

# EVALUACIÓN DE UN ELISA PARA ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS DE RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA A TRAVÉS DE MUESTRAS DE LECHE DE CÁNTARAS

## Evaluation of an ELISA for Epidemiological Studies of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus by Using Bulk Churn Milk Samples

César Obando<sup>1</sup> y Zobeida Amaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Virología, Instituto de Investigaciones Veterinarias, CENIAP-INIA. Maracay, estado Aragua, Venezuela. Apdo 070. E-mail: cobando@inia.gov.ve <sup>2</sup>Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Complejo Docente El Hatillo. Coro, estado Falcón.

### RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio en cuatro fincas lecheras, a objeto de evaluar la utilidad de un kit de ELISA comercial para estimar la prevalencia de anticuerpos contra el virus herpes bovino tipo 1 (VHB-1), mediante el análisis de muestras de leche de cántaras. Para ello se realizó un muestreo simultáneo de suero y leche en 80 vacas, durante un proceso de ordeño. Además, los productos del ordeño se acopiaron en siete cántaras, se registraron las vacas asignadas a cada cántara y se recolectó una muestra de leche de cada una de ellas. Las muestras de suero, leche individual y leche de cántara se omcesamn para la detección de anticuerpos contra el VHB-1 mediante el kit, siguiendo las recomendaciones del fabricante, quedando el Punto de Corte para leche en 0,07. No se detectaron anticuerpos en ninguna de las 35 muestras de leche recolectadas de vacas que resultaron sin anticuerpos en suero. En relación a las vacas que resultaron seropositivas se observó un incremento en los títulos de anticuerpos en leche, a medida que se incrementaron los mismos en suero, lo cual fue indicativo de una tendencia hacia una relación lineal entre los valores de ambas variables, aunque no hubo correlación ( $r = 0,4324$ ;  $P = 0,0348$ ). Los títulos de anticuerpos de las muestras de leche de las cántaras mostraron una moderada asociación con las proporciones de vacas seropositivas cuyas leches se acopiaron en ellas, lo que sugiere que es factible utilizar el kit de ELISA para estudios epidemiológicos de rinotraqueitis infecciosa bovina, a través de muestras de leche de cántaras o tanque.

Palabras clave: ELISA, leche, detección de anticuerpos, VHB-1.

### ABSTRACT

A study was carried out in four dairy farms in order to assess how useful was an ELISA kit to predict the antibody prevalence to bovine herpes virus type 1 (BHV-1) by testing bulk churn milk. Sera and milk samples were taken from 80 cows at the same milking time. The milk was emptied into seven milk churn, the cows assigned to each churn were registered and a sample of milk churn was collected from each one. Sera, milk samples and bulk churn milk were tested by using the ELISA kit according with manufacturer's instructions except the cut-off value for milk, which was established at 0.07. All seronegative cows (35) were also skim milk negative. Regarding antibody titres to BHV-1 in milk and sera of seropositive cows there was an apparent linear relation between the values of two variables, even though there was not correlation ( $r = 0,4324$ ;  $P = 0.0348$ ). The level of antibodies in bulk churn milk showed a mild association to the proportion of seropositive cows whose milk were emptied into these containers. This result indicate that the ELISA kit might be used to predict the within-herd prevalence of BHV-1 by testing bulk churn milk or bulk tank milk.

**Key words:** ELISA, milk, antibody detection, BHV-1

### INTRODUCCIÓN

El virus herpes bovino tipo-1 (VHB-1), responsable de la rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB), es uno de los agentes virales que contribuyen con la etiología del Complejo Respiratorio Reproductivo de los Bovinos [9, 14]. Complejo que es considerado como una de las causas de pérdidas económicas significativas en las explotaciones bovinas [3, 10]. El VHB-1, se encuentra difundido ampliamente en todos los continentes [11], lo cual ha sido facilitado por su habilidad de mantenerse en forma latente en bovinos después de la infección inicial, re-excretarse e infectar animales susceptibles [1,

