

# DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

## RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA - IBR

**JORNADA TÉCNICA PROGRAMA NACIONAL DE PREVENCIÓN,  
CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA IBR**

**Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM)**

**08/06/2023**

Laboratorio Central de Veterinaria (LCV) – MAPA  
Departamento de Virología 1  
Azucena Sánchez [azusan@mapa.es](mailto:azusan@mapa.es)

## CONTENIDO

- ❖ Presentación LCV
- ❖ Estructura del diagnóstico en Sanidad animal
- ❖ Breve introducción al patógeno
  
- ❖ Diagnóstico
  - Introducción
  - Etiología
  - Toma de muestras
  - Aislamiento e identificación
  - Serología
  
- ❖ Actividades del LNR

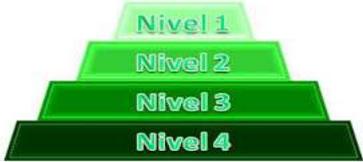




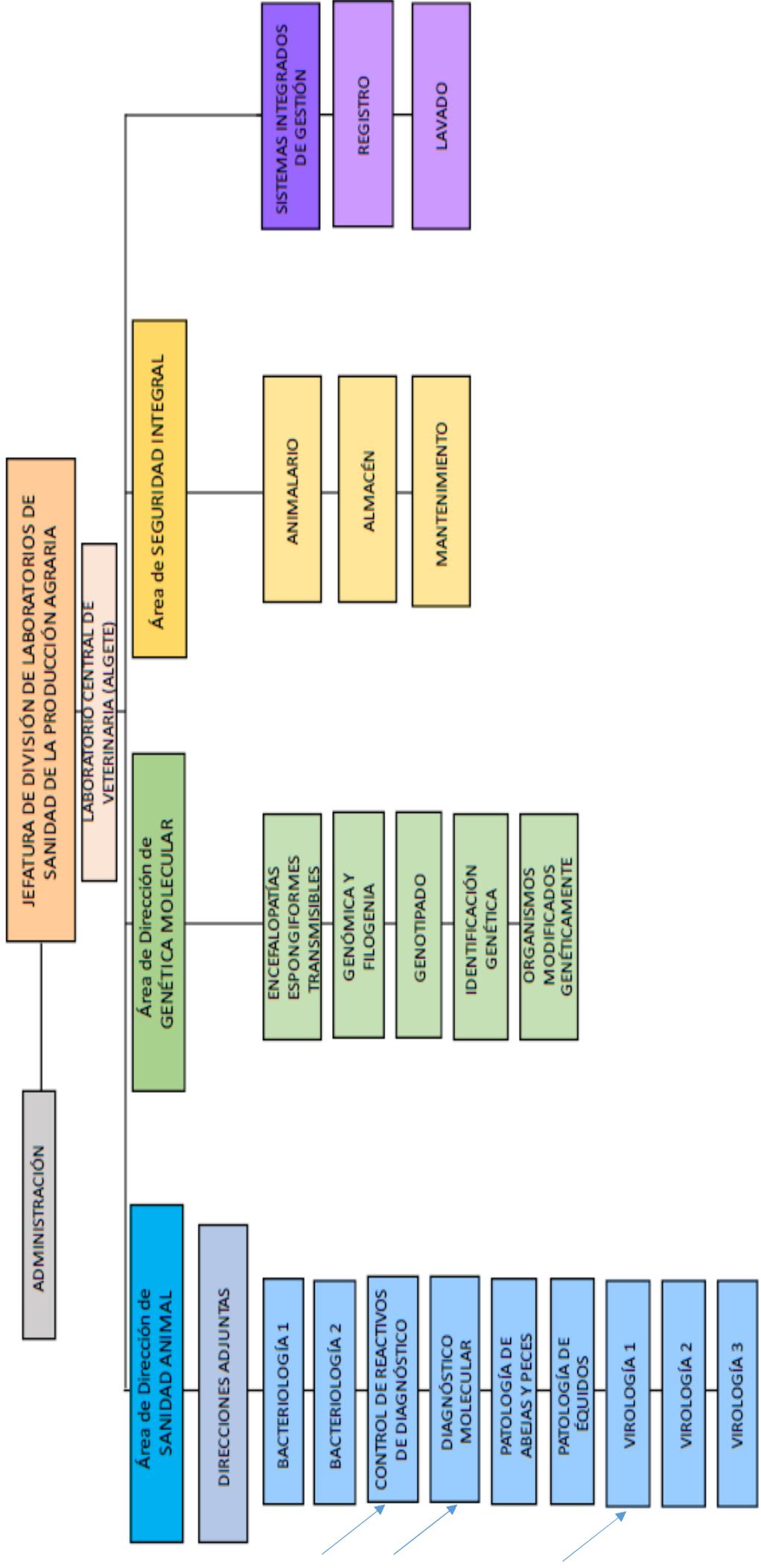
**Laboratorio**



**Animalario  
ABS2 / Sala Limpia**



### ORGANIGRAMA LCV



## LCV - Algete: Referencias Nacionales Sanidad Animal

- Fiebre Aftosa
- Influenza
- Enfermedad de Newcastle
- Chamydiosis aviar (Psittacosis)
- Lengua Azul (EU-RL)
- Peste Equina Africana (EU-RL)
- West Nile y otros Flavivirus
- Peste Porcina Africana, Peste Porcina Clásica
- Enfermedad de Aujeszky
- Enfermedades de los conejos: Enfermedad Vírica Hemorrágica y Mixomatosis
- Leucosis Enzoótica Bovina, **Rinotraquítis Infecciosa Bovina (IBR)**
- Enfermedades Equinas: Metritis Contagiosa Equina, Anemia Infecciosa Equina, Arteritis Viral Equina, Durina, Muermo
- Encefalopatías Espongiformes Transmisibles y genotipado de gen asociado a EETs
- Salmonellosis, Campylobacteriosis, E. coli.,
- Resistencia Antimicrobiana en la producción primaria
- Enfermedades de peces y Crustáceos
- Enfermedades de abejas: Varroosis y otras
- ...

