

Veterinaria México

Volumen 36
Volume

Número 3
Number

Julio-Septiembre 2005
July-September

Artículo:

Utilización de estuches de diagnóstico de
inmunofluorescencia e
inmunoperoxidasa directas para la
determinación de parainfluenza 3 bovina
y herpesvirus bovino 1 en Cuba

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Otras secciones de
este sitio:**

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)

Utilización de estuches de diagnóstico de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa directas para la determinación de parainfluenza 3 bovina y herpesvirus bovino 1 en Cuba

Use of direct immunofluorescence and immunoperoxidase diagnostic kits for bovine parainfluenza 3 and bovine herpes virus 1 in Cuba

Irma Delgado Delgado* Maritza Barrera Valle* Norbis Rodríguez Barrero* Lilián Sánchez Miranda*
Susana Mendoza Elvira** Abel Ciprián Carrasco**

Abstract

Early diagnosis is one of the main strategies in programs against different diseases that affect health and production of livestock. Bovine Herpes Virus 1 (BHV-1) is an important cause of morbidity and mortality in cattle and the Bovine Parainfluenza 3 (PI-3) virus causes a febrile, highly contagious pneumonia of acute course affecting different types of cattle. Direct immunoperoxidase (DIP) and direct immunofluorescence (DIF) tests for the diagnosis of BHV-1 and PI-3 in nasal secretions were standardized and established at CENSA. The diagnostic kits were validated, inspected and registered. The kits were useful to detect viral contamination in cell cultures; as well as for the identification of calves free of PI-3 and HPV-1, for diagnostic services in preputial washes of seroreactive bulls during artificial insemination; and for the differential diagnosis of vesicular diseases. Samples were taken from animals with respiratory signs to determine the role of these agents in the etiology of pneumonia cases from Havana and Granma provinces. It was found that the PI-3 virus had greater involvement. The kits proved to be useful for their rapidity, sensitivity and specificity. They are less time consuming and less expensive than viral isolation. It is recommended to extend the use of these kits in order to determine the actual role of BHV-1 and PI-3 viruses in different diseases found in this species, since screening for these viruses would be difficult using viral isolation.

Key words: DIAGNOSTIC KITS, IMMUNOPEROXIDASE, IMMUNOFLUORESCENCE, BHV-1, PI-3.

Resumen

El diagnóstico oportuno constituye una de las principales estrategias en los programas de lucha contra las enfermedades que afectan la salud y la producción de la ganadería bovina. El herpes virus bovino tipo 1 (HVB-1) representa una causa importante de morbilidad y mortalidad en ese ganado, mientras que el virus de la parainfluenza 3 bovina (PI-3) es causante de neumonía contagiosa de curso agudo y febril, además de que ha afectado diferentes tipos de ganado, debido a su difusión tan extensa. En el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, se estandarizó y estableció la producción de pruebas de inmunofluorescencia (IFD) y de inmunoperoxidasa directas (IPD) para el diagnóstico de los virus PI-3 y HVB-1 en secreciones nasales. Los sistemas de diagnóstico (estuches), validados, inspeccionados y registrados fueron útiles para determinar la contaminación viral en cultivos celulares, en la identificación de terneros libres de PI-3 y HVB-1, así como para prestar servicios de diagnóstico en la inseminación artificial en lavados prepuciales de toros reproductores, en el diagnóstico diferencial de enfermedades vesiculares y con el fin de determinar la participación de tales agentes en la etiología de la neumonía. Con este propósito se muestrearon animales con síntomas respiratorios en las provincias de la Habana y Granma, donde se comprobó que el virus PI-3 tuvo mayor participación. Asimismo,

Recibido el 16 de agosto de 2004 y aceptado el 11 de febrero de 2005.

*Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Carretera de Jamaica y Autopista Nacional, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, Apartado Postal 10, Telefax: 06463897, E-mail: irmad@censa.edu.cu

**Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 222, Cuautitlán-Izcalli, Estado de México, México.

se demostró la utilidad de los estuches, por su rapidez, sensibilidad, especificidad, además de que son menos laboriosos y costosos que el aislamiento viral. Se recomienda extender su uso para conocer la verdadera importancia del HVB-1 y del PI-3 en diferentes procesos morbosos en esta especie, pues sería difícil la detección de estos virus mediante aislamiento viral.

