fosfato de sodio y ácido cítrico más el sustrato y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente (el indicador se preparaba en el momento de usarlo); se lavó y se observó en

formed (SN) within the established by the OIE and the Food Administration Organization (FAO).<sup>18,19</sup>

### Statistic analysis

By comparing direct IP and IF with VI the proportions of: true positives, true negatives, false positives, false negatives, Sp, Se, +PV and -PV, were obtained in each test. With these results the tests of IP and IF were compared, and the gross concordance index (GCI), and the concordance by Kappa index (KI) with SN, were calculated.<sup>23,24</sup> To carry out the statistic analysis, an EPIINFO 6 program was used.

### Results

During the study period, 86 samples of aborted fetuses were obtained; from these, only 49 were possible to analyze due to autolysis.

### Viral isolation

From the 49 analyzed fetus samples, in 29 (59%) the IBR virus was isolated (Table 1).

### Immunofluorescence and immunoperoxidase

The 26.5% of the samples were positive to IF and 89.7% to IP (Table 1). While analyzing each test per organ, it was found that for IF the positive frequency varied from 13% to 18% in spleen and liver, respectively, without finding significant difference ( $P = 0.9205$ ) (Table 2). For IP by organ it was found a positive variation of 42% to 74% in liver and kidney, respectively. Such variation was significant ( $P = 0.012$ ) (Table 2).

microscopio óptico con objetivo seco débil, seco fuerte e inmersión

Para ambas pruebas 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.

### Análisis del suero

A los sueros de las madres se les realizó la prueba de seroneutralización (SN) conforme a lo establecido por la OIE y la FAO.<sup>19,20</sup> El suero hiperinmune se trabajó a dilución de 1:520.<sup>22</sup> Para la comparación entre las pruebas, el AV se utilizó como estándar diagnóstico (prueba con sensibilidad cercana al 100%).<sup>18,19</sup>

### Análisis estadístico

Al comparar IP e IF directa con AV se obtuvieron las proporciones de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos, falsos negativos, la Se, la Es, el VP(+) y el VP(-) 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 índice de Kappa (IK) con SN.<sup>23,24</sup> Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa EPIINFO 6.

### Resultados

En el periodo de estudio se obtuvieron 86 muestras de fetos abortados, de éstas sólo fue posible analizar 49 debido a la autolisis.

### Aislamiento viral

De las 49 muestras de fetos analizadas, en 29 (59%) se aisló el virus de la IBR (Cuadro 1).

**Cuadro 1**

EVALUACIÓN DE 49 MUESTRAS DE FETOS ABORTADOS, POR LAS PRUEBAS DE INMUNOFLUORESCENCIA, INMUNOPEROXIDASA Y AISLAMIENTO VIRAL PARA IBR, CAIT; MÉXICO, 1997  
EVALUATION OF 49 SAMPLES OF ABORTED FETUSES BY THE IMMUNOFLUORESCENCE, IMMUNOPEROXIDASE AND VIRAL ISOLATION TESTS FOR IBR, CAIT; MEXICO, 1997

Results	IF	%	IP	%	AV	%
Positives	13	26.5	44	89.7	29	59.1
Negatives	36	73.46	5	10.20	20	40.8
Total	49		49		49	

CAIT: Agricultural and Industrial Complex of Tizayuca, Tizayuca, Hidalgo, Mexico.

### **Sensibility (Se), specificity (Sp) and concordance between viral isolation and immunofluorescence**

The IF test presented Se of 24.1% and Sp of 70%, +PV of 53.8% and -PV of 38.9%; the concordance for KI between both tests was of -0.052, which was not significant (KI = -0.052, P= 0.6) (Table 3). Per organ, IF presented very low Se since it goes from 10% to 20%, meanwhile Sp goes from 79 to 88% for spleen and lung, respectively; in all organs the concordance for KI with VI was not significant (Table 4).