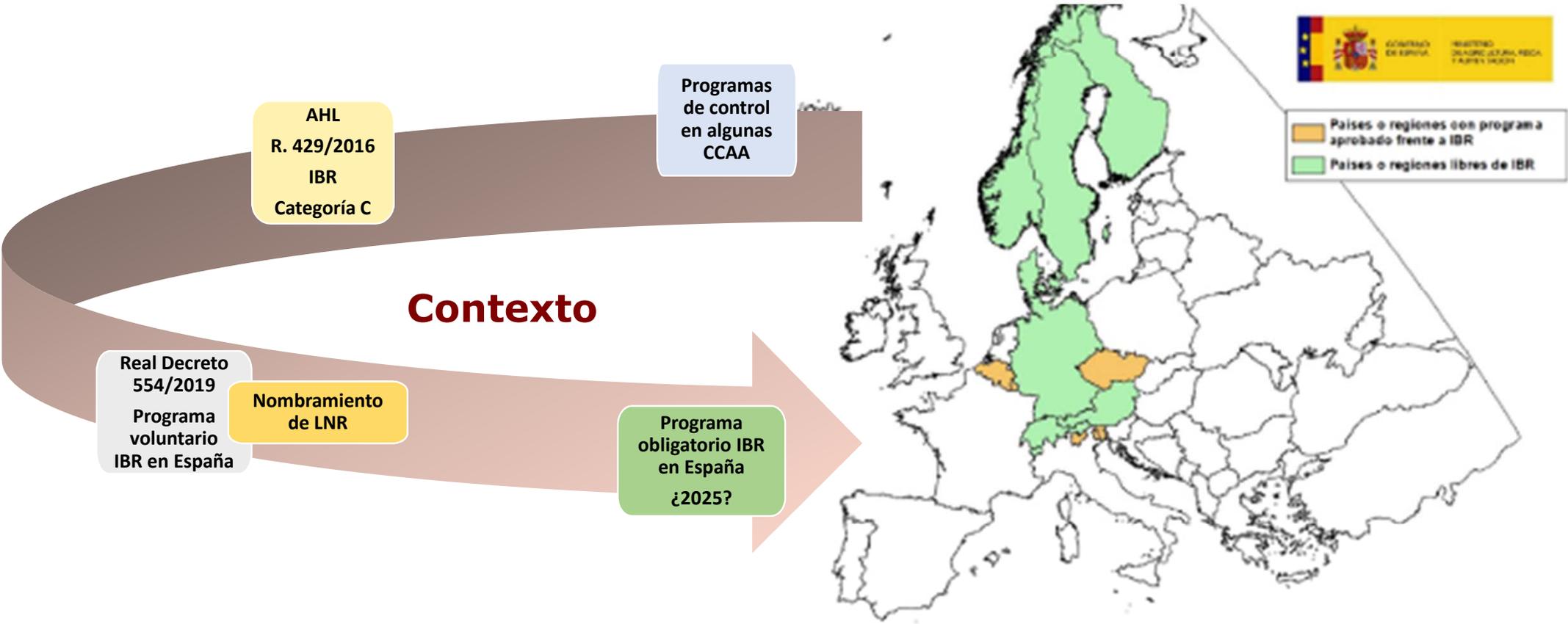
Todo este trabajo se lleva a cabo bajo la implantación de normas de Gestión de Calidad (ISO 17025), Gestión Ambiental (ISO 14001) y Gestión en PRL



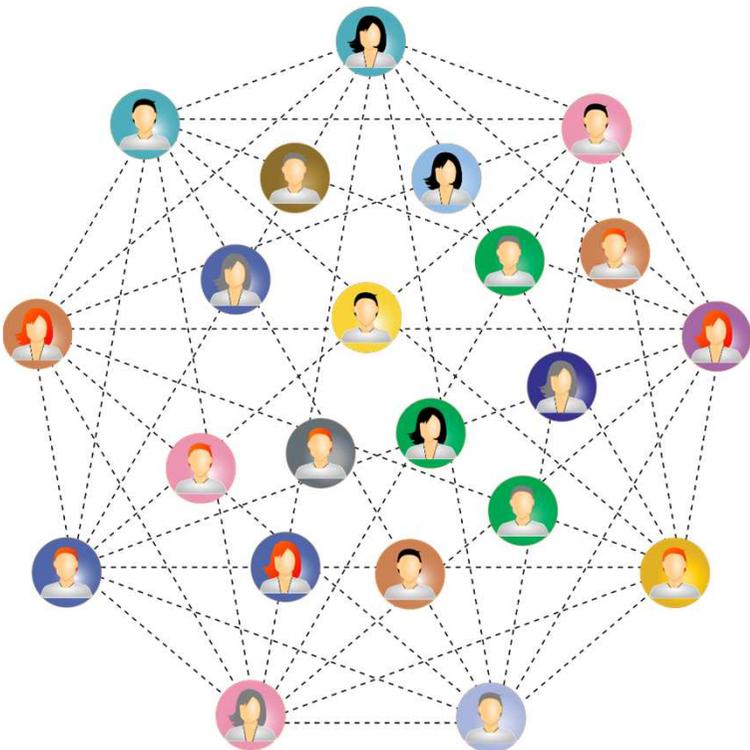
LEY 31/1995  
ISO 45001  
OHSAS 18.001



# Estructura del diagnóstico en Sanidad animal



# Estructura del diagnóstico en Sanidad animal



## Laboratorios de referencia para IBR

### Laboratorio de referencia de la OMSA:

OIE-RL FLI (Friedrich-Loeffler-Institut)-LR OMSA- Alemania.



### Laboratorio Nacional de Referencia (LCV)

Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (RD 554/2019).<sup>LCV</sup>



## Funciones LNR (RD 554/2019):

(Reglamento 625/2017)

- Coordinar las actividades de los laboratorios designados por las CCAA, a fin de **armonizar los métodos de diagnóstico** de laboratorio y su utilización.
- Realizar **ensayos de intercomparación periódicos**, y poner a disposición de los laboratorios el material de referencia necesario para garantizar la calidad de los ensayos.
- Cuando sea necesario, realizará **acciones de formación** para el personal de los laboratorios designados.
- **Evaluar y contrastar las pruebas y los lotes de kit de diagnóstico** utilizados.
- **Confirmar resultados positivos o dudosos** obtenidos en los laboratorios oficiales de las CCAA.

## INTRODUCCIÓN Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) / Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (VPI)

- Causada por el **herpesvirus bovino tipo 1 (HVBo-1)**
- Afecta al ganado bovino **doméstico y salvaje**
- **Distribución mundial** (erradicada de varios países europeos -Austria, Dinamarca, Finlandia, Noruega, Suecia y Suiza- y otros disponen de programas de erradicación)
- Enfermedad infectocontagiosa caracterizada por producir **infecciones latentes**
- Distintos cuadros clínicos según la vía de entrada del virus y las prácticas de manejo o cría.
- Provoca un amplio rango de manifestaciones clínicas, con signos **respiratorios y reproductivos**, en ocasiones inaparentes (subclínicos), entre los que se incluyen rinotraqueítis, vulvovaginitis/balanopostitis pustular infecciosa, conjuntivitis, aborto, enteritis y también encefalitis.
- La mortalidad es baja y la **morbilidad alta**.
- Ocasiona **pérdidas económicas** directas en las explotaciones afectadas, limitaciones y/o restricciones en el comercio intracomunitario y en las exportaciones con países terceros de animales, semen, óvulos y embriones.



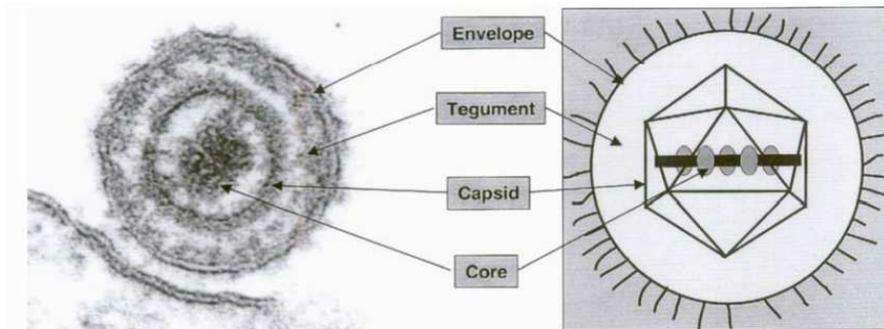
Andy Holliman, APHA Penrith

## INTRODUCCIÓN

El Herpes Virus Bovino Tipo 1 (VHBo-1), forma parte del género *Varicellovirus*, subfamilia *Alfaherpesvirinae*, Familia *Herpesviridae*

El genoma vírico consiste en un **ADN bicatenario** que codifica unas 70 proteínas, de las cuales se han identificado 33 estructurales y más de 15 no estructurales.

Las glicoproteínas víricas (alrededor de 12) se encuentran en la envoltura de la superficie del virión, la mayoría están proyectadas como peplómeros y tienen importante papel en la **patogenicidad** y en la **inmunidad**, tal es el caso de **gB, gC, gD y gE**.