4, 6, 7, 14]. Así como, por su capacidad de transmitirse a través de la inseminación artificial, monta natural y transferencia de embriones [2, 15]. Las vacunas contra la RIB, disponibles en la actualidad, a pesar de que pueden reducir los signos clínicos y la excreción viral, no protegen totalmente contra las infecciones por cepas de campo, por lo cual la condición de latencia se mantiene en los rebaños infectados, aún bajo programas de vacunación. El incremento de las exigencias sanitarias para ingresar al comercio internacional de bovinos y sus productos, ha estimulado a los países a ir en búsqueda de rebaños libres de RIB, para lo cual existen programas de erradicación en ejecución, particularmente en Europa. Para ello, es necesario realizar pruebas serológicas a un gran número de animales, lo que podría simplificarse de estar disponible un ELISA que permitiera detectar la presencia de anticuerpos contra el VHB-1, en muestras de leche de cántara o tanque e inferir la probable prevalencia de vacas seropositivas, en base al título de la misma, tal como ocurre con el virus de la Diarrea Viral Bovina [12, 13]. El propósito de este estudio fue determinar si un ELISA comercial diseñado para detectar anticuerpos contra el VHB-1, en muestras de suero y leche, puede ser usado con muestras de leche de cántaras para este fin.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con el propósito del trabajo se realizaron tres ensayos:

**Ensayo 1.** Determinación del punto de corte para la detección de anticuerpos contra el VHB-1 en muestras de leche. Lo que se consideró necesario por no existir en el país, para leche, ninguna experiencia previa con este kit.

El procedimiento se fundamentó en que vacas seronegativas al VHB-1 no tienen anticuerpos contra este virus en sus muestras de leche, por lo que los valores corregidos de densidad óptica (vDO) resultantes de las leches de dichos animales, se utilizaron como controles negativos de referencia. En forma contraria, las muestras de leche de vacas seropositivas debían tener, en mayor o menor grado, anticuerpos contra el virus.

### Selección de animales y recolección de muestras

Para ello se escogieron cuatro fincas (A, B, C y D), de bovinos nativos de doble propósito, mestizos Holstein, Pardo Suizo y Cebú, nunca vacunados contra el VHB-1, las cuales están ubicadas en los municipios Colina y Miranda de la Región Centro Norte del estado Falcón, caracterizada como bosque seco tropical, de clima húmedo, con precipitación promedio anual de 500 a 1000 mm, evaporación de 2931 m<sup>3</sup>; temperatura media de 27,3°C y humedad relativa de 80%.

Se seleccionaron 80 vacas al azar, 20 por cada finca, todas ellas bien identificadas y se realizó un muestreo simultáneo de leche y suero en cada una de ellas, al momento del ordeño.

Diez mililitros (10 ml) de leche de cada vaca se recolectaron del cuarto posterior izquierdo de las ubres, en tubos de ensayo estériles contentivos de 1,5 a 2,0 mg de bronopol 98%

(2-bromo-2-nitro-propane-1,3-diol). Todas las muestras, previa identificación, se conservaron refrigeradas con hielo hasta su traslado al laboratorio.

Inmediatamente terminado el ordeño de cada una de las vacas incluidas en el estudio, se les extrajo de 8 a 10 ml de sangre, por punción de la vena yugular. La sangre se recolectó en tubos Vacutainer, se dejaron en reposo en una gradilla con una inclinación de 45°, bajo la sombra, a temperatura ambiente, por un período de dos a cuatro horas hasta la retracción del coágulo. Las mismas se conservaron al igual que las de leche para su traslado al laboratorio.

Tanto las muestras de leche como las de suero, recolectadas para este ensayo, se utilizaron también para la ejecución de los ensayos 2 y 3.

### Detección de anticuerpos en muestras de suero y leche por ELISA

**Preparación de las muestras:** Las muestras de leche se centrifugaron a 1500 g, a 5°C durante 20 minutos, en una centrífuga modelo IEC INTERNATIONAL, con el fin de sedimentar los detritos celulares y separar la capa de grasa sobrenadante. Se absorbió la leche desgrasada por debajo de la capa de grasa y se conservó en viales (cryoware)® a 4°C, hasta su análisis.