### **Sensibility, specificity and concordance between viral isolation and immunofluorescence**

The IP test presented Se of 96.7% and Sp of 20%, a +PV of 64.4% and a -PV of 80%. The concordance for KI between both tests was 0.19, which was not significant (KI = 0.19, P = 0.002) (Table 3). By organ: IP presents variations in Se, Sp, +PV and -PV, obtaining the best response in liver with a significant concordance (KI = 0.3827, P = 0.0033) (Table 4).

### **Seroneutralization**

Of the 49 analyzed fetuses it was only possible to obtain serum samples from 38 of their dams in the first sampling, 34 in the second and 26 in the third, since the herd owners did not allow the obtainment of more samples. The average value of antibodies against IBR in the animals that had an abortion was of 1:32, in general. When comparing SN to VI, variations in Se and Sp were found determined by different cutting spots. The results showed significant concordance by

### **Inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa**

El 26.5% de las muestras fueron positivas por IF y 89.7% a IP (Cuadro 1). Al analizar cada prueba por órgano, se encontró que para IF la frecuencia de positividad varió de 13% a 18% para bazo e hígado, respectivamente, sin encontrar diferencia significativa (P = 0.9205) (Cuadro 2). Para IP por órgano se encontró variación de positividad de 42% a 74% en hígado y riñón, respectivamente. Dicha variación fue significativa (P = 0.012) (Cuadro 2).

### **Sensibilidad (Se), especificidad (Es) 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 VP- de 38.9%; la concordancia por IK entre ambas pruebas fue de -0.052, la cual no fue significativa (IK = -0.052, P = 0.6) (Cuadro 3). Por órgano, IF presenta muy baja Se ya que va de 10% a 20%, mientras que la Es va de 79% a 88% para bazo y pulmón, respectivamente; en todos los órganos la concordancia por IK con el AV no fue significativa (Cuadro 4).

### **Sensibilidad, especificidad y concordancia entre aislamiento viral e inmunoperoxidasa**

La prueba de IP presentó Se de 96.7% y Es de 20% un VP(+) de 64.4% y un VP(-) de 80%. La concordancia por IK entre ambas pruebas fue 0.19, que no fue significativa (IK = 0.19, P = 0.002) (Cuadro 3). Por órgano IP presenta variaciones en Se, Es, VP(+) y

**Cuadro 2**

DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE IBR MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOPEROXIDASA, EN ÓRGANOS DE FETOS ABORTADOS. CAIT; MÉXICO, 1997

IBR ANTIGEN DETECTION BY IMMUNOFLUORESCENCE AND IMMUNOPEROXIDASE, IN ORGANS OF ABORTED FETUSES. CAIT; MEXICO, 1997

Organ	Immunofluorescence				Immunoperoxidase			
	Positive	Negative	Total	%	Positive	Negative	Total	%
Liver	8	36	44	18	18	25	43	42
Spleen	5	34	39	13	27	15	42	64
Kidney	6	31	37	16	31	11	42	74
Lung	6	35	41	14.6	19	20	39	49

CAIT: Agricultural and Industrial Complex of Tizayuca, Tizayuca, Hidalgo, Mexico

**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

SENSIBILITY, SPECIFICITY AND PREDICTIVE VALUE OF THE IMMUNOFLUORESCENCE AND IMMUNOPEROXIDASE TESTS AND THEIR CONCORDANCE WITH THE VIRAL ISOLATION TEST, CAIT; MEXICO, 1997

	Se %	Sp %	PV(+) %	PV(-) %	GCI %	KI	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 = Agricultural and Industrial Complex of Tizayuca, Tizayuca, Hidalgo, Mexico.

Se = Sensibility

Sp = Specificity

PV(+) = Positive predictive value

PV(-) = Negative predictive value

GCI = Gross concordance index

K I = Kappa index

p = Interval of confidence

only considering as positives the serums of the first sampling with values of 1:32 or greater (KI = 0.27, P = 0.04), and even in this case it shows that Se was of 68% and Sp of 61.5% (Table 5).