**Figura 1.** Morfología de un virión de herpesvirus. Los viriones de herpesvirus presentan cuatro estructuras morfológicas diferenciadas. El core interno, compuesto por una molécula lineal de DNA doble-hebra, permanece encerrado en una cápside icosaédrica la cual, a su vez, está rodeada por una capa formada por más de 15 proteínas distintas llamada tegumento. La partícula vírica está rodeada por una envoltura lipídica que contiene proteínas víricas en su mayoría glicosiladas. El virión del herpes está compuesto por más de 30 proteínas distintas. [Imagen y texto tomados de Mettenleiter, 2003]

Otras proteínas estructurales se encuentran en la nucleocápsida y una menor cantidad están asociadas al ADN.

**INTRODUCCIÓN**

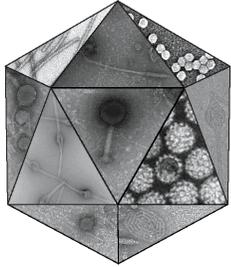
- ▼ Family: Orthoherpesviridae
  - ▼ Subfamily: Alphaherpesvirinae
    - › Genus: Iltovirus
    - › Genus: Mardivirus
    - › Genus: Scutavirus
    - › Genus: Simplexvirus
    - › Genus: Varicellovirus
  - ▼ Subfamily: Betaherpesvirinae
    - › Genus: Cytomegalovirus
    - › Genus: Muromegalovirus
    - › Genus: Proboscivirus
    - › Genus: Quwivirus
    - › Genus: Roseolovirus
  - ▼ Subfamily: Gammaherpesvirinae
    - › Genus: Bossavirus
    - › Genus: Lymphocryptovirus
    - › Genus: Macavirus
    - › Genus: Manticavirus
    - › Genus: Patagivirus
    - › Genus: Percavirus
    - › Genus: Rhadinovirus



**BoHV-2**



**BoHV-1 y BoHV-5**



**Virus Taxonomy**  
The ICTV Report on  
Virus Classification and Taxon Nomenclature



**BoHV-4**

BoHV-4 está ampliamente distribuido a nivel mundial

Hasta el momento no se lo ha establecido como agente causal de una entidad patológica en particular

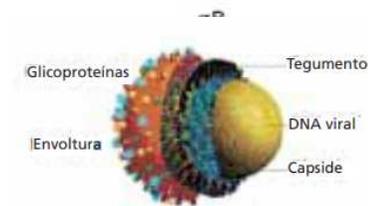
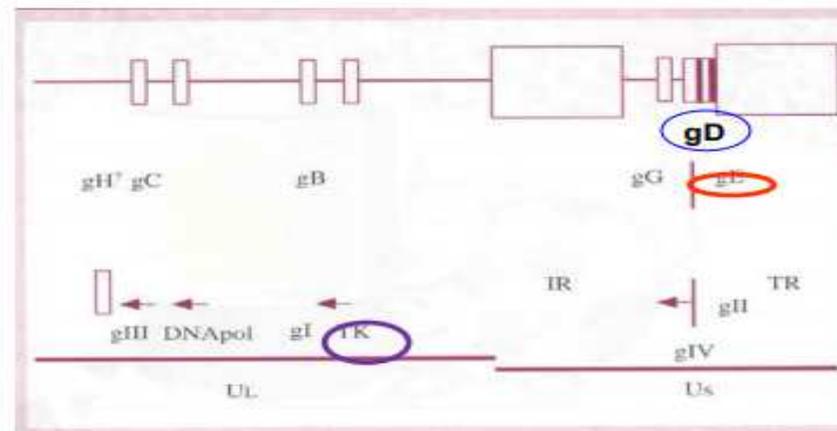
**INTRODUCCIÓN**

TABLA II. Herpesvirus que afectan a especies animales (Fenner *et al*,1992; Quinn *et al*, 2002b)

Virus	Afección
Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1)	Síndrome de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), síndrome de la vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), balanopostitis, conjuntivitis y enfermedad generalizada en terneros.
Herpesvirus bovino tipo 2 (BoHV-2)	Síndrome de la mamilitis bovina (BHM) (ulceración de ubres). Síndrome pseudo-lumpyskin (PLSD) o nodulación de la piel.
Herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5)	Encefalitis y leptomeningitis en terneros.
Herpesvirus porcino tipo 1 (SuHV-1) o Virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV) (PrV)	Enfermedad de Aujeszky (aborto, 100% de mortalidad en lechones, estornudo, tos, vómito, temblor, convulsión, descoordinación). Encefalitis fatal en lechones. Prurito (hasta automutilación) y pseudorabia en hospedadores secundarios.
Herpesvirus alcelaphine tipo 1 (AIHV-1) o Virus de la fiebre catarral maligna (MCF) y Herpesvirus ovino tipo 2 (OvHV-2)	Síndrome de la fiebre catarral maligna (MCF) en ñus, ciervos o ganado (descarga nasal, conjuntivitis, ulceración de mucosa del tracto respiratorio superior, daños neurológicos, diarrea o disentería). Con frecuencia resulta fatal.
Herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1)	Aborto. Rinoneumonía equina en potros. Encefalomielit. Enfermedad generalizada en potros.
Herpesvirus equino tipo 4 (EHV-4)	Rinoneumonía equina en potros (fiebre, anorexia, flujo nasal seroso o mucopurulento). Bronconeumonía. Aborto.
Herpesvirus equino tipo 3 (EHV-3)	Exantema coital equino (lesiones vesiculares y ulcerativas en vagina, piel del pene, prepucio y región perineal). Proceso generalmente benigno.
Herpesvirus canino tipo 1 (CaHV-1)	Dolor abdominal, anorexia, disnea, flujo vaginal o prepucial. Lesiones vesiculares en genitales externos, vaginitis o balanopostitis. En cachorros, hemorragia equimótica en riñones, glándulas adrenales y tracto intestinal. Alta mortalidad en cachorros.
Herpesvirus felino tipo 1 (FeHV-1)	Rinotraqueítis felina (fiebre, estornudo, tos, salivación espumosa, descarga oculonasal, disnea, anorexia). Bronconeumonía. Ulceración y queratitis.
Herpesvirus aviar tipo 1 (GaHV-1) o Virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILTIV)	Laringotraqueítis infecciosa (tos, jadeo, flujo oculonasal, conjuntivitis, expectoración hemorrágica). Alta mortalidad.
Herpesvirus aviar tipo 2 (GaHV-2) o Virus de la enfermedad de Marek (MDV)	Neurolinfomatosis o enfermedad de Marek (parálisis parcial o completa de patas y alas). Linfomatosis ocular. Enfermedad de Marek cutánea.

## INTRODUCCIÓN

Esquema de los segmentos del DNA que codifican para las principales proteínas del BHV-1 y localización de las mismas.