Las muestras de sangre se centrifugaron de igual forma que las de leche para separar el coágulo y extraer los sueros respectivos, los cuales se conservaron a -20°C.

**Detección de anticuerpos:** Para la detección de anticuerpos contra el VHB-1, en muestras de leche y suero, se utilizó el kit de ELISA comercial SVANOVIRB, desarrollado por SVANOVA Biotech, Uppsala, Sweden, siguiendo las especificaciones del fabricante.

En resumen, volúmenes de 100 µl de las muestras de leche sin diluir y de suero diluidas 1/25, se agregaron por duplicado en pocillos pre-adsorbidos con antígeno de VHB-1 (columnas impares) y en los pocillos correspondientes a los controles de antígeno (columnas pares), en placas de microtécnica de 96 pozos. Las placas se incubaron a 37°C por una hora y se lavaron tres veces con buffer de lavado. Seguidamente, se agregó 100 µl de conjugado por pozo, se incubaron y lavaron tal como se describió anteriormente y se adicionó 100 µl de solución sustrato (Tetrametilbenzidina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Transcurridos 10 minutos, se detuvo la reacción adicionando 50 µl de solución de frenado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La lectura se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro EI x 800 (Biotek Instruments, Inc). Leches y sueros de referencia, positivos y negativos, se corrieron por duplicado.

**Interpretación de los resultados:** Los valores de densidad óptica (vDO) de las muestras de leche, suero y controles se corrigieron mediante la sustracción de los vDO de los pozos recubiertos con suspensiones semipurificadas de cultivos celulares no infectados con el VHB-1 (Control de Antígeno) de e de los corres-

pondientes pozos recubiertos con suspensiones semipurificadas de cultivos celulares infectados con VHB-1 (Antígeno).

Las muestras de suero se consideraron positivas cuando sus valores corregidos de densidad óptica (vcDO) resultaron 2.5 veces mayor que el valor promedio corregido del control negativo. Las muestras de suero con vcDO menores de 0,2 se consideraron negativas.

Para que la prueba se considerara válida, el suero de referencia positivo debió tener un vcDO mayor de 0,5 y el suero de referencia negativo un vcDO menor de 0,2.

A las muestras de suero con vcDO cercanos a 0,2 se les calculó el porcentaje de positividad (SIP), mediante la fórmula:

$$S/P = \frac{\text{vcDO muestra}}{\text{vcDO control positivo de la misma placa}} \times 100$$

Cálculo del Punto de Corte para leche

A fin de establecer el punto de corte para las muestras de leche, se identificaron las vacas que resultaron negativas a la detección de anticuerpos en suero, es decir con vcDO inferiores a 0,2 (Punto de corte) y se seleccionaron únicamente los vcDO de las muestras de leche correspondientes a las vacas que resultaron francamente negativas. Para ello se excluyeron los vcDO de las muestras de leche de animales con vcDO, en suero, cercanos a 0,2 (dudosas). De igual forma, se excluyeron los vcDO eximios y con signo negativo de las muestras de leche de animales negativos serológicamente. Se calculó la media ( $\bar{X}$ ), la desviación estándar (S) y se tomaron en consideración el Punto de Corte recomendado por el fabricante, el vcDO más alto de las muestras de leche de vacas seronegativas y el vcDO más bajo de las muestras de leche de vacas seropositivas.

Ensayo 2. Comparación de títulos de anticuerpos en suero y leche.

A objeto de alcanzar este propósito se determinó la presencia de anticuerpos contra el VHB-1 en las muestras de suero y leche de las 80 vacas que se incluyeron en el estudio. Se hicieron diluciones 1/125, 1/1100, 1/1400 y 1/11600, de 25 de las 40 muestras de sueros que resultaron francamente positivas y diluciones de 1/1, 1/110, 1/150 y 1/250, de las muestras de leche de las mismas vacas. Todas ellas se procesaron, de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente, y los resultados se compararon relacionando la presencia y título de anticuerpos en suero y leche de cada animal. Los resultados se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Ensayo 3. Estimación de proporción de vacas seropositivas a rinotraqueitis infecciosa bovina, mediante la detección de anticuerpos en muestras de leche de cántaras.