## Discussion

In relation with IP characteristics as diagnostic test, it was found that Se was greater (96.7%) to the one found by Smith *et al.* and Delgado *et al.*,<sup>15,17</sup> who determined a Se of 96% for avidin-biotin and 83.3% by direct technique, respectively. Nevertheless, the Sp found (20%) was less than the notified by Delgado *et al.*,<sup>15</sup> which was nearer to 100%. The high quantity of positive false derived from the low specificity, was probably due to a focal unspecific coloration that the sample proportionates and gives the morphology of the blood vessels and the presence of red blood cells in this, as it has been mentioned by Smith and Theodoris *et al.*<sup>12,25</sup> Another possible explanation is that the serum or the sample, or both, were contaminated with other type of proteins, such as the bacteriological origin and to the possible cross reaction with other herpes viruses.<sup>26</sup> Another cause in the variation of the results could be due to a low concentration of serum antibodies that is used to reveal the presence of the antigen, as Kramps mentions.<sup>3</sup> Furthermore, the coloration can not be visible if the concentration in

VP(-), teniendo la mejor respuesta en hígado con una concordancia significativa (IK = 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. 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 concordancia significativa sólo al considerar como positivos los sueros del primer muestreo con valores de 1:32 o mayor (IK = 0.27, P = 0.04), y aun en ese caso destaca que la Se fue de 68% y la Es de 61.5% (Cuadro 5).

## Discusión

En relación con las características de la IP como prueba diagnóstica, se encontró que la Se fue mayor (96.7%) a la encontrada por Smith *et al.* y Delgado *et al.*,<sup>15,17</sup> quienes determinaron una Se de 96% por avidina-biotina y de 83.3% por la técnica directa,



**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

SENSIBILITY, SPECIFICITY AND PREDICTIVE VALUE TESTS OF IMMUNOFLUORESCENCE AND IMMUNOPEROXIDASE AND THEIR CONCORDANCE WITH VIRAL ISOLATION PER ORGAN, CAIT, TIZAYUCA, HIDALGO, MEXICO, 1997

<i>Immunofluorescence</i>						
<i>Organ</i>	<i>Se %</i>	<i>Sp %</i>	<i>PV(+)</i> %	<i>PV(-)</i> %	<i>K I</i>	<i>p</i>
Liver	20	84	62.5	44.4	-0.0254	0.5999
Spleen	11.1	78.9	33.3	48.4	-0.1011	0.7938
Kidney	10	84.2	40	47.1	-0.5677	0.7055
Lung	16.7	88.2	66.7	42.9	0.0424	0.3308
<i>Immunoperoxidase</i>						
	<i>Se %</i>	<i>Sp %</i>	<i>PV(+)</i> %	<i>PV(-)</i> %	<i>K I</i>	<i>p</i>
Liver	59.3	88.4	84.2	56	0.3827	0.0033
Spleen	73.1	47.1	67.9	53.3	0.2055	0.0877
Kidney	84.6	41.2	68.8	63.6	0.2746	0.0290
Lung	42.9	44.4	47.4	40	-0.1259	0.7855

CAIT = Agricultural and Industrial Complex of Tizayuca, Tizayuca, Hidalgo, Mexico.

Se = Sensibility

Sp = Specificity

PV(+) = Positive predictive value

PV(-) = Negative predictive value

K I = Kappa index

p = Interval of confidence

the tissue is minimal, impeding that the conjugate detects its presence, as mentioned by Delgado and Kelling.<sup>15,26</sup>

The IP performed in plate to confirm the VI favors the possibility to find the antigen; since, for the elaboration of this technique, it is necessary to perform a maceration of all the organs (pool), while the direct technique of the frozen cut does not guarantee, in the evaluated tissue portion, that the antigen is in seropositive animals. Pososil *et al*<sup>27</sup> have demonstrated the presence of the virus in liver, kidney, lung and other aborted fetus organs of seronegative animals and in some experimentally infected seropositives. In sever cases of autolysis, the samples could not be evaluated by IP neither for IF, because the tissue detached itself at the moment of washing during the technique process.