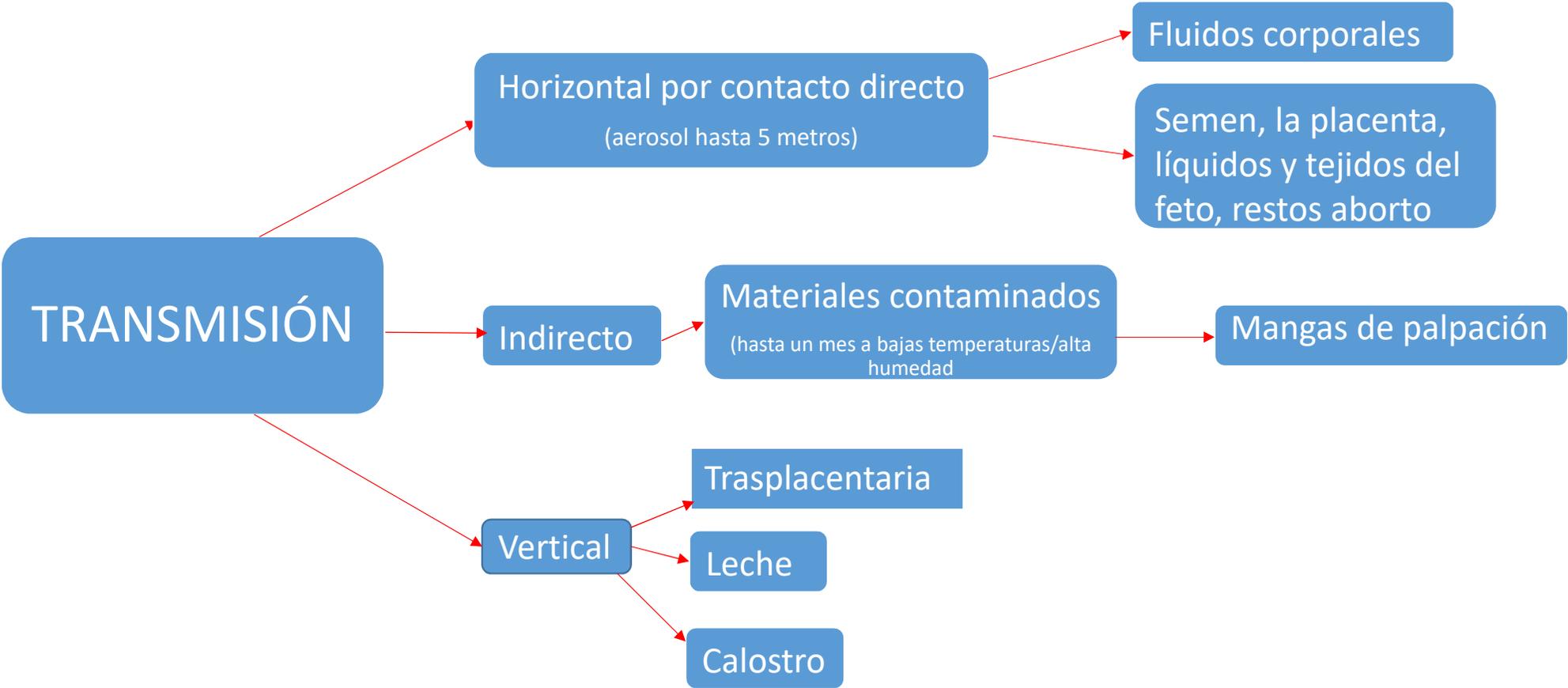
**gD:** proteína estructural, principal responsable de inducir la producción de anticuerpos que neutralizan el virus y por lo tanto importante para la inmunidad.

**gE:** no induce una respuesta inmune importante y, por lo tanto, es de elección para su supresión en vacunas marcadoras.

**gB:** también estructural, esencial para la replicación del virus

**tk:** no estructural, una de las principales proteínas implicadas en el establecimiento de la latencia vírica

**INTRODUCCIÓN**



# INTRODUCCIÓN

Caracterizada por producir infecciones latentes y distintos cuadros clínicos

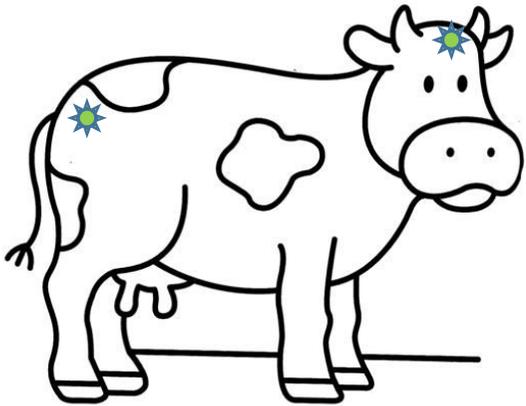


Secreción nasal (muco-purulenta), hiperemia del hocico (enfermedad de la nariz roja), conjuntivitis, lesiones necróticas en mucosas orales.

Vulvovaginitis/balanopostitis pustular infecciosa.

Aborto (la mayoría en el último tercio de la gestación), enteritis y encefalitis.

Fiebre, depresión, ↓ producción de leche.



**ESTADO LATENTE**

El ADN vírico permanece en las neuronas de los ganglios, probablemente **durante toda la vida del hospedador**. En caso de estrés (transporte, parto...) , o al aplicar corticosteroides, se puede inducir la reactivación de la infección latente, produciéndose la **excreción del virus con ausencia de sintomatología clínica**.

# DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

## RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA - IBR



# Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR)

## DIAGNÓSTICO

El diagnóstico presuntivo o inicial de IBR puede hacerse en base a los signos clínicos, patológicos y epidemiológicos, pero dado que no son definitivos y pueden confundirse con otras enfermedades e incluso, en muchas ocasiones presentarse sin sintomatología, se necesita para llegar a un diagnóstico definitivo realizar un **diagnóstico laboratorial**.

Por los signos clínicos que presenta la IBR, se deben tener en cuenta un **diagnóstico diferencial**:

- En la forma respiratoria, diarrea viral bovina (DVB), parainfluenza 3 (PI3); pasterelosis neumónica.
- En la forma genital y abortiva, Brucella, Leptospira, DVB y Neosporosis.
- En la forma conjuntival, queratoconjuntivitis infecciosa.

Complejo Respiratorio Bovino	Virus	Virus Herpesvirus bovino tipo 1 (VHB-1) Virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB) Parainfluenza Bovina tipo 3 (PI3) Virus Respiratorio Sintetial Bovino (VRSB)
	Bacterias	Pasteurella multocida, Mannheimia haemolytica, Haemophilus somni, Mycoplasma Spe
	Factores externos	Clima, temperatura ambiental, partículas de polvo, densidad poblacional, humedad, ventilación y la distancia de embarque
	Factores internos	Clima, temperatura ambiental, partículas de polvo, densidad poblacional, humedad, ventilación y la distancia de embarque
Complejo abortivo Bovino	Virus	Virus Herpesvirus bovino tipo 1 (VHB-1) Virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB)
	Bacterias	Leptospiras
	Parásitos	Neospora caninum, Trichostrongylus axei, Babesia Bovis
	No infecciosos	Micotoxinas

Ganadería.com

La profilaxis se logra por medio de la vacunación y con el sacrificio de animales seropositivos

# DIAGNÓSTICO

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO (Manual terrestre de la OMSA 2018)

**Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico del HVBo-1 y su propósito**

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Identificación del agente<sup>1</sup></b>						
Aislamiento del virus	-	+ <sup>2</sup>	+	++	-	-
PCR en tiempo real	-	+ <sup>2</sup>	+	+++	-	-
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
ELISA	+++	+++	+++	++	+++	+++
VN	++	++	++	+	++	++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; - = no adecuado para este propósito.  
 ELISA = enzimoimmunoanálisis; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; VN = prueba de neutralización vírica

1. Se recomienda aplicar varios métodos
2. Especialmente aplicable en semen

## DIAGNÓSTICO

### Diagnóstico laboratorial

#### Identificación del agente patógeno

- Obtención y procesado de las muestras.
- Aislamiento viral.
- Detección del ácido nucleico.
- Detección del antígeno vírico.

#### Pruebas serológicas: detección de anticuerpos específicos frente al virus.

- Enzimoimmunoanálisis (ELISA) → tipo de ensayo más utilizado durante las campañas de control y erradicación de la enfermedad.
- Prueba de Neutralización vírica (SN).

