

# EFECTO DEL PERÍODO DE INCUBACIÓN VIRUS/SUERO (1 Y 24 HORAS) SOBRE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE SERONEUTRALIZACIÓN PARA RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA

**Effect of Virus/Serum Incubation Period (1 and 24 Hours) on the Sensitivity and Specificity of the Serum Neutralization Test for Infectious Bovine Rhinotracheitis**

*Josefa Rodríguez, César Obando, Rolando Durán, Mayra Hidalgo y Alix Montoya*

*Laboratorio de Virología, IIV/CENIAP/INIA. Apartado 70. Maracay, estado Aragua, Venezuela.*

*E-mail: jrodriguez@inia.gov.ve*

## RESUMEN

En base a reportes que señalan una baja sensibilidad de la prueba de seroneutralización (SN), con 1 hora de incubación, para Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB), se realizó un ensayo para comparar el desempeño de la SN, para la detección de anticuerpos contra dicho virus, con dos períodos de incubación virus/suero (1 y 24 horas), usando como referencia un kit de ELISA. La concordancia de ambas pruebas de SN (1 y 24 horas) con el ELISA fue de 82% ( $\kappa=0,77$ ) y 98,5% ( $\kappa=0,98$ ), respectivamente. La sensibilidad y especificidad fueron de 66,7 y 100%, respectivamente, en 1 hora, en comparación con 100 y 96,6% en 24 horas. La seropositividad de 65 sueros bovinos probados por SN, en ambos períodos, se comparó entre sí, para lo cual los títulos seroneutralizantes se agruparon en 6 clases. El porcentaje de seropositivos fue menor con 1 hora que con 24 horas, 37 y 57%, respectivamente ( $0,05 > P > 0,02$ ). El 96% de los sueros procesados con 1 hora quedaron agrupados en las clases 1 y 2, mientras que con 24 horas de incubación el 57% de ellos se ubicaron en la clase 6, correspondiendo ésta a la de mayores niveles de anticuerpos. Estos resultados indican que la prueba de SN, para la detección de anticuerpos contra RIB, es más confiable cuando se utiliza un período de incubación de 24 horas.

**Palabras clave:** Rinotraqueitis infecciosa bovina, anticuerpos, seroneutralización, tiempo de incubación.

## ABSTRACT

Low sensitivity of the standard 1 hour incubation serum neutralization (SN) test for antibodies in infectious bovine

rhinotracheitis (IBR) has been reported. Thus, an experiment was carried out to compare two virus / serum incubation periods SN tests (1 and 24 hours) by using an ELISA kit as a reference test. Agreement between 1 hour SN test and ELISA was 82% ( $\kappa=0.77$ ), while it was 98.5% ( $\kappa=0.98$ ) when using 24 hour incubation periods. The sensitivity and specificity in one hour were 66.7 and 100%, respectively, while they were 100 and 96% in 24 hours. Seropositivity of 65 bovine sera tested by SN in both periods were compared to each other. Thus, the antibody titres were grouped into six classes. Percentage of seropositive sera in 1 hour SN test was smaller than it was in 24 hours, 37 and 57%, respectively ( $0.05 > P > 0.02$ ). Regarding one hour SN titres of antibodies to IBR 96% of positive sera fell into classes 1 and 2, while 57% fell into class 6 when using 24 hours incubation. The latter corresponding to the highest level of antibodies. These results indicate that the 24 hours incubation SN test is more accurate than 1 hour incubation SN test for antibodies to IBR.

**Key words:** Infections bovine rhinotracheitis, antibodies, seroneutralization, incubation time.

## INTRODUCCIÓN

El diagnóstico serológico constituye una herramienta fundamental en la ejecución de programas de prevención, control y/o erradicación, para la identificación de animales que han tenido contacto con el virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB). Para ello es necesario contar con pruebas de alta sensibilidad y especificidad, particularmente debido a la gran homología entre el genoma del herpesvirus bovino tipo 1 con el de otros herpesvirus del bovino y de animales domésticos y

silvestres [1], en razón a que la homología de los genomas está relacionada con sus variaciones antigénicas.