Palabras clave: JUEGOS DIAGNÓSTICOS, INMUNOPEROXIDASA, INMUNOFLUORESCENCIA, HVB-1, PI-3.

Introduction

Livestock development during the last few years has stimulated research in new diagnostic methods and disease prevention, especially for viral diseases that are dangerous because they spread rapidly causing great economic losses. Respiratory and enteric diseases are the main cause of mortality in calves, leading to great losses not only for this reason, but also because of weight loss and medication costs.^{1,2}

Diagnostic methods such as the direct or indirect immunofluorescence and immunoperoxidase tests can be used as alternative methods in laboratories with few technical resources because they are fast, simple, sensitive and specific, and allow an efficient diagnosis of viral diseases.³⁻⁶ Bovine Herpes virus type 1 (BHV-1), also known as infectious bovine rhinotracheitis (IBR), and as infectious pustular vulvovaginitis (IPV), is an important cause of morbidity and mortality and is associated with different clinical syndromes.^{1,7-11} The bovine parainfluenza-3 virus (PI-3) is the causal agent of an acute and febrile contagious pneumonia, characterized by an inflammatory process of the respiratory tract. It is widely spread in cattle, sheep, goats and swine.^{1, 11-15}

These organisms have been isolated in Cuba and currently the diagnosis is mainly made by serology, hem agglutination inhibition (HAI) for PI-3 virus, and serum neutralization for BHV-1, considering the need to adopt fast, simple, sensitive and specific methods to allow the detection of these viral agents. Technical methods to produce diagnostic kits for the identification of viral antigens PI-3 AND BHV-1 in nasal secretions were developed and standardized at the Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) (National Center of Farm Animals Health) The kits were validated, inspected, registered and are commercially available.

The objective of this work was the use of the DIF and DIP diagnostic kits for the detection of PI-3 and BHV-1 in animals from the provinces of Havana and Granma.

Introducción

El desarrollo obtenido en la ganadería en los últimos años, ha estimulado la búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico y prevención de enfermedades que afectan al ganado, entre ellas las de origen viral constituyen un gran peligro, pues al difundirse rápidamente dejan lamentables daños económicos. Las patologías respiratorias constituyen junto con las enfermedades entéricas, la principal causa de mortalidad en terneros, lo que ocasiona pérdidas, no sólo por este concepto, sino también por pérdida de peso y costo de medicamentos.^{1,2}

Existen métodos diagnósticos, como la inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa directas e indirectas que se pueden utilizar como alternativas en laboratorios no tan equipados técnicamente, pues son rápidos, sencillos, sensibles, específicos y permiten diagnosticar eficientemente las enfermedades virales.³⁻⁶ El herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1) también conocido como virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y de la vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), es causa importante de morbilidad y mortalidad en este ganado y está asociado con una variedad de síndromes clínicos.^{1,7-11} El virus de la parainfluenza-3 bovina (PI-3) es causante de neumonía contagiosa de curso agudo y febril, caracterizada por procesos inflamatorios de las vías respiratorias y se encuentra muy difundido entre los ganados bovino, ovino, caprino y porcino.^{1,11-15}

Estos agentes se han aislado en Cuba y en la actualidad el diagnóstico que se realiza es fundamentalmente por serología, para el virus PI-3 por inhibición de la hemoaglutinación (IHA) y para virus HVB-1 por seroneutralización, teniendo en cuenta la necesidad de implantar métodos rápidos, sencillos, sensibles y específicos que permitan detectar estos agentes virales. En el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) se estandarizaron y establecieron técnicas de producción de los juegos de diagnóstico de inmunofluorescencia directa (IFD) y de inmunoperoxidasa directa (IPD), para la identificación de los antígenos virales de PI-3 y de HVB-1 en secreciones nasales. Los juegos fueron validados, inspeccionados, registrados y se han comercializado.