## Toma de muestras para identificación del agente causal



En el caso de **sintomatología respiratoria**, se recogen **hisopos traqueales**, menos contaminados que los nasales, preferiblemente de espuma o de algodón, de varios animales afectados (de cinco a diez) en la primera fase de la infección.

En los casos de **vulvovaginitis o balanopostitis** se toman **hisopos de los genitales**.

Los hisopos deben frotarse vigorosamente contra las superficies mucosas. También se puede lavar el prepucio con solución salina y recoger el líquido de lavado. Las muestras se suspenden en un medio de transporte (un medio de cultivo celular que contenga antibióticos y 2–10% de suero fetal bovino sin HVBo-1 para evitar la inactivación de los virus), se enfrían a 4°C y se envían rápidamente al laboratorio.

En el caso de **animales muertos o abortos** pueden recogerse las muestras de los principales órganos y cotiledones placentarios, conservarlas refrigeradas hasta su envío urgente al laboratorio o incluso llevar el animal o feto entero para su necropsia en el laboratorio.



## DIAGNÓSTICO

### ❑ Identificación del agente patógeno

#### Aislamiento del virus – Cultivos celulares



Después de su llegada al laboratorio:

- Los **hisopos** se dejan a temperatura ambiente durante 30 minutos en el medio de transporte para eluir el virus. Después de extraer los hisopos se clarifica el medio de transporte por centrifugación a 1.500 g durante 10 minutos.
- Los **tejidos** se homogeneizan para formar suspensiones al 10–20% (p/v) en medio de cultivo celular antes de centrifugar a 1.500 g durante 10 minutos. Los sobrenadantes de estas muestras se filtran a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  y se utilizan para el aislamiento de virus.
- El aislamiento de virus a partir del **semen** requiere algunas adaptaciones particulares, porque el líquido seminal contiene enzimas y otros factores que son tóxicos para las células e inhiben la replicación del virus. Debe prediluirse (por ejemplo, a 1/10) antes de añadirlo a los cultivos celulares.

## DIAGNÓSTICO

### Identificación del agente patógeno

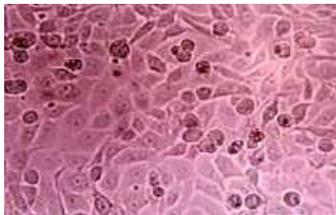
### Aislamiento del virus – Cultivos celulares

Para el aislamiento del virus, se utilizan distintos cultivos celulares de origen bovino, como células pulmonares o renales secundarias o la línea de **células renales bovinas Madin-Darby (MDBK)**.

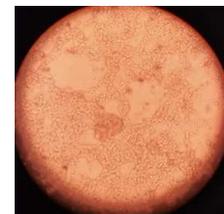
Se observa a diario si los cultivos celulares presentan **ECP**, que normalmente aparece a los tres días de la inoculación. Se caracteriza por agrupaciones de células redondeadas en forma de racimos que se juntan alrededor de un hueco en la monocapa; a veces, se pueden observar células gigantes con varios núcleos.

Si después de 7 días no aparece el ECP, se debe realizar un pase ciego.

El cultivo celular se congela y se descongela, se clarifica por centrifugación, y se usa el sobrenadante para dar el 2º pase, inoculando monocapas recién preparadas.



Células MDBK

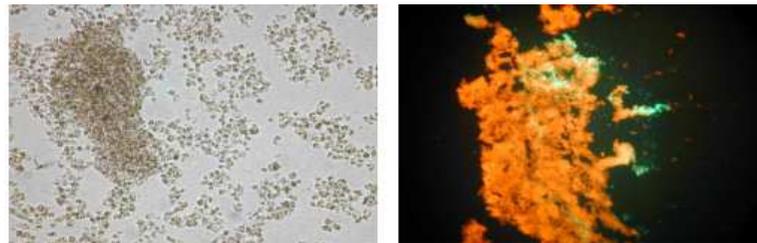


ECP células MDBK

**DIAGNÓSTICO****Identificación del agente patógeno****Aislamiento del virus – Cultivos celulares**

Para identificar el virus aislado como HVBo-1, el sobenadante del cultivo debe neutralizarse con un antisuero monoespecífico contra el virus o con un anticuerpo monoclonal (Mab) neutralizante.

La especificidad del efecto citopático se comprueba mediante la técnica de inmunofluorescencia, de inmunoperoxidasa o la neutralización con un antisuero específico (seroneutralización) o mediante **PCR**. Puede haber ECP originado por otros virus o por factores tóxicos inespecíficos.



Efecto citopático en cultivo debido al BHV-1  
y demostración del agente por la técnica de inmunofluorescencia  
(fotografías cedidas por Carmen Eiras)

DIAGNÓSTICO

Identificación del agente patógeno

Detección del Ácido Nucleico

	LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA	F/IESIG/PCR-35/01
	PCR EN TIEMPO REAL DEL VIRUS DE ALPHAHERPESVIRUS DE RUMIANTES, INCLUYENDO EL VIRUS DE LA RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA (IBR) / VULVOVAGINITIS PUSTULAR INFECCIOSA (IPV) - gB- Abril et al. (2004) CON PATH-ID™ QPCR MASTER MIX (Thermo Fisher Scientific)	

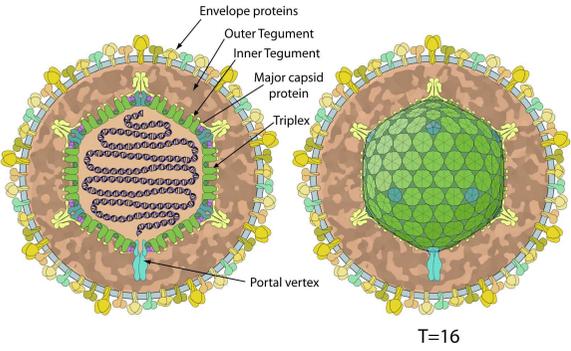
PCR.- PCR en tiempo real dirigida al gen que codifica la glicoproteína gB

	LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA	F/IESIG/DM-035/02
	rPCR PARA LA DETECCIÓN IDENTIFICACIÓN DE ALPHAHERPESVIRUS DE RUMIANTES. CEPAS VACUNALES Y DE CAMPO - gB-y-gE - Wernike et al., (2004) con PATH-ID™ qPCR MASTER MIX (Thermo Fisher Scientific)	

PCR.- Esta PCR diferencia las cepas de campo de las cepas vacunales. Además lleva un control interno dirigido al gen de la β-actina.

Estas PCRs están recomendadas en el manual de la OMSA

<https://viralzone.expasy.org/15>

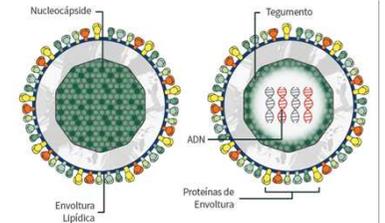


T=16

## DIAGNÓSTICO

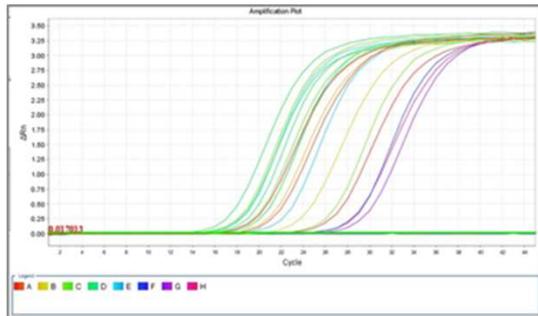
### Identificación del agente patógeno

### Detección del Ácido Nucleico (PCR)



En comparación con el aislamiento de virus, la PCR tiene la ventaja principal de que es más sensible y más rápida: puede realizarse en unas horas.