Para este ensayo, las 80 vacas lactantes seleccionadas, 20 por cada finca, se distribuyeron de la siguiente manera: En la finca A, se establecieron dos lotes, L1 y L2, de 10 animales cada uno. En las fincas B y C, las 20 vacas se agruparon en

un solo lote, L3 y L4, respectivamente, y en la finca D. los animales se organizaron en tres lotes, L5, L6 y L7, con 12, 2 y 6 animales, respectivamente. La leche de cada lote se recolectó en cántaras previamente identificadas, al igual que se registraron las vacas asignadas a cada una de ellas. La selección de los animales por lote fue al azar y el número de lotes quedó establecido en base a las características y facilidades para el ordeño en cada una de las fincas.

En cada Lote (cántara) se determinó el número de vacas con anticuerpos contra el VHB-1 que fueron asignadas al mismo y el título de anticuerpos en leche para cada una de ellas. De igual forma, se realizó la detección de anticuerpos contra este virus en muestras representativas del pool de leche en cada cántara.

Los vcDO de cada pool de leche (cántara), se compararon entre sí, tomando en consideración las otras dos variables.

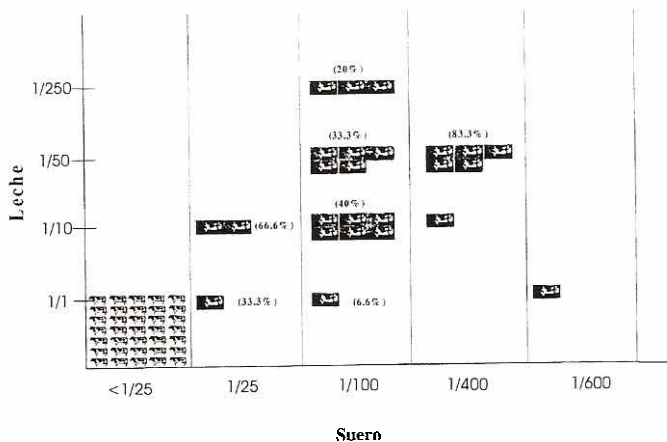
## RESULTADOS

Ensayo 1. De las 80 muestras de suero una se perdió en forma accidental, por lo cual el trabajo se limitó a 79 muestras. De ellas, 39 resultaron con vcDO inferiores a 0,2 (punto de corte para suero), indicativo de la ausencia de anticuerpos contra el VHB-1, en esas vacas.

Para los efectos del cálculo del Punto de Corte para leche, se utilizaron 17 vcDO, correspondientes a las muestras de leche obtenidas de las vacas cuyos sueros resultaron francamente negativos. Es decir, no se incluyeron: una por efecto de background, dos por resultar con vcDO cercanos a 0,2 (dudosos), ocho que resultaron con vcDO de signo negativo y nueve con valores extremos. Los sueros de las vacas seronegativas, cuyos vcDO resultaron dudosos, se analizaron por porcentaje de positividad (SIP), obteniéndose resultados por encima de 25%, sugestivo de muestras débilmente positivas.

El promedio de los vcDO de los controles negativos de leche, del kit, utilizados en las diferentes placas fue  $\bar{X} = 0,025666$ , el doble de este valor, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, determinaría el límite por encima del cual los valores corregidos de las muestras de leche se consideran positivas. En consecuencia,  $2 \times \bar{X}$  (controles del kit) = 0,05, lo que sería el Punto de Corte (PC), tomándose este valor en consideración para los efectos de determinar el valor definitivo.

De esta forma, el PC quedó establecido en 0,07 ( $\bar{X} A_{450} = 0,0262941 + 3 S$  de 17 muestras de leche libres de anticuerpos contra el VHB-1), por ser éste el valor que permitió categorizar el vcDO más alto, de las muestras de leche de vacas seronegativas (0,059), como negativa y el vcDO más bajo, de las muestras de leche de las vacas débilmente positivas (0,075), como positiva.