El objetivo de este trabajo fue la utilización de los

Material and methods

Diagnostic kits

The diagnostic* kit for the detection of PI-3 has five components, a polyclonal anti-PI-3 IgG conjugated with fluorescein isothiocyanate,** a glass cover slip with cells inoculated with PI-3 used as positive controls, and other cells not inoculated as negative controls, 25x tampon solution, contrast solution and fixing solution. The DIP diagnostic kit for HVB-1 has the same components, but the IgG is anti BHV-1

The functional characteristics studied during the validation stage of the DIF test showed an analytical sensitivity of 10^5 IDTC₅₀/ml (infectious dose in tissue culture); a diagnostic sensitivity of 85.7% and a specificity of 100%, with 88% agreement for PI-3; analytical sensitivity of 10^5 DICT₅₀/ml; diagnostic sensitivity of 83.3% and 100% specificity with 91.4% agreement for HVB-1. The DIP test showed an analytical sensitivity of 10^5 DICT₅₀/ml, 94% diagnostic sensitivity and 100% specificity, with 92.7% for PI-3; with the same analytical and diagnostic sensitivity and specificity for the DIF test for BHV-1.^{16,17} The four diagnostic kits (DIF and DIP for both PI-3 and BHV-1) are used according to the user's affordability because the DIF test requires a fluorescence microscope while the DIP test only requires an optical microscope.¹²

Shelf life and expiration date

To learn about the shelf stability of the product as well as to determine the expiration date, 3 lots of each diagnostic kit were stored. The reagents were kept between 2 and 8°C, except for the controls that were kept at -20°C. The DIF and DIP kits were evaluated every month during the first six months and every two months thereafter until 18 months, the fluorescence or color decay was considered as a measure of stability loss. The determinations were repeated three times. Each component was measured separately taking a reagent from the diagnostic kit. The reagents were recently prepared, no more than 10 months before.¹⁶⁻²⁰

Validation of field studies

Nasal swabs were taken from 746 clinically healthy three-month-old calves and DIF and DIP tests were conducted for PI-3 and BHV-1 indistinctly with the diagnostic kits. In order to detect subclinical infections with virus shedding, DIF and DIP tests were performed on 52 samples of preputial washes from 13 bulls positive to BHV-1 in serum that were sampled every 7 days during four occasions.

estuches diagnósticos de IFD e IPD para la determinación de PI-3 y de HVB-1, en bovinos de las provincias de la Habana y Granma.

Material y métodos

Estuches diagnósticos

El estuche diagnóstico* para la determinación de PI-3 está constituido por cinco componentes (una IgG policlonal anti-PI-3 conjugada con isotiocianato de fluoresceína,** portaobjetos con células inoculadas con PI-3 y otros son células sin inocular, las células se utilizan como testigos positivos y negativos, respectivamente; solución tampón 25x, solución de contraste y solución para montaje; asimismo, el estuche diagnóstico de IFD para HVB-1 cuenta con los mismos componentes, pero la IgG es una anti-HVB-1.

Las características funcionales estudiadas durante la etapa de validación de la prueba de IFD mostraron sensibilidad analítica de 10^5 DICT₅₀/ml (dosis infectantes en cultivo de tejidos); sensibilidad diagnóstica de 85.7% y especificidad del 100%, con coincidencia de 88% para PI-3; sensibilidad analítica de 10^5 DICT₅₀/ml; sensibilidad diagnóstica de 83.3% y especificidad de 100% con coincidencia de 91.4% para HVB-1. La prueba de IPD mostró sensibilidad analítica de 10^5 DICT₅₀/ml; sensibilidad diagnóstica de 94% y especificidad de 100% con coincidencia de 92.7% para PI-3; y la misma sensibilidad analítica, sensibilidad diagnóstica y especificidad de IFD para HVB-1 con IPD.^{16,17} Los cuatro estuches diagnósticos (IFD e IPD para PI-3 y para HVB-1), se utilizan de acuerdo con las posibilidades del usuario, ya que la IFD conlleva el uso de un microscopio fluorescente, mientras que la IPD sólo un microscopio óptico.¹²