La PCR en tiempo real se utiliza para detectar el HVBo-1 en **semen bovino** conservado destinado al comercio. La PCR tiene una sensibilidad analítica mayor que el aislamiento del virus.



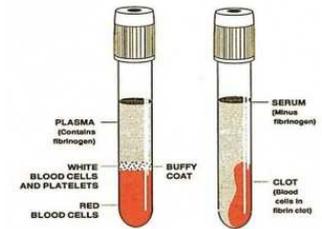
Es habitual recibir sangre con EDTA, pero al no ser una muestra de elección un **resultado negativo en sangre entera no es un resultado significativo**

## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

### Técnicas serológicas: ELISA & SN

Pueden utilizarse pruebas serológicas con varios fines:

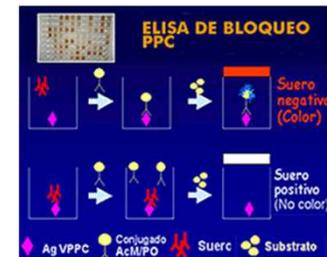
- I. **Diagnosticar una infección aguda:** en una prueba se analizan muestras de suero pareadas de las fases aguda y convaleciente de infección de los mismos animales. Una seroconversión de negativo a positivo o un aumento de cuatro veces o más en los títulos de anticuerpos se considera una infección aguda.
- II. **Demostrar la ausencia de infección,** por ejemplo a efectos del comercio internacional.
- III. **Determinar la prevalencia** de infección en estudios sero-epidemiológicos.
- IV. **Respaldar programas** de erradicación y la posterior vigilancia.
- V. **Para la investigación,** por ejemplo la evaluación de la respuesta inmunitaria tras la vacunación y la exposición al agente patógeno.



## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

### Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

- Actualmente la técnica más utilizada en los laboratorios de diagnóstico por su sensibilidad, especificidad, sencillez y bajo precio.
- Se comercializan varios tipos de pruebas ELISA (**indirecto** de detección de Ac totales y **bloqueo** para la detección de Ac anti gB y detección de Ac anti gE).
- Con los ELISA, pueden detectarse anticuerpos en suero, plasma, muestras de leche individual o de tanque.
- El uso de un ELISA de detección de anticuerpos contra gE permite diferenciar entre el ganado bovino infectado por virus natural y el ganado bovino vacunado con una vacuna marcada mediante la supresión de gE (estrategia DIVA).
- Es una prueba prescrita para el comercio internacional.



## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Método	Objetivo	Matriz	Otra información
ELISA indirecto	Ac totales	Suero, leche (pool, tanque)	Kits comerciales registrados en el registro de productos zosanitarios
ELISA gB bloqueo	Ac gB	Suero, leche ( <del>pool, tanque</del> )	
ELISA gE bloqueo	Ac gE (capacidad DIVA)	Suero, leche	

**ELISA Indirecto:** detecta todo tipo de Ac del virus BHV-1. Es el más sensible para utilizar en el diagnóstico de leche de tanque, no permite diferenciar animales vacunados de infectados. Es una buena herramienta para monitorizar con un coste mínimo la presencia de la enfermedad en los rebaños.

### ELISAs de bloqueo:

- **ELISA-gB:** detecta Ac frente a la glicoproteína gB del BHV-1 que es la de mayor intensidad en la respuesta a la infección. Es el ELISA de elección en muestras de suero por su elevada sensibilidad. No diferencia animales infectados de vacunados.
- **ELISA-gE:** detecta Ac frente a la glicoproteína gE del BHV-1. Es la única prueba que permite diferenciar Ac vacunales de Ac de infección, en los animales vacunados con estas vacunas el resultado debería ser negativo (gE-).

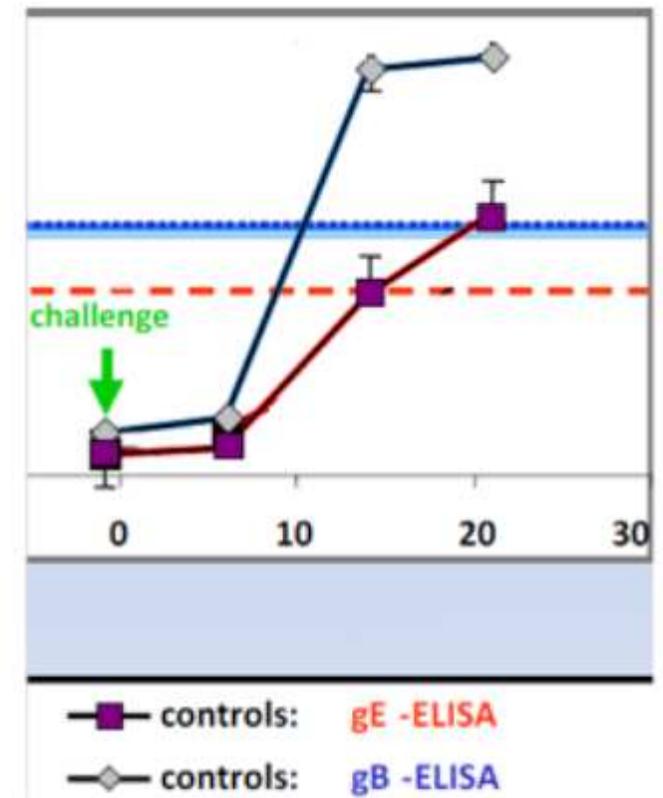
## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

La respuesta a la glicoproteína gE es de menor intensidad y más tardía que la producida por la glicoproteína gB, de ahí la menor sensibilidad de los ELISAs gE.

Ac gB a los 8-10 dpi y Ac gE a los 14-35 dpi

Posible interferencia con **anticuerpos de origen materno** (colostral) en terneros de edad inferior a 6-9 meses.

Posible interferencia con **anticuerpos vacunados** (de vacunas no marcadoras).



Fuente: analiticaveterinaria

## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO



**Técnicas serológicas**: Detección de una respuesta serológica en animales vivos.

La presencia de los anticuerpos contra el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina se pone de manifiesto mediante:

- **Enzimoimmunoanálisis (ELISA)**
- Prueba de **Neutralización del Virus** (antes golden standar) ←



## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

### TÉCNICA DE SERONEUTRALIZACIÓN (SN)



-Técnica de confirmación de resultados serológicos por ELISA para animales no vacunados.

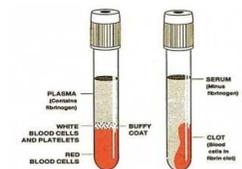
-Se realiza en cultivos de células MDBK.

-Un suero control interno positivo con un título conocido de anticuerpos neutralizantes frente al HVBo-1 (puede calibrarse contra un suero estándar internacional o un estándar secundario preparado a partir de dicho suero).

- Un suero control negativo (de un bovino que no contenga anticuerpos específicos, por ejemplo de un rebaño que esté oficialmente libre de la enfermedad de IBR).

Los sueros problema deben de ser de calidad y ser separado del coágulo sin retraso, para evitar la toxicidad :

- estar claramente etiquetados,
- proceder de un origen conocido con historia clínica,
- almacenarse refrigerados en todo momento,
- estar libres de contaminación fúngica o bacteriana,
- no estar hemolizados y en cantidad suficiente.



## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

TÉCNICA DE SERONEUTRALIZACIÓN (SN)

- Esta prueba es capaz de detectar la presencia o la ausencia de Ac neutralizantes frente al HVBo-1. Detecta animales positivos a partir del 8-10 días post-infección (dpi).
- No permite distinguir entre animales vacunados e infectados.
- Se puede aumentar la sensibilidad incubando el virus y el suero, 24 horas a 4°C, en lugar de 1 hora a 37°C, antes de añadir las células.
- Es una **técnica semi-cuantitativa**, que permite informar un título de anticuerpos al analizar el suero en diluciones seriadas en base 2.



## DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO



- ELISA-gE son pruebas serológicas con una reactividad cruzada muy baja con herpesvirus distintos del HVBo-1.
- ELISA-gE y SN para verificar estos resultados aislados.
- Se recomienda **repetir el análisis de estos animales pasados 28 días con un ELISA-gE** empleando un umbral más bajo (por ejemplo, de 0,95) para aumentar así la sensibilidad.
- En el caso de obtener dos resultados negativos con ELISA-gE, el animal no se clasificará como positivo para HVBo-1, pero se recomienda sacrificarlo porque pueden tener lugar problemas de diagnóstico con otros sistemas de análisis (por ejemplo, resultados positivos en las muestras de leche del rebaño afectado)

# ACTIVIDADES DEL LNR



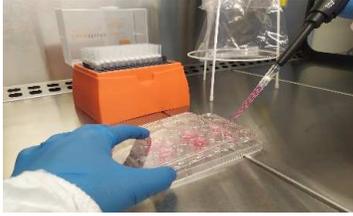
ARMONIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO



ASESORÍA CIENTÍFICO-TÉCNICA



CONTROL DE REACTIVOS DE DIAGNÓSTICO



CONFIRMACIONES



## Laboratorios de Referencia



Organización Mundial de Sanidad Animal  
Fundada como OIE

**Dr. Martin Beer**  
 ALEMANIA

Dirección  
 Institute of Diagnostic Virology Friedrich-Loeffler Institut, Federal Research Institute for Animal Health  
 Südufer 10 D-17493 Greifswald, Insel Riems

Datos de contacto  
 +49 38351 7 1223  
 Patricia.Koenig@fli.de  
 martin.beer@fli.de

**Dr Akbar Dastjerdi**  
 REINO UNIDO

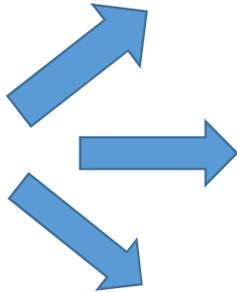
Dirección  
 Animal and Plant Health Agency  
 New Haw, Addlestone, Weybridge, Surrey KT15 3NB

Datos de contacto  
 +44-1932 35.75.08  
 akbar.dastjerdi@apha.gov.uk

# ACTIVIDADES DEL LNR



ARMONIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO



## NOTAS INFORMATIVAS

## PREPARACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE MATERIAL DE REFERENCIA

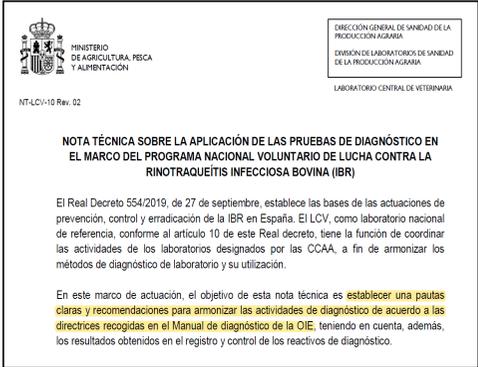
## ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN

2020  
2021  
2022

2019



2021



INFORME ENSAYO INTERCOMPARACIÓN
I ENSAYO INTERCOMPARACIÓN DE APTITUD PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA (IBR) EN MUESTRAS DE LECHE 2020
INFORME ENSAYO INTERCOMPARACIÓN
I ENSAYO INTERCOMPARACIÓN DE APTITUD PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA (IBR) EN MUESTRAS DE SUERO 2020

INFORME ENSAYO INTERCOMPARACIÓN
II ENSAYO INTERCOMPARACIÓN DE APTITUD PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA (IBR) EN MUESTRAS DE SUERO
EA/LNR/IBR-2021

INFORME ENSAYO INTERCOMPARACIÓN
III ENSAYO INTERCOMPARACIÓN DE APTITUD PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA (IBR) EN MUESTRAS DE LECHE
EA/LNR/IBR-2022
INFORME ENSAYO INTERCOMPARACIÓN
III ENSAYO INTERCOMPARACIÓN DE APTITUD PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA (IBR) EN MUESTRAS DE SUERO
EA/LNR/IBR-2022



ARMONIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO

PREPARACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE MATERIAL DE REFERENCIA

~~EU1 (positivo a anticuerpos),  
EU2 (débilmente positivo a anticuerpos y definido como muestra dudosa),  
EU3 (negativo a anticuerpos) (Perrin et al., 1994).~~



**Description of the sera:**

Serum	Neutralisation assay approx. titer 1:x	BHV-1-gB-antibody ELISA	BHV-1-gE-antibody ELISA
R1 D	6	positive	positive
R2 D	4	positive	positive
R3 D	<2 to 2	positive	positive
R31 D	<2	negative	questionable / negative
R32 E	<2	negative	negative

It is recommended to use the R sera to define own substandards.  
Sera R31 and R32 are BHV-1-negative reference sera from defined BHV-1-free cattle.  
Sera R1, R2 and R3 represent a dilution series of a positive pool serum in a negative pool serum.  
R2 should be detected in all test systems.  
SH2 is a strong positive serum from a field virus infected bull;  
dilution 1:64 in negative serum = R1

- Panel de sueros**
- Título a SN
  - ELISA indirecto
  - ELISA gB
  - ELISA ge

**Description of the milk:**

Milk	BHV-1-gB-Antibody- ELISA	Indirect-Antibody-ELISA	Indirect-Antibody-ELISA (1:50 dilution)
R26 A	positive	positive (+++)	positive (++)
R27 C	positive	positive (++)	positive (+/-)
R28 F	positive	positive (+++)	positive (++)
R29	positive	positive (++)	positive (+/-)
R 30 B	negative	negative	negative

It is recommended, to dilute the milk samples in 1:50 dilution (maximum poolsize)  
R27/29 1:50; weak positive.

- Panel de leches**
- ELISA indirecto (muestras individuales)
  - ELISA indirecto (muestras de tanque hasta 50 animales)

A partir de muestras enviadas por los compañeros de los laboratorios de Galicia, se preparó material de referencia basándonos en los patrones internacionales

# Evaluación de los kits ELISA registrados con material de referencia

## -Sensibilidad

- Validación en **suero**: gB- ELISAc > ELISA indirecto >SN (96-99%) >>gE ELISAc (74-86%)

## -Especificidad

- Validación en **suero**: SN= ELISA indirecto= gB ELISAc (98-99%)> gE ELISAc

## -Especificidad

- Validación en **leche**: ELISA indirecto > gB ELISA >>> gE ELISA

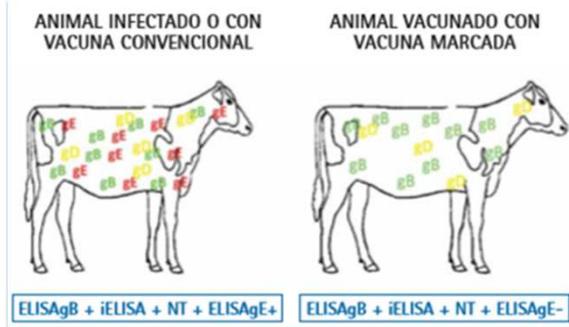


Fig.5: Resultados de serología en animales vacunados con vacunas marcadoras.