In the cuts of frozen tissue, the anatomy of the evaluated organ was not always seen due to the autoly-

respectivamente. Sin embargo, la Es encontrada (20%) fue menor a la notificada por Delgado *et al.*,<sup>15</sup> que fue cercana a 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 han mencionado Smith y Theodoris.<sup>12,25</sup> Otra posible explicación es que el suero o la muestra, o ambos, estuviesen contaminados con otro tipo de proteínas, como las de origen bacteriano y también a la posible reacción cruzada con otros herpes virus.<sup>26</sup> 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.<sup>3</sup> Además, la coloración no puede ser visible si la concentración de antígeno en el tejido es mínima, impidiendo que el conjugado detecte su presencia, como lo señalan Delgado y Kelling.<sup>15,26</sup>

Cuadro 5

RESULTADOS DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALOR PREDICTIVO POSITIVO Y NEGATIVO DE SERONEUTRALIZACIÓN Y SU CONCORDANCIA CON AISLAMIENTO VIRAL, CAIT; MÉXICO, 1997  
RESULTS OF SENSIBILITY, SPECIFICITY AND POSITIVE AND NEGATIVE PREDICTIVE VALUES OF SERONEUTRALIZATION AND THEIR CONCORDANCE WITH VIRAL ISOLATION, CAIT; MEXICO, 1997

	1:4			1:8			1:16			1:32			1:64			1:128		
Sampling	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Se	96	100	94.4	92	91.3	88.9	76	78.3	77.8	68	69.6	55.6	48	50	44.4	40		
Sp	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		
PV(+)	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		
PV(-)	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		
K I	0.046		0.08	0.26	0.0048	0.01	0.15	0.16	-0.10	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 = Agricultural and Industrial Complex of Tizayuca, Tizayuca, Hidalgo, Mexico.

Se = Sensibility

Sp = Specificity

PV(+) = Positive predictive value

PV(-) = Negative predictive value

K I = Kappa index

p = Interval of confidence

sis, this condition did not interfere with the interpretation of the IP test, because the obtained coloration in the positive cases was evident; therefore, all the tissues could be evaluated, not so with IF in which, in autolysis conditions, unspecific redish coloration was observed, difficulting the interpretation of the results, which coincides with Theodoris *et al.*<sup>25</sup> and Reed *et al.*<sup>28</sup> It is to be mention that the samples that did not presented severe autolysis, the encounter fluorescence was focal and dim uniformly distributed in the nucleus and cytoplasm, specifically in kidney, which coincides with the finding by Reed *et al.*<sup>28</sup>

The Se and Sp obtained by IF (24.1%, 70%) were lower to ones found by Delgado *et al* and Smith *et al.*<sup>15,17</sup> whom obtained Se of 67% and 83.3%, respectively, not so with Sp, since Delgado *et al.*<sup>15</sup> found 100% under laboratory conditions. The lower Se could be due to the autolysis of the samples, as well as the same reasons described for IP and the treatment given to the sample, which can affect the antigenic site and the quality of the antibodies in the serum, in order to reveal the presence of the antigen.<sup>26</sup>

The correlation between the VI and IF found by Reed *et al.*<sup>28</sup> was of 50%. On the other hand, Bratanich *et al.*<sup>14</sup> mention a concordance of 83%, which is higher than the one found in the present study of only 42.9%.

In this study the organs of election for the samples

La IP realizada en placa para confirmar el AV 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.*<sup>27</sup> han demostrado presencia del virus en hígado, riñón, pulmón y otros órganos de fetos abortados de animales seronegativos y en algunos seropositivos infectados experimentalmente. En casos severos de autolisis, 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 apreció la anatomía del órgano evaluado debido a la autolisis, 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 autolisis se observó coloración inespecífica de color rojizo, dificultando en la interpretación de los resultados, lo cual coincide con lo que mencionan Theodoris *et al.*<sup>25</sup> y Reed *et al.*<sup>28</sup> Cabe señalar que en las muestras que no presentaron severa autolisis la fluorescencia encontrada fue focal y poco brillante distribuida uniformemente en el núcleo y citoplasma,

send to the laboratory were: liver, kidney and lung, which coincide with the indicated by Smith *et al.*<sup>17</sup>