La detección de anticuerpos contra la RIB se realiza, en la mayoría de los laboratorios, mediante las pruebas de seroneutralización (SN) y ELISA. En la actualidad, a pesar de los avances de la biotecnología, la SN para la RIB y otros virus sigue siendo la prueba de referencia internacional [13] y de comparación cuando se desea conocer la sensibilidad y especificidad de otras pruebas serológicas, tal como lo evidencia el trabajo realizado por Bizanov [3]. Esta prueba fue estandarizada con tiempo de incubación virus/suero de 1 hora, patrón que es seguido en varios laboratorios de diagnóstico. Sin embargo, existen reportes que señalan que ese tiempo es insuficiente, ocasionando detección de falsos negativos, indicativo de una baja sensibilidad [2, 6]. Este hecho ha llevado a evaluar la prueba de SN con mayores períodos de incubación, tomando en consideración que uno de los factores que influyen sobre la detección de anticuerpos contra el herpesvirus bovino -1, responsable de la RIB, es el tiempo de incubación virus/suero, antes de la adición de las células [8].

En consecuencia, el objetivo del ensayo fue evaluar el desempeño de la prueba de SN con 1 hora y 24 horas de incubación virus/suero, utilizando como prueba de referencia un kit de ELISA comercial, validado en Venezuela y con una sensibilidad y especificidad mayor del 95%.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la ejecución del presente trabajo se seleccionaron al azar 65 muestras de sueros bovinos del banco de sueros del laboratorio de Virología del Instituto de Investigaciones Veterinarias - CENIAP - INIA. Los sueros fueron inactivados y procesados, por duplicado, mediante la prueba de SN, utilizando dos períodos de incubación virus/suero (1 y 24 horas), siguiendo la metodología descrita por Rockborn y col. [10]. En resumen, se mezclaron 0,05 ml de diluciones de los sueros, desde 1:2 hasta 1:128, con 0,05 ml de antígeno viral de RIB (100 DICC-50%) en placas de microtécnica Falcón 3040, las cuales se incubaron a 37°C por 1 ó 24 horas, según la prueba. Posteriormente, se adicionaron 0,05 ml de suspensión de célu-

las MDBK por pozo (500.000 cel./ml), se sellaron las placas y se incubaron a 37°C. Simultáneamente, se corrieron sueros controles positivos y negativos y se incorporaron en las pruebas los controles de suero, células y antígeno, además de realizar una titulación simultánea para corroborar las dosis de antígeno utilizadas en las mismas. La lectura se realizó después de 72 horas de incubación, mediante la visualización de efecto citopático en microscopio de luz invertido.

La determinación de los títulos serológicos se realizó mediante el método de Sperman Kärber descrito por Finney [7].

Los resultados de las pruebas de SN, con 1 y 24 horas de incubación, se compararon con los obtenidos en la prueba de ELISA, utilizando el kit comercial "SVANOVIR ®" de SVANOVA biotech y siguiendo las especificaciones del fabricante, la cual se consideró como patrón de referencia por su alta sensibilidad y especificidad.

Para la comparación se determinó el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por SN, en cada tiempo de incubación, con los de la prueba de ELISA, utilizando para el análisis la prueba de Kappa.

Adicionalmente, los resultados de la prueba de SN, con 1 y 24 horas de incubación, se compararon entre sí. Para ello, los sueros positivos en ambos períodos, y de acuerdo al título serológico, se agruparon en seis clases, de la siguiente manera: clase 1 (1:2 a 1:23), clase 2 (1:24 a 1:45), clase 3 (1:46 a 1:67), clase 4 (1:68 a 1:89), clase 5 (1:90 a 1:111) y clase 6 (1:112 a 1: 133). Estos resultados se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La comparación entre la prueba de SN con 1 hora de incubación virus/suero y la prueba de referencia (ELISA) se muestra en la TABLA I. En la misma se observa que la prueba de SN tuvo un 82% de concordancia con la prueba de ELISA y el valor de kappa fue de 0,77, indicativo de una concordancia aceptable. La sensibilidad relativa fue de 66,7%, muy por debajo de los requerimientos para una prueba de confiabilidad, ya que su utilización se traduciría en un alto porcentaje de fal-

TABLA I  
**CONCORDANCIA ENTRE LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS POR SERONEUTRALIZACIÓN  
CON 1 HORA DE INCUBACIÓN Y ELISA**

Seroneutralización	ELISA		Total	% Concordancia
	Positivos	Negativos		
Positivos	24	0	24	82 %
Negativos	12	29	42	
Total	36	29	65	

Sensibilidad relativa: 66,7.

Especificidad relativa: 100%

Kappa 0,77

tos negativos, independientemente de que haya resultado con una especificidad del 100%.

En la TABLA II se muestran los resultados comparativos de la prueba de SN con 24 horas de incubación y de la prueba de ELISA. En ella se observa que, con este período de incubación, la SN tuvo un 98,5% de concordancia con la ELISA y un nivel de kappa de 0,98, muy cercano al máximo nivel de concordancia. La sensibilidad relativa fue del 100%, indicativa de que esta prueba detecta con mucha precisión la presencia de anticuerpos contra este virus. De manera similar, la especificidad fue de 96,6%, lo que muestra la bondad de la prueba al identificar eficientemente los sueros libres de anticuerpos.