**FIGURA 1. COMPARACIÓN DE TÍTULOS DE ANTICUERPOS CONTRA IBR EN MUESTRAS DE SUERO Y LECHE DE 60 VACAS**

**Ensayo 2.** En la FIG. 1 se observa que de treinta cinco (35) vacas que resultaron negativas en sus muestras de suero, ninguna de ellas mostró anticuerpos en sus respectivas muestras de leche.

Por el contrario, aunque no se muestra en el gráfico, de las 40 vacas que resultaron con anticuerpos en suero, con rangos de vcDO desde 0,243 hasta 0,988, todas resultaron con anticuerpos en leche.

La comparación entre las concentraciones de anticuerpos contra el VHB-1 en suero y leche, realizada en 25 de las 40 las vacas que resultaron francamente positivas, mostró una aparente relación lineal entre ambas variables, a excepción de un animal que tituló 111600 en suero y 1/1 en su correspondiente muestra de leche.

De las vacas cuyos sueros titularon 1125 el 100% de sus respectivas muestras de leche mostraron títulos de anticuerpos  $\leq 1110$ . De las vacas cuyas muestras de suero resultaron con títulos de 11100 el 40% de sus respectivas muestras de leche titularon 1110 y el 53,3% mostraron títulos  $> 1/50$ , y en el caso de las vacas que titularon 1/400 en suero el 83,3% de sus respectivas muestras de leche resultaron con títulos de 1150.

El análisis mediante el coeficiente de correlación de Pearson, sin considerar los valores del animal que resultaron muy distantes de los de las otras 24 vacas, no mostró correlación positiva entre las dos variables ( $r = 0,4324$ ;  $P = 0,0348$ ).

**Ensayo 3.** Tal como se observa en la TABLA I, en forma general, hay una tendencia al aumento de los vcDO de las muestras de leche de las cántaras a medida que se incrementa la proporción de vacas seropositivas, cuyos productos de ordeño se acopiaron en las mismas. Sin embargo, en la cántara N° 4, el vcDO del pool respectivo resultó menor que el de las cántaras 2 y 3, donde se acopló la leche de una menor proporción de vacas seropositivas.

El vcDO de la leche de la cántara 3, con un 45% de ordeños de vacas seropositivas, resultó ligeramente mayor que el de la cántara 5, en la cual el 91% de las vacas asignadas eran seropositivas.

## DISCUSIÓN

Cuando se determinó el punto de corte para la detección de anticuerpos (AC) contra el VHB - 1 en muestras de leche, el resultado del doble producto del valor promedio de los controles negativos del kit (SVANOVIR™), coincidió con el Punto de Corte (PC) recomendado por el fabricante (0,05). En forma similar, cuando se determinó el PC mediante el análisis de los vcDO de muestras de leche de animales francamente negativos, se observó que la  $\bar{X} + 2 S$  resultó ser 0,05, coincidente con el valor del kit sugerido por el fabricante. Sin embargo, al tomar en consideración el vcDO más bajo obtenido en las muestras de leche de vacas francamente seropositivas (vcDO = 0,075), así como el valor más alto de las muestras de leche de las vacas francamente negativas (vcDO = 0,059). se vio la necesidad de determinar un PC diferente, que permitiera establecer el verdadero límite entre las muestras débilmente positivas y negativas. La  $\bar{X} + 3 S$ , resultó en el punto de corte ideal (PC = 0,07). Resultado que confirma la necesidad de validar los kit de ELISA comerciales, en países distintos a los de origen.

De haberse aplicado un PC = 0,05, dos muestras de leche de vacas francamente negativas. hubiesen sido interpretadas como positivas a anticuerpos contra el VHB-1, en razón a sus vcDO (0,056 y 0,059). En consecuencia, se consideró apropiado utilizar tres S en lugar de dos.