The variation in the values of Sn, which go from 1:2 to higher than 1:128, in cows at the moment of abortion, coincide with the indicated by S. Van Drunen *et al.*<sup>29</sup> A problem with the serological evaluation was trying to differentiate the positive serums, since antibodies induced by natural infection or vaccination could be found, most of all if it is considered that the titers can be similar to vaccination as to natural infection.<sup>30</sup> It is important to point out that in CAIT, at the beginning of the sampling, some animals were inoculated with thermosensible attenuated vaccine and during the study every cow received inactivated or modified vaccine, even in some cases the animals were vaccinated with both types of vaccine. It should be noted that whichever the administered vaccine, it produces an observable response for up to thirty months.<sup>2,26,30,31</sup>

Although it has been mentioned that vaccination can provoke abortion, some authors state that in recently infected herds the animals present negative serology, for which it must be highlighted that in CAIT there were two animals that presented values higher than 1:128 at the moment of abortion and showed suggestive respiratory signs of IBR and were not vaccinated, what makes evident the circulation of the virus in the studied area.<sup>2,8,29,32</sup>

The high titers of these and other animals that presented abortion, might have occurred because they became infected at the place of origin, since it has been found that the time elapse between the maternal and fetal infection is variable and can fluctuate from eight to several months.<sup>33</sup>

On the other hand, it was not possible to evaluate the concordance of SN with the IP and IF tests, since the obtained results might have been due to the presence of the antigen in the fetus of immunized dams with inactive vaccine in a period not longer than six months between vaccination and abortion, not being in accordance with Posposil,<sup>27</sup> who indicates that administering a vaccine of this type prevents the virus to reach the fetus in seropositive as well as seronegative animals; without forgetting about the defense mechanisms of the host and the agent, or the possibility that the circulating virus may come from the vaccine; on the other hand, it is known that the interaction between IBR and BVD (Bovine Viral Diarrhea) has immune suppression effect for the activation of IBR in infected cattle.<sup>34</sup>

It is concluded that IP and direct IF were not fast and dependable methods for the detection of bovine herpes virus in fetal tissue. Both tests had a limited Sp for detecting the virus; it is worth noting that the IP as the IF resulted in less costly and difficult meth-

consistentemente en riñón, lo cual concuerda con lo encontrado por Reed *et al.*<sup>28</sup>

La Se y Es obtenidas por IF (24.1%, 70%) fueron menores a las encontradas por Delgado *et al.* y Smith *et al.*<sup>15,17</sup> quienes obtuvieron Se de 67% y 83.3%, respectivamente, no así la Es, ya que Delgado *et al.*<sup>15</sup> encontraron 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 y al tratamiento que se le da a la muestra, el cual puede afectar el sitio antigénico, a la calidad de los anticuerpos en el suero para revelar la presencia del antígeno.<sup>26</sup>

La correlación entre el AV y la IF encontrada por Reed *et al.*<sup>28</sup> fue de 50%. Por su parte, Bratanich *et al.*<sup>14</sup> mencionan 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, ello que concuerda con lo señalado por Smith *et al.*<sup>17</sup>

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.*<sup>29</sup> Un problema con la evaluación serológica fue 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 tanto en la vacunación como en la infección natural.<sup>30</sup> 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.<sup>2,26,30,31</sup>

Si bien se ha mencionado que la vacunación puede provocar aborto, algunos autores indican que en hatos de reciente infección los animales 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.<sup>2,8,29,32</sup>

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 ocho días hasta varios meses.<sup>33</sup>

ods than VI for the detection of bovine herpes virus. Other variables that may alter the test results are: the time that passes since the sample is taken until the diagnostic test is done, the autolysis, the quality of the conjugate, time of vaccination and the moment of abortion where the viral excretion is minimal.