Estudio de estabilidad en anaquel y caducidad

Con el propósito de conocer la estabilidad del producto en anaquel y establecer su caducidad, se almacenaron tres lotes de cada tipo estuche diagnóstico. Los reactivos se conservaron entre 2 y 8°C, excepto los testigos que se conservaron a -20°C. Los estuches de IFD e IPD se evaluaron cada mes durante el primer semestre y luego cada dos meses hasta completar 18 meses, el decaimiento de la fluorescencia o de color se tomó como medida de la pérdida de la estabilidad. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Asimismo, se midieron cada uno de los componentes por

* Comercializados por C. Kure, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Carretera de Jamaica y Autopista Nacional, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

** Sigma, Missouri.

Nasal secretion samples were taken from calves of different ages and from various herds located in the Havana province that presented symptoms compatible with the respiratory syndrome, such as fever, cough, nasal and eye secretions. Some samples were run with the DIP test and others with the DIF test for both viruses. In order to detect P-I3, 304 samples were taken from 6 herds. Of these samples, 151 were run for DIP and 153 for DIF. For BHV-1, a total of 377 samples were taken from the 7 herds, 188 were run for DIP and 189 for DIF.

Nasal swab samples from calves of different ages belonging to herds with symptoms compatible with respiratory syndrome or upper respiratory disease were analyzed at the Centro de Epizootiología y Diagnóstico (Center of Epizootiology and Diagnosis) in the Granma province and they were subjected to DIF or DIP tests. For PI-3, 179 samples were run by DIP and 101 by DIF for a total of 280 samples. For BHV-1, 160 samples were run by DIP and 127 by DIF comparatively, for a total of 287 samples.

Results

The DIF and DIP diagnostic kits for both viruses (PI-3 and HVB-1) were stable up to 10 months after manufacturing and kept at 2 to 8°C. The most labile components were the conjugate, the enzyme diluent for the conjugate (1% egg albumin) and the control glass cover slip.

In clinically healthy animals 85.4% were negative by DIF and 92.5% were negative by DIP for PI-3; 94.7% were negative by DIF and 96.7% by DIP for HVB-1.

The DIF and DIP tests detected 26 and 24 samples respectively (fifty total samples), from the 52 samples taken four times from 13 positive bulls with subclinical infections from which the virus was isolated 46 times.

The results obtained with the tests used in the province of Havana showed that 63.2% and 59.7% of the samples were positive for PI-3 by DIF and DIP respectively, while for BHV-1, 18.2% and 25.8% were positive by DIF and DIP respectively. The results in the Granma province indicated that 62% of the samples were positive for PI-3 virus by both tests, DIF and DIP. For BHV-1, 20.1% and 23.1% were positive by DIF and DIP respectively. Results are shown in Table 1.

Discussion

The results showed a 10-month stability. However, in order to have enough time for coverage, and due to the tropical conditions of the country and management of the cold chain, only a 6 month shelf life was given to the kits, as would be expected because of their biological nature.²¹

separado, para ello se tomó un reactivo del estuche diagnóstico, al cual se le estaba midiendo su estabilidad y los reactivos preparados recientemente con antigüedad de diez meses.¹⁶⁻²⁰

Estudios de validación en campo

Se tomaron muestras de exudado nasal de 746 terneros de tres meses de edad, clínicamente sanos, se les realizaron pruebas de IFD o IPD para PI-3 y HVB-1 en forma indistinta con los juegos de diagnóstico. Con el fin de detectar infecciones subclínicas con excreción de virus, se utilizaron indistintamente la IFD e IPD en 52 muestras de lavados prepuciales, de 13 toros serorreactores frente a HVB-1, que fueron muestreados cada siete días durante cuatro ocasiones.

Se tomaron muestras de exudados nasales en terneros de distintas edades, procedentes de diferentes recrias ubicados en la provincia de la Habana y que presentaban síntomas compatibles con síndrome respiratorio, como fiebre, tos, secreciones nasales y oculares, a unas muestras se les realizó la prueba de IFD y a otras la de IPD, con ambos virus. Para determinar P-I3 se muestrearon animales de seis recrias, se realizaron 151 y 153 determinaciones por IPD e IFD, respectivamente, para un total de 304, para HVB-1 se tomaron muestras de animales de siete recrias, se realizaron 188 y 189 determinaciones por IPD e IFD, comparativamente para un total de 377.