La razón de utilizar sólo las muestras de leche de animales francamente negativos obedeció a la detección de dos vacas seronegativas, cuyos sueros resultaron con vcDO cercanos al PC (0,2), que analizados por proporción de seropositividad (S/P), mostraron resultados por encima del 20%, sugiriendo la presencia de bajos niveles de anticuerpos contra el VHB-1. Esto pudo ser consecuencia de reacciones inespecíficas en las muestras de suero, lo cual es un problema común en pruebas de ELISA [5], a pesar de que el kit utilizado tiene una sensibilidad y especificidad alrededor de 92% y 94% respectivamente.

Van Wuijckhise y col [16], establecieron con 818 muestras de leche de tanques de rebaños seronegativos a IBR el PC, para un ELISA de bloqueo, como el promedio del porcentaje de bloqueo más tres veces la desviación estándar. En un trabajo similar, para detectar anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en muestras de leche, el valor promedio de 55 muestras de vacas libres de anticuerpos en suero más tres veces la desviación fue considerado el límite de separación entre muestras positivas y negativas [12].

Un aspecto a considerar es que la sensibilidad y especificidad de un ELISA para la detección de anticuerpos contra el VHB-1 en muestras individuales de leche, disminuye cuando se aplica en muestras de tanque [16]. Hartman y col [8], señalan

TABLA /  
**RELACIÓN ENTRE LA SEROPOSITIVIDAD DE VACAS LACTANTES Y EL  $v_{cDO}$  DEL POOL DE LECHE DE CÁNTARAS RESULTANTE DEL ACOPIO DE LOS PRODUCTOS DEL ORDENO DE ESAS VACAS**

N° de cántara	N° de vacas por cántara	Condición serológica de las vacas		$v_{cDO}$ por cántara
		Negativas	Positivas	
1	10	7	3 (30%)	0,086
2	20	13	7 (35%)	0,397
3	20	11	9 (45%)	0,903
4	10	4	6 (60%)	0,226
5	11	1	10 (91%)	0,8
6	2	0	2 (100%)	1,0
7	6	0	6 (100%)	1,0
Total	79	36	43 (54%)	-

$v_{cDO}$ : valor corregido de densidad óptica del pool de leche.

lan que hasta un 20% de animales seropositivos, incluyendo animales jóvenes, pudieran estar presentes en un rebaño donde el resultado de la muestra de leche de tanque resulte negativa. No obstante, un estudio comparativo de dos kits de ELISA para evaluar la prevalencia de DVB en rebaños, a través de muestras de tanque de leche, mostraron una muy buena concordancia (88%), particularmente para la clase que indica rebaños con alrededor de 2,5% de animales seropositivos [13].

En relación a la comparación entre los títulos de AC contra el VHB-1 en las muestras de suero y leche, que se recolectaron simultáneamente, la FIG 1 mostró una tendencia hacia una relación lineal entre dichas variables, obteniéndose un coeficiente de correlación cercano al valor mínimo indicativo de correlación positiva ( $r = 0,0424$ ;  $P = 0348$ ). Esta tendencia era de esperarse si tomamos en consideración que el kit de ELISA utilizado está diseñado para detectar inmunoglobulina G (IgG) en suero y en leche, que la IgG es el isotipo de inmunoglobulina (Ig) predominante en la leche y que la concentración de Ig en leche depende en gran medida de su concentración en la sangre. Los títulos de AC fueron más bajos en leche que en suero, lo cual es debido a que la cantidad de Ig es más baja en leche que en sangre [12].

Un animal en el doceavo día de lactancia, según información del ordeñador, mostró un título de AC de 1/1600 en suero y, contrariamente a lo esperado, tituló 1/1 en su correspondiente muestra de leche, lo cual es difícil de explicar, al menos que dicho animal se encontrara en realidad en el pico de lactancia, información que no fue verificada en el momento del muestreo. Niskanen [12] reportó que la concentración de AC contra el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en leche, es inversamente proporcional al volumen de leche secretada durante la lactancia, aunque los niveles se mantienen suficientes para determinar la condición de positividad en la vaca durante la duración de la misma. Esta situación podría ser similar para el caso de los anticuerpos contra el VHB-1.