There was no relation found between the results of IP and IF in relation to those of the SN; the SN test has been internationally accepted as the technique of reference; therefore, it is necessary to define the endemic condition of area where it is used.

It is necessary to continue with the studies to increase the dependability of the diagnostic tests, like the inmunoperoxidase in plate and avidin-biotin techniques, in order to reduce the false positives due to the effect of red corpuscles present in the tissues, it is also necessary to evaluate the behavior of the antibodies in a group of infected animals and immunized during all the stages of the disease, recuperation stage and reactivation of the virus in different dairy zones, to determine the relation of the results with the evolution of the disease and to specify the best test for its diagnosis.

## Acknowledgements

Special thanks for the technical support of the National Center of Diagnostic Services in Animal Health (CENASA) and the Virology and Pathology Laboratories during the practical elaboration of this study; likewise, we acknowledge the participation of the Agricultural and Industrial Complex of Tizayuca (CAIT), Tizayuca, Hidalgo: Pathology and Diagnosis of Animal Health Laboratory, for the obtainment of the samples.

## Referencias

1. Barr BC, BonDurant RH. Viral Diseases of the fetus. In: Youngquist RS, editor. Bovine theriogenology. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000:373-381.
2. Van der Poel WH, 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.
3. Kramps JA, Perrin B. A European inter-laboratory trial to evaluate the reability of serological of bovine herpesvirus 1 infections. *Vet Microbiol* 1996; 53:156-161.
4. Organización Panamericana de la Salud-Organización Mundial de la Salud. Programa de adiestramiento en salud animal para América Latina, Cuarentena Animal. México (DF): OPS, 1986.
5. Aguilar AS. El virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (Bovid herpesvirus 1): propiedades y vacunación. *Cienc Vet* 1987; 4:161-202.
6. Barajas J, Riemann H, Franti C. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for epidemiological

Por otra parte, no fue posible evaluar la concordancia de SN con las pruebas de IP e IF, ya que los resultados obtenidos pudieron deberse a 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 estando de acuerdo con Posposil,<sup>27</sup> quien indica que 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 portador y el agente, o posiblemente el virus circulante sea vacunal; por otra parte, se conoce que la interacción entre IBR y DVB (diarrea viral bovina) tiene efecto inmunosupresor para la activación de IBR en ganado infectado.<sup>34</sup>

Se concluye 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 Es limitada para detectar al virus; cabe señalar que tanto la IP como la IF resultaron métodos menos laboriosos y costosos que el AV para la detección del herpes virus bovis. 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.

No se encontró relación entre los resultados de IP e IF respecto de los de SN; la prueba de SN ha sido aceptada internacionalmente como la técnica de referencia; por tanto, es necesario definir el estado endémico del área donde se utilice.

Es necesario continuar con los estudios para aumentar la confiabilidad de las pruebas diagnósticas, como las técnicas de inmunoperoxidasa en placa y 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 determinar la relación de los resultados con el comportamiento de la enfermedad y determinar la mejor prueba para su diagnóstico.

## Agradecimientos

Se agradece el apoyo del Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA), y del Laboratorio de Virología y Patología durante la elaboración práctica; asimismo, se reconoce la participación del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca (CAIT), Tizayuca, Hidalgo: Laboratorio