En el Centro de Epizootiología y Diagnóstico de la provincia Granma se analizaron muestras de exudados nasales de terneros de diferentes edades, procedentes de recrias que presentaban síntomas compatibles con síndrome respiratorio o enfermedad respiratoria alta, y se les realizó la prueba de IFD o IPD. Para detectar PI-3 se realizaron 179 y 101 determinaciones por IPD e IFD, respectivamente, para un total de 280, para HVB-1 se trabajaron 160 y 127 determinaciones por IPD e IFD comparativamente para un total de 287.

Resultados

Los estuches de diagnóstico de IFD y de IPD de ambos virus (PI-3 y HVB-1) fueron estables hasta los diez meses de producidos y conservados entre 2 a 8°C. En el estudio de los componentes, los más lábiles fueron los conjugados, el diluyente del conjugado enzimático (albúmina de huevo al 1%) y los portaobjetos testigo.

En animales clínicamente sanos se encontró 85.4% negativos con IFD y 92.5% negativos con IPD a PI-3; 94.7% negativos con IFD y 96.7% con IPD a HVB-1.

Las pruebas de IFD y de IPD detectaron 26 y 24 muestras positivas, respectivamente (50 en total), a partir de 52 muestreos realizados en cuatro ocasiones

The DIF and DIP kits were useful because they were applicable to clinically healthy calves that were serologically negative and that were going to be used in other experiments. Fast results were necessary or the animals would run the risk of contamination with these organisms. If viral isolation was used, viral isolation would have been a problem because it takes as long as 28 days and it is also expensive and impractical due to the large number of samples.

The DIF and DIP kits detected 96.2% positive samples with an 88.5% viral isolation rate, in spite of the low titers in viral concentration that these samples usually have because they come from bulls with sub-clinical infections and genital subtype strains, where the viral load is low.^{3,22-24}

These preliminary results indicate that these immunohistochemical techniques can be used for rapid diagnosis of BHV-1, and repeated periodically on the bulls used in artificial insemination centers to find out if they are shedding the virus. If the bulls are tested during active viral shedding, the number of viral particles is higher therefore, within the detection range of these methods. Also, because results are fast, semen can be collected only from negative bulls, saving work and semen straws. Even though viral isolation or nucleic acid hybridization were to be performed later to confirm the virus,²⁵ the number of samples to test would be smaller and would save costs from these expensive methods.^{3,10,22,24,26,27}

In the study conducted in the Havana province, a 38.6% average positive rate for PI-3 was found with both tests in calves with respiratory signs, whereas for BHV-1 the average was 22% with both tests. In the Granma province, 38% were positive for PI-

con 13 toros serorreactores y con infecciones subclínicas, de donde se aisló el virus en 46 ocasiones.

Con las pruebas utilizadas los resultados encontrados en la provincia de la Habana, mostraron que 63.2% y 59.7% fueron positivos a las pruebas de IFD e IPD, respectivamente, con el virus PI-3, mientras que para el virus HVB-1 se encontró que 18.2% y 25.8% fueron positivos a las pruebas de IFD e IPD, respectivamente. Los resultados encontrados en la provincia Granma mostraron que 62% fueron positivos a ambas pruebas de IFD e IPD con el virus PI-3, mientras que para el virus HVB-1 se encontró que 20.1% y 23.1% fueron positivos a las pruebas de IFD e IPD, respectivamente. Los resultados se presentan en el Cuadro 1.