La evaluación de la potencialidad del kit de ELISA para ser utilizado en muestras de leche de cántaras, a Objeto de estimar la proporción de animales seropositivos en los rebaños, mostró una aparente tendencia al incremento en el  $v_{cDO}$  de las muestras de leche de las cántaras a medida que aumentan las proporciones de ordeños de vacas seropositivas en ellas, tal como ocurre con kits de ELISA validados para detección de AC contra el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), mediante el análisis de muestras de leche de cántara o tanque, que han permitido estimar la prevalencia de esta enfermedad [13]. A pesar de que el número de vacas por cántara fue reducido, este resultado es indicativo de que el número de vacas seropositivas es una variable determinante en la lectura final del pool de leche de las cántaras. Sin embargo, el  $v_{cDO}$  del pool de leche de la cántara 4, con un 60% de ordeños de vacas seropositivas, resultó menor que el de las cántaras 2 y 3, con porcentajes de ordeños de vacas seropositivas de 35% y 45%, respectivamente. Similarmente, el  $v_{cDO}$  de la cantar 3 resultó ligeramente mayor que el de la cantar 5 (0,9 y 0,8 respectivamente), a pesar de que en la cantar 5 se acopiaron los ordeños de una mayor proporción de vacas seropositivas. Estos hallazgos indican que otras variables, además de las proporciones de ordeños de vacas seropositivas en la cántaras, deben jugar un papel en el  $v_{cDO}$  de las muestras de leche de las cántaras, tales como: la concentración de anticuerpos en las leches y el volumen de ellas que es acopiado en las cántaras, sabiendo que la cantidad total de AC en la leche depende de la concentración de ellos y del volumen de leche.

El análisis de los títulos de anticuerpos en cuatro de las seis muestras de leche positivas de los ordeños de la cántara 4, mostró que tenían títulos  $\leq 1/10$ , mientras que en las cántaras 2 y 3 se detectaron muestras de leche con títulos de 1/50, lo que pudiera explicar, en algún grado, el menor  $v_{cDO}$  en dicha cántara, en comparación con las cántaras 2 y 3. Razonamiento que pudiera explicar, de igual forma, el resultado ligeramente mayor del  $v_{cDO}$  de la cántara 3, en comparación con la cántara 5.

## CONCLUSIONES

Aunque el kit de ELISA utilizado para la detección de anticuerpos contra el VHB-1 señala un Punto de Corte para muestras de leche igual a 0,05, el estudio determinó que el Punto de Corte apropiado para las condiciones en que se realizó el trabajo es igual a 0,07.

A pesar de que no hubo correlación positiva, el ELISA mostró una tendencia de relación lineal entre las concentraciones de anticuerpos contra el VHB-1 en las muestras de suero y leche de un mismo animal, cuando son recolectadas simultáneamente.

Los títulos de anticuerpos contra el VHB-1 en las muestras de leche de las cántaras mostraron una moderada asociación con las proporciones de vacas seropositivas cuyos productos de ordeño se acopiaron en ellas, indicando que el kit de ELISA pudiera ser validado para estimar la prevalencia de anticuerpos contra el VHB-1, en rebaños lecheros o de doble propósito, mediante el análisis de muestras de leche de cántaras o de tanque.