En la prueba de SN, utilizando 1 hora de incubación (FIG. 1), se detectaron anticuerpos contra el virus de la RIB en 24 de las 65 (36,9 %) muestras de sueros, mientras que cuando el período de incubación fue de 24 horas se detectaron anticuerpos en 37 de los 65 (56,9%).

El análisis comparativo de estos resultados, mediante la prueba de Chi cuadrado ( $X^2_c = 5,2 > X^2_t = 3,8; 0,05 > P > 0,02$ ), indicó una diferencia significativa en la detección de seropositividad cuando el período de incubación fue de 1 hora, en comparación con el de 24 horas (37% vs 57%, respectivamente). Estos resultados eran de esperarse por ser conocido desde hace mucho tiempo, que la neutralización es la inactivación de la infectividad del virus por anticuerpos y que dicha neutralización guarda una correlación con la duración del tiempo de incubación virus-anticuerpo [5]. Además, está señalado que la neutralización resulta de cambios conformacionales en el virión que impiden la liberación del genoma viral dentro de la célula, como resultado de la fijación de anticuerpos a antígenos de superficie, y que estos cambios dependen de una serie de factores entre los cuales se señalan la afinidad de las inmunoglobulinas y el tiempo de la reacción [14].

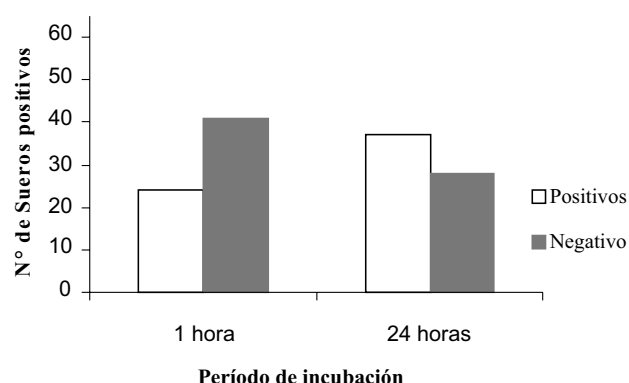
Perrin y col. [8] señalan que entre los múltiples factores que influyen en la neutralización, el período de incubación es el que tiene mayor efecto sobre la detección y cuantificación de los anticuerpos.

Trabajos similares realizados por Cho y Bohac [4], obtuvieron mayor sensibilidad con 24 horas de incubación en presencia de complemento, que con 1 hora de incubación, sin

complemento. Dereg y col. [6] reportan que el número de muestras que resultan negativas no difieren significativamente cuando se procesan con o sin complemento, lo que pareciera indicar que la presencia de complemento no fuese un factor muy determinante para la reacción de neutralización del herpesvirus bovino tipo 1. Este hecho pudiera explicarse en razón de que las inmunoglobulinas IgM, sólo presentes en infecciones tempranas, son dependientes del complemento para la neutralización [9, 11], mientras que las IgG, que usualmente constituyen el 85% de las inmunoglobulinas en el suero del bovino [12], no son dependientes del complemento para la neutralización.

Al hacer un análisis de los títulos de anticuerpos contra el virus de la RIB, detectados en los sueros positivos con 1 y 24 horas de incubación, se observó que con 1 hora de incubación el 96% de los sueros quedaron ubicados en las clases 1 y 2, correspondientes a las clases con bajos títulos de anticuerpos. Contrariamente, con la prueba de SN de 24 horas de incubación, el 57% de los sueros quedaron ubicados en la clase 6, correspondiente al intervalo con mayores niveles de anticuerpos (FIG. 2).

Estos resultados fueron similares a los señalados por Perrin y col. [8] quienes señalan títulos de anticuerpos hasta 16 diluciones dobles por encima de los obtenidos con períodos de incubación de 1 hora.