Discusión

Los resultados mostraron una estabilidad de diez meses; sin embargo, para tener tiempo suficiente de cobertura y por las condiciones tropicales del país y el manejo de la cadena fría, se le dio solamente seis meses de caducidad, lo cual era de esperarse por su naturaleza biológica.²¹

Los estuches para IFD y de IPD resultaron útiles, ya que se aplicó en terneros clínicamente sanos y seronegativos a estos virus bovinos, que iban a ser utilizados en otros experimentos, por lo que fue necesario tener los resultados lo más rápidamente posible, pues se corría el riesgo de que los animales se contaminaran con estos microorganismos y era problemático hacerlo mediante aislamiento viral en corto tiempo, teniendo en cuenta las características de esta técnica que resulta cara, los resultados se demoraban

Cuadro 1

RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE PI-3 Y HVB-1 MEDIANTE LAS PRUEBAS DE IFD E IPD EN
TERNEROS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA EN LAS PROVINCIAS DE LA HABANA Y GRANMA
RESULTS OF PI-3 AND BHV-1 SCREENING BY DIF AND DIP IN CALVES WITH RESPIRATORY INFECTION
FROM THE PROVINCE OF HAVANA AND GRANMA

PI-3	Havana province		Granma province	
Test	Negative	Positive	Negative	Positive
	N*/%	N*/%	N*/%	N*/%
DIF**	153/63.2	89/36.8	101/62	62/38
DIP***	151/59.7	102/40.3	179/62	110/38
BHV-1				
DIF**	189/81.8	42/18.2	127/79.9	32/20.1
DIP***	118/74.2	41/25.8	123/76.9	37/23.1

*Number of animals sampled

** Direct immunofluorescence.

*** Direct immunoperoxidase

3, and 21.6% for BHV-1. Through these results, the role of PI-3 and BHV-1 has been established in different herds from Havana and Granma provinces. It was found that the PI-3 virus is more common than BHV-1, which agrees with the serology survey results obtained by other authors from Cuba and other countries.^{4,15} According to the serology diagnosis, generally a higher prevalence of anti PI-3 antibodies is found. However, although seroconversion or a significant increase in antibody titers indicate infection, it cannot be definitely concluded that the PI-3 was the only cause of symptoms. The suspicion is confirmed isolating the virus or identifying the viral antigen with immunohistochemistry methods such as DIP and DIF.²⁸

The HVB-1 belongs to the Herpesviridae family. The members of this family typically produce latency; clinical signs are not necessarily found. Therefore, a single positive serum sample to the antibodies indicates that the animal is infected or was in intrinsic contact with the organism, but not necessarily shedding the virus at the time when the sample was taken. Viral antigen determination from nasal swabs was very important because it showed that this virus was the primary cause of infection in the animal.^{7,29}

It is necessary to extend the use of these techniques in veterinary laboratories, since they offer alternative diagnostic methods in accordance with the equipment found among the users. These techniques are not complicated and they can be used to learn more about the role of PI-3 and BHV-1 in reproductive problems of bovines.

Acknowledgements

Our gratitude to Sara Castell, Wilfredo Bernardo and Raisa Rodriguez for their assistance and David Trujillo Cevallos for his help with computers.

Referencias

1. Wyler R, Engels M, Schwyzer M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: Wittmann G, editor. *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs*. Boston: Kluwer Academic Publishers;1989:1-30.
2. Bennett RH, Christiansen K, Clifton-Hadley, RS. Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cows. *J Dairy Res* 1999;66:455-459.
3. Dennet DP, Barasa JQ, Johnson JH. Infectious bovine rhinotracheitis virus: studies on the venereal carrier status range of cattle. *Res Vet Sci* 1976;20:77-83.
4. Barrera M. *Herpesvirus Bovino-1: Obtención de Medios de Diagnósticos y Prevención* (tesis doctorado en Ciencias Veterinarias). La Habana (Cuba): Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, 1996.
5. Ogino H, Kaneko H, Nakabayashi D, Watanabe

hasta 28 días y es impracticable para gran número de muestras, como las que se analizaron en este trabajo.