## RECOMENDACIONES

Realizar un trabajo similar a mayor escala, enfocado a validar el kit de ELISA estudiado como herramienta para conocer la prevalencia serológica de anticuerpos contra el VHB-1 en rebaños lecheros, mediante el establecimiento de intervalos de clases de acuerdo a los vcDO, equivalentes a proporciones de animales seropositivos por cada clase, tal como fue establecido en ELISAs para detección de AC contra el VDVB elaborados por SVANOVA, Biotech, Sweden y el Central Veterinary Laboratory, England.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ACKERMANN, M.; WYJLER, R. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. **Vet. Microbiol.** 9: 53-63. 1984.
- [2] ACKERMANN, M.; BELÁK, S.; BITSH, V.; EDWARDS, S.; MOUSSA, A.; ROCKBORN, G.; THIRTY, E. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. **Vet. Microbiol.** 23: 361-363. 1990.
- [3] BAKER, J. C.; HOUE, H. Bovine viral diarrhoeavirus. The veterinary clinics of North America: Food Animal **Practice.** Vol 11, (3). 447-469. 1995.
- [4] BITSH, V. On the latency of infectious bovine rhinotracheitis virus infection and its significance, especially with regard to controlling infection. In: Whittmann, G.; Gasker, R. M.; Rziha, H.J (Editors), Latent Herpes Infections in Veterinary Medicine. Martinus Nijhoff. The Hague. 163-170 p. 1984.
- [5] CHU, H.; ZEE, Y. C.; ARDANS, A. A.; DAL, K. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bovine sera. **Vet. Microbiol.** 10: 325-333. 1985.
- [6] DE WIT, J. J.; HAGE, J. J.; BRINKHOF, J.; WESTENBRINK, F. A comparative study of serological test for use in the bovine herpesvirus 1 eradication programme in the Netherlands. **Vet. Microbiol.** 61: 153-163. 1998.
- [7] HAGE, J. J.; SCHUKKEN, Y. H.; BARKEMA, H. W.; BENEDICTUS, G.; RIJSEWIJK, F. A. M.; WENTINK, G. H. Population dynamics of bovine herpesvirus 1 infection in a dairy herd. **Vet. Microbiol.** 53: 169-180. 1996.
- [8] HARTMAN, A.; VAN WUIJCKHUISE, L.; FRANKENA, K.; FRANKEN, P.; WEVER, P.; DE WIT, J.; KRAMP, J. Within-herd BHV-1 prevalence prediction from an ELISA on bulk tank milk. **Vet. Rec.** 140: 484-485. 1997.
- [9] IRWIN, M. R.; McCONNELL, S.; COLEMAN, J. D.; WILCOX, G. E. Bovine Respiratory Disease Complex: A comparison of potential predisposing and etiology factors in Australia. **J. A. V. M. A.** 175 (10): 1096-1098. 1979.
- [10] KENNEDY, G. A. Diagnostic considerations for bovine respiratory disease. *The Bovine Proceeding.* 29: 142-146. 1996.
- [11] LUDWIG, H.; GREGERSEN, J. P. Infectious bovine rhinotracheitis / infectious pustular vulvovaginitis: BHV-1 infections. **Rev. Sci. Tech. Off. Epiz.** 5: 869-878. 1986.
- [12] NISKANEN, R.; ALENIOUS, S.; LARSSON, B.; JUNTTI, N. Evaluation of an Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies to Bovine Virus Diarrhoea Virus in Milk. **J. Vet. Med.** B 36: 113-118. 1989.
- [13] PATON, D. J.; CHRISTIANSEN, K. H.; ALENIOUS, S.; CRANWELL, M. P.; PRITCHARD, G. C.; DREW, T. W. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. **Vet. Rec.** 11: 385-391. 1998.
- [14] RICHER, L.; MAROIS, P.; LAMONTAGNE, L. Association of bovine viral diarrhoea virus with multiple viral infections in bovine respiratory disease outbreaks. *Can. Vet. J.* 29: 713-717. 1988.
- [15] VAN OIRSHOT, J. J.; STRAVER, P. J.; VAN LIESHOUT, J. A. H.; QUAK, J.; WESTENBRINK, F.; VAN EXSEL, A. C. A. A subclinical infection of bull with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. **Vet. Rec.** 132: 32-35. 1993.
- [16] VAN WUIJCKHUISE, L.; BOSCH, J.; FRANKEN, P.; FRANKENA, K.; ELBERS, A. R. W. Epidemiological characteristics of bovine herpesvirus 1 infections determined by bulk milk testing of all Dutch Dairy herds. **Vet. Rec.** 142: 181-184. 1998.