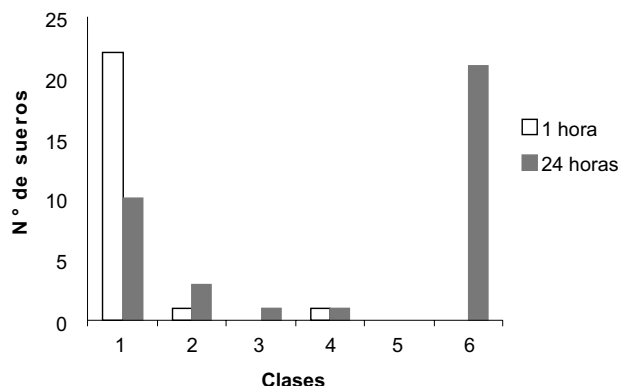
**FIGURA 1. RESULTADOS DE LA SERONEUTRALIZACIÓN EN MUESTRAS DE SUEROS BOVINOS, CON 1 Y 24 HORAS DE INCUBACIÓN.**

**TABLA II  
CONCORDANCIA ENTRE LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS POR SERONEUTRALIZACIÓN CON 24 HORAS DE INCUBACIÓN Y ELISA**

Seroneutralización	ELISA		Total	% Concordancia
	Positivos	Negativos		
Positivos	36	1	37	98,5%
Negativos	0	28	28	
Total	36	29	65	

Sensibilidad relativa: 100%  
Especificidad relativa: 96,6%

Kappa 0,98



**FIGURA 2. TÍTULOS DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA, DETECTADOS EN LOS SUEROS POSITIVOS CON 1 Y 24 HORAS DE INCUBACIÓN.**

## CONCLUSIÓN

La prueba de SN para la detección de anticuerpos contra el herpesvirus bovino - 1 debe tener un período de incubación virus/suero de 24 horas, para la obtención de resultados confiables.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BASCUÑANA, C.; BELAK, S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine and rangiferine Alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. **J. of Clin. Microbiol.** 37 (5): 1-7. 1999.
- [2] BITSCH, V. The P37/24 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus serum neutralization test. **Acta Vet. Scand.** 19: 497-505. 1978.
- [3] BIZANOV, G.; JONAUSKIENE, I. Comparative study of four techniques for serodiagnosis of parainfluenza virus type 1 in pigs. **Bull. Vet. Pulawy.** 47: 37-43. 2003.
- [4] CHO, H.J.; BOHAC, J.G. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of infectious bovine rhinotracheitis viral antibody in cattle. **Can. J. Comp. Med.** 49: 189-194. 1985.
- [5] DELLA-PORTA, A.J.; WESTAWAY, E.G. Review Article A Multi-Hit Model for the neutralization of Animal Viruses. **J. Gen. Virol.** 38: 1-19. 1977.
- [6] DEREGT, D.; CHO, H. J.; KOZUB, G. C. A comparative Evaluation of Two Sensitive Serum Neutralization Tests for Bovine Herpesvirus-1 Antibodies. **Can J. Vet. Res.** 57: 56-59. 1993.
- [7] FINNEY, K. E. **Statistical Method in Biological assay.** 2<sup>nd</sup> Edition. Charles Griffin Co. Ltd. London. England. 524-530 pp. 1964.
- [8] PERRIN, B.; BITSCH, V.; CORDIOLI, P.; EDWARDS, S.; ELOIT, M.; GUERIN, B.; LENIHAN, P.; PERRIN, M.; RONSHOLT, L.; VAN OIRSCHOT, J. T.; VANOPDEN-BOSCH, E.; WELLEMANS, G.; WIZIGMANN, G.; THIBIER, M. A European comparative study of serological methods for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.** 12: 969-984. 1993.
- [9] POTGIETER, L.N.D. The Influence of Complement on the Neutralization of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus by Globulins Derived from Early and Late Bovine Antisera. **Can. J. Comp. Med.** 39: 427-433. 1975.
- [10] ROCKBORN, G.; KLINGEBORN, N.; JUTTI, N. **Diagnostic Virology.** Second Part. Guidebook to Procedures. J. Moreno López Editor. Swedish University of Agriculture Science. 19-26 pp. 1990.
- [11] ROSSI, C.R.; KIESEL, G.K. Antibody class and complement requirement of neutralizing antibodies in the primary and secondary antibody response of cattle to infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine. **Arch. Virol.** 51: 191-198. 1976.
- [12] TIZARD, I. **Inmunología Veterinaria.** 5<sup>ta</sup> Edición, McGraw Hill Interamericana. Madrid, España. 176-178 pp. 1999.
- [13] TORRANO, C. Dificultades en el control de IBR y DVB en la reproducción. En **Memorias del XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal.** 1-8 pp. Valera 22-26 de Octubre. ULA. Trujillo. 2002.
- [14] YOSHINO, K.; ISONO, N. Studies on the neutralization of herpes simplex virus. IX. Variance in complement requirement among IgG and IgM from early and late sera under different sensitization conditions. **Microbiol. Immunol.** 22: 403-414. 1978.