Los estuches de IFD y de IPD detectaron en conjunto 96.2% de muestras positivas, de donde se aisló el virus en 88.5% de las ocasiones, a pesar de los niveles de concentración viral, pues este tipo de muestras tienen bajos títulos, debido a que provienen de toros con infecciones subclínicas y con cepas del subtipo genital, donde el virus se multiplica muy poco.^{3,22-24}

Estos resultados preliminares indican que estas técnicas inmunohistoquímicas pueden emplearse en el diagnóstico rápido de HVB-1 que se puede realizar periódicamente en los toros en los centros de inseminación artificial para comprobar si están o no excretando virus. Si los toros se hallaban en la fase de excreción activa de virus, la concentración de partículas virales es mayor y se encuentra dentro de los límites de detección de estas técnicas. Además, debido a que los resultados se obtienen en poco tiempo, se puede efectuar la recolección de semen sólo a los toros negativos, lo que constituye un ahorro de trabajo y pajillas de semen. Aunque después se utilice el aislamiento viral o la hibridación de ácidos nucleicos para confirmar la no presencia de virus,²⁵ sería menor el número de muestras a probar, lo que resultaría un ahorro debido al alto costo de estas técnicas.^{3,10,22,24,26,27}

En el estudio realizado en la provincia de La Habana se determinó un porcentaje promedio con las dos pruebas de 38.6 puntos de positividad con PI-3, en los terneros que presentaban afecciones respiratorias mientras que con HVB-1 fue en promedio con las dos pruebas de 22%; en la provincia de Granma presentaron 38% de positividad con PI-3, mientras que con HVB-1 fue de 21.6%. Mediante estos resultados se ha conocido la participación del PI-3 y del HVB-1 en diferentes recrias de las provincias de La Habana y Granma; al analizarlos se observó que el virus de la PI-3 fue más frecuente que el HVB-1, lo cual concuerda con los resultados obtenidos mediante encuesta serológica por otros autores, tanto en Cuba como en otros países,^{4,15} según el diagnóstico serológico, generalmente se observa gran predominio de anticuerpos anti-PI-3; sin embargo, aunque la seroconversión o los aumentos significativos de título de anticuerpos son indicadores de infección no pueden indicar de forma concluyente que el PI-3 haya sido la única causa de los síntomas observados. Esta sospecha se confirma mediante aislamiento del virus e identificación del antígeno viral, por métodos inmunohistoquímicos, como la IPD y la IFD.²⁸

El HVB-1 pertenece a la familia Herpesviridae, que se caracteriza porque sus miembros producen latencia y no necesariamente presentan signos clínicos, por lo que una muestra única de suero positiva

- T, Murayama J. Pathology of bovine abortion and newborn calf death caused by dual infection with *Chlamidia psitacci* and infectious bovine rhinotracheitis virus. *J Vet Med Sci* 1996;58:67-70.
6. Ahmed-I, Hameed-A, Memon-M, Naeem-K. Seroprevalence of bovine herpesvirus 1 among cattle and buffaloes in Pakistan. *Pak Vet J* 1999;19:60-63.
 7. Wentink GH, Van Oirschot JT, Verhoeff J. Risk of infection with bovine herpesvirus 1 (BHV1): a review. *Vet Q* 1993;15:30-33.
 8. Arboleda JJ, Rodas JD, Ossa JE, Zuluaga FN. Espectro clínico y epidemiológico de la rinotraqueítis infecciosa bovina. *Rev Col Cienc Pec* 1996;9:3-13.
 9. Muñoz Ma Cristina. Diagnóstico de aborto infeccioso bovino. Morfopatología fetal (tesis doctorado en Ciencias Veterinarias). La Habana (Cuba): Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, 1996.
 10. Ganges LL, Barrera M, Cedeño I, Montalvo JM. Diagnóstico de Herpesvirus bovino-1 en toros mediante inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia. *Rev Salud Anim* 1997;19:51-52.
 11. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. Herpesviridae. In: Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ, editors. *Veterinary virology*. San Diego, London, Boston, New York, Sidney, Tokio, Toronto: Academic Press; 1999:301-325.
 12. Delgado DI. Introducción a la práctica productiva de la inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa directas para el diagnóstico de parainfluenza 3 bovina y rinotraqueítis infecciosa bovina. Producción y aplicación de los diagnosticadores (tesis de maestría). La Habana (Cuba): Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, 2001.
 13. Molina S, Cadavid JF, Zapata MO, Castaño H, Arboleda JJ. La Parainfluenza Bovina en núcleos de ganado BON en el departamento de Antioquia. *Rev Col Cienc Pec* 1997;10:27-38.
 14. Molina S, Castaño H, Cadavid JF, Arboleda JJ, Zapata MO. Estudio serológico para el virus de la Parainfluenza 3 en el Hato BON en el Departamento de Antioquia. *Rev Col Cienc Pec* 1998;11:81-86.
 15. Obando RC, Hidalgo M, Merza M, Montoya A, Klungeborn B, Moreno-Lopez J. Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and others viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). *Prev Vet Med* 1999;41:271-278.
 16. Delgado I, Barrera M, Tuero C, Rodríguez N. Comparación de tres métodos de detección de antígenos para el diagnóstico de HVB-1. *Rev Salud Anim* 1992;3:143-148.
 17. Delgado I, Barrera M, Rodríguez N. Comparación de tres métodos de detección de antígenos para el diagnóstico de Parainfluenza 3 Bovina. *Rev Salud Anim* 1994;1: 89-92.
 18. Jacobson RH. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev Sci Tech* 1998;17:469-486.
 19. Greiner M, Gardner IA. Epidemiological issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Prev Vet Med* 2000;45:3-22.