- studies of diseases of livestock in the tropics of Mexico. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1993; 12: 717-732.
7. Howard J. *Current Veterinary Therapy 3: Food Animal Practice*. Philadelphia: Saunders, 1993.
  8. Pastoret PP, Thiry E, Brochier B, Derboven G. Bovid herpes virus infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann Rech Vet* 1992;13: 221-235.
  9. Wohlgemuth K, Domínguez J, López L. El complejo respiratorio bovino: etiología viral. Memorias del XIV Congress on Veterinary Sciences. PANVET. 1994 octubre 9-15; Acapulco (Guerrero) México (DF): Asociación Panamericana de Ciencias Veterinarias, 1994: 430-432.
  10. Oficina Internacional de Epizootias. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. Organismo Internacional de Epizootias 1995; 322-328.
  11. Aguilar S. Recomendaciones para la prevención contra la rinotraqueítis infecciosa bovina (Bovis herpesvirus 1, BHV-1). Memorias del V Curso Internacional de Reproducción Bovina; 1993 mayo 11-13; Distrito Federal (México) México (DF): Academia de la investigación en biología de la reproducción. 1993: 253:260.
  12. Smith DR. *Veterinary clinical epidemiology: A problem oriented approach*. Buenos Aires-Argentina: University of Illinois E.U.A, 1990.
  13. Brock K, Potgieter N. Rapid fluorescence detection of *in situ* hybridization with biotinylated bovine herpesvirus-1 DNA probes. *J Vet Diagn Invest* 1989; 1:34-38.
  14. 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 Argent. Microbiol* 1990; 22: 192-198.
  15. Delgado I, Barrera M, Tuero C, Rodríguez N. Comparación de tres métodos de detección de antígeno para el diagnóstico de herpes bovino tipo 1. *Salud Animal* 1992; 14: 143-148.
  16. Babiuk LA, Van Drunen S, Tikoo SK. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol* 1996; 53: 31-42.
  17. Smith GH, Collins KJ, Carman J. Use of immunoperoxidase test for the detection of bovine herpesvirus-1 in aborted fetal tissue. *J Vet Diagn Invest* 1989;1:39-44.
  18. Gimeno E, Belak K, Massone A, Echeverria M, Ibargoryen G. Técnicas inmunohistoquímicas en patología veterinaria: Aspectos Teóricos y Prácticos. *Vet Argent* 1988; 5: 332-338.
  19. Oficina Internacional de Epizootias. *Manual of recommended diagnostic techniques and requirements for biological products for list A and B diseases*. 1990; Vol. II.
  20. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Oficina regional para América Latina y el Caribe. Red de Cooperación Técnica entre Laboratorios de Investigación y diagnóstico veterinario. Manual de técnicas para de Patología y Diagnóstico, Sanidad Animal, por la obtención de las muestras.
- 
- diagnóstico virológico. FAO Centro de investigaciones de ciencias veterinarias INTA, Argentina, 1987.
  21. Aluja SA. *Necropsias en animales domésticos*. México DF: Continental, 1985.
  22. 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;13:947-960.
  23. Galen R S. Use of predictive value theory in clinical immunology. *Manual of clinical laboratory immunology*. 3<sup>a</sup> ed. Washington DC : A Soc Micro 1986.
  24. Morton A, Hebel C. *Bioestadística y Epidemiología*. 3<sup>a</sup> ed. México DF: Interamericana, Mc Graw-Hill, 1993.
  25. Theodoris A. Studies on bovine herpesviruses. Part I. Isolation and characterization of viruses isolated from the genital tract of cattle. *Onderstepoort J Vet Res* 1985; 52:239-254.
  26. Kelling CL, Schipper IA, Haugse CN. Antibody response in calves administration of attenuated infectious bovine rinothracheitis (IBR) vaccine. *Can J Comp Med* 1973; 37: 309-312.
  27. 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 Microbiol* 1996; 53: 199-206.
  28. Reed DE, Bicknell EJ, Larson CA, Knudtson WU, Kikbride CA. Infectious bovine rhinotracheitis virus-induced abortion: rapid diagnosis by fluorescent antibody technique. *J Vet Res* 1971, 32: 1423-1426.
  29. Van Drunen S, 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: 36-44.
  30. Kaashhoek JM, Rijsewijk JT. Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection. *Vet Microbiol* 1996;53: 103-110.
  31. Baker JC, Steven RR, Walter 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: 814-816.
  32. Mars MH, Brusckhe CJ, Van Oirschot JT. Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Vet Microbiol* 1999; 66: 197-207.
  33. Moraga BL, Berrios PE, Zurita LA, Celedón M, Guajardo U, Ortega A. Rinotraqueítis Infecciosa Bovina III. Infección experimental en vaquillas gestantes. *Avances en Cienc Vet* 1990;5:129-135.
  34. 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.