a anticuerpos indica que el animal está infectado o que estuvo en contacto intrínseco con el agente, pero no necesariamente que estaba excretando el virus en el momento del muestreo, la determinación de antígenos virales a partir de exudados nasales fue muy importante, ya que indicó que este agente era la causa de la infección primaria que padecía el animal.^{7,29}

Es necesario extender el uso de estas técnicas en los laboratorios de la red veterinaria, ya que sirven como métodos alternativos de diagnóstico, de acuerdo con el equipamiento que tengan los usuarios, que en el caso de estas técnicas no es complejo; de manera que se pueda conocer más ampliamente la participación del PI-3 en el síndrome respiratorio y del HVB-1 y en los problemas reproductivos del bovino.

Agradecimientos

Se agradece a Sara Castell, Wilfredo Bernardo y Raisa Rodríguez su asistencia en el trabajo, y a David Trujillo Cevallos por su asistencia técnica en informática.

-
20. Greiner M, Gardner IA. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiological studies. *Prev Vet Med* 2000;45:43-59.
 21. Croubels S, De Baere S, De Backer P. Practical approach for the stability testing of veterinary drugs in solutions and in biological matrices during storage. *Anal Chim Acta* 2003;483:419-427.
 22. Chapman MS, Lucas MH, Hebert CN, Goodey RG. Survival of infectious bovine rhinotracheitis virus stored in bovine semen. *Vet Sci Commun* 1979;3:137-139.
 23. Schultz RD, Adams LS, Letchworth G, Sheffy BE, Morning T, Rean B. A method to test large numbers of bovine semen samples for viral contamination and result of study using this method. *Theriogenology* 1982;17:115-121.
 24. Weiblen R, Kreutz L, Canaborro TF, Schuch LC, Rebelatto MC. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. *J Vet Diagn Invest* 1992;4:341-343.
 25. Smits CB, Van Maanen C, Glas RD, De Gee ALW, Dijkstrab T, Van Oirschot JT, et al. Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *J Virol Methods* 2000;85: 65-73.
 26. Guerin C, Harlay T, Guerin B, Thibier M. Distribution of BHV1 in fractions of semen from a naturally infected bull. *Theriogenology* 1993;40:997-1002.
 27. Jeurissen SHM, Claassen E, Boonstra-Blom AG, Vervelde L, Janse EM. Immunocytochemical techniques to investigate the pathogenesis of infec-

- tious micro-organisms and the concurrent immune response of the host. *Develop Comp Immunol* 2000;24:141-151.
28. Kramps JA, Magdalena J, Quak J, Weerdmeester K, Kaashoek MJ, Maris-Veldhuis MA, *et al.* A simple specific and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus-1. *J Clin Microbiol* 1994;32:2175-2181.
29. Lemaire M, Pastoret P, Thiry E. Le controle de l'infection par le virus de la rhinotracheitis infectieuse bovine . *Ann Méd Vét* 1994;138:167-180.