KITS IBR EVALUADOS

CASA COMERCIAL		IBR gE	IBR gB	IBR INDIRECTO	
INGENASA	kit	INGEZIM IBR gE COMPAC	INGEZIM IBR COMPAC 2.0	INGEZIM IBR 2.0	
	lote	081019 concurso	170320 concurso	lote 080719	
IDEXX	kit	IDEXX IBR gE	IDEXX IBR gB X3	IDEXX IBR INDIVIDUAL	IDEXX Bulk MILK
	lote	S651	S261	(no disponible)	P151
IDVET	kit	ID SCREEN IBR gE COMPETITION	ID SCREEN IBR gB COMPETITION	ID SCREEN IBR INDIRECT	ID SCREEN IBR MILK INDIRECT
	lote	E43	(no disponible)	E93	F63
HIPRA	Kit	CIVTEST BOVIS IBR gE	CIVTEST BOVIS IBR gB	CIVTEST BOVIS IBR	
	lote	CGE.1378	CGB.9Q08	(no disponible)	

Casa Comercial		Nº Registro	NOMBRE DEL KIT	Tipo de ELISA	Ag detectado	Suero	Suero pool	Plasma	Leche	Leche individual	Leche de tanque	Leche concentrada
HIPRA		2339-RD	CIVTEST BOVIS IBR gE	Bloqueo	gE	x						
		2338-RD	CIVTEST BOVIS IBR gB	Bloqueo	gB	x	x	x		x	x	
		0337-RD	CIVTEST bovis IBR	Indirecto	Totales	x				x	x	
IDEXX		0689-RD	IDEXX IBR gE	Bloqueo	gE	x		x		x	x	x
		0688-RD	IDEXX IBR gB X3	Bloqueo	gB	x		x	x			
		3019-RD	IDEXX BHV-1 BULK MILK	Indirecto	Totales					x	x	
		3477-RD	IDEXX IBR INDIVIDUAL	Indirecto	Totales	x		x				
		2666-RD	IDEXX IBR POOL	Indirecto	Totales	x	x					x
	3013-RD	IDEXX TRACHITEST SERUM SCREENING	Indirecto	Totales	x	x	x					
IDVET BIOLÓGICOS		2707-RD	ID SCREEN IBR gE COMPETITION	Bloqueo	gE	x		x		x	x	x
		2667-RD	ID SCREEN IBR gB COMPETITION	Bloqueo	gB	x		x	x			
		10923-RD	ID SCREEN IBR INDIRECT (ES)	Indirecto	Totales	x		x				
NIRCO		2664-RD	ID SCREEN IBR INDIRECT	Indirecto	Totales	x		x				
INGENASA		3467-RD	INGEZIM IBR gE Compac	Bloqueo	gE	x				x	x	
		0962-RD	INGEZIM IBR COMPAC 2.0	Bloqueo	gB	x				x	x	
		0526-RD	INGEZIM IBR 2.0	Indirecto	Totales	x		x		x	x	
WERFEN		10059-RD	CATTLETYPE BHV1 gE Ab	Bloqueo	gE	x		x	x			
		3194-RD	CATTLETYPE BHV1 gB Ab	Bloqueo	gB	x		x		x	x	
ZOETIS		0882-RD	SERELISA BHV-1 gB Ab MONO BLOCKING	Bloqueo	gB	x		x		x		
		0883-RD	SERELISA BHV-1 TOTAL Ab MONO INDIRECT	Indirecto	Totales	x	x	x		x	x	



ARMONIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO

## PREPARACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE MATERIAL DE REFERENCIA



NT-LCV-10 Rev. 02

2021

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN AGRARIA  
DIVISIÓN DE LABORATORIOS DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN AGRARIA

LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA

NOTA TÉCNICA SOBRE LA APLICACIÓN DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO EN EL MARCO DEL PROGRAMA NACIONAL VOLUNTARIO DE LUCHA CONTRA LA RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA (IBR)

**OBJETIVO:** establecer una **pautas claras y recomendaciones para armonizar las actividades de diagnóstico** de acuerdo a las directrices recogidas en el Manual de diagnóstico de la OMSA, teniendo en cuenta, además, los resultados obtenidos en el registro y control de los reactivos de diagnóstico

1. Consideraciones previas
2. Pruebas diagnósticas de elección citadas en el Anexo III
  - 2.1 Tipo de pruebas
  - 2.2 Características de las pruebas
3. Selección del tipo de prueba
4. Actuación en caso de resultado positivo en ELISA-gE
5. Actuación en caso de resultado positivo en pruebas ELISA generales en animales no vacunados
6. Interpretación de los resultados de laboratorio
7. Referencias

Reacciones inespecíficas:

- Efecto frescura
- Interferencia de la vacunación

- Número de animales positivos/número total de analizados
- Calificación de la explotación (IBR 0, 1, -1, 2, 3 o 4)
- Objetivo del muestreo: obtención, mantenimiento o recuperación
- Edad del animal
- Estado vacunal (del animal y de la explotación)
- Resultados en muestreos anteriores (especificando la prueba/kit utilizado)
- Historial de vacunaciones en la explotación.

### Medidas para disminuir las reacciones inespecíficas ELISA gE:

- i) debe implementarse una validación de cada lote de prueba analítica, y en el momento de su comercialización.
- ii) las muestras deben guardarse a 4°C y no deben analizarse antes de las 24–48 horas tras la recogida;
- iii) las muestras deben someterse a un ciclo de congelación-descongelación (–20°C); en algunos casos, una posterior inactivación térmica (30 minutos/56°C) puede eliminar reacciones inespecíficas en las muestras de suero;
- iv) en el ganado bovino no deben realizarse pruebas serológicas para detectar el HVBo-1 antes de que pasen 4 semanas tras cualquier vacunación;
- v) no debe utilizarse gE-ELISA para clasificar animales no vacunados (OMSA).

Test diagnóstico	ANIMAL INFECTADO	ANIMAL VACUNADO	
		VACUNA NORMAL	VACUNA MARCADA
SERONEUTRALIZACION	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
ELISA AC totales	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
ELISA Anti gE	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO

Guía para interpretación más común de los resultados de los test laboratoriales: se entiende que los animales vacunados están libres de la enfermedad. Debemos recordar que existen falsos positivos y falsos negativos, tanto por las limitaciones de la técnica como por las características del virus.

## ACTIVIDADES DEL LNR



ESTATUS	Lab. oficial	LNR		
VACUNADO	ELISA gE (secuencial x2) ... si POS, se envía a confirmar al LNR	Confirmación ELISA gE + ELISA gB (1X)	... si POS gE y gB ... el animal podría estar infectado, además de vacunado. Como no hay más pruebas de confirmación, se considera una <b>serología POS</b> .	
			... si POS gE y Neg gB ... el animal no estaría vacunado, pero tampoco infectado, por lo que consideramos que puede ser un resultado <b>FP en ELISAs gE</b>	
NO VACUNADO	ELISA gB (secuencial x2) ... si POS, se envía a confirmar al LNR	Confirmación ELISA gB + ELISA gE (2X)	... si POS gB y gE ... se considera una <b>serología POS</b>	
			... si POS gB y Neg gE ... se considera que podría ser un infectado o FP en ELISA gB, por lo que se realizaría la <b>prueba de SNT</b>	... si SNT POS ... se considera <b>serología POS</b>
				... si SNT Neg ... se considera <b>FP en ELISAs gB o reacción cruzada con otro HvBo.</b>

En caso de **serología POS**, habría que remuestrear el animal y convivientes pasados 15 días y enviar al LNR tanto la primera como la segunda sangría de todos los animales (positivo y convivientes) para valorar seroconversiones y/o tomar muestras para detección del agente.

# ACTIVIDADES COMO LNR – desde 2019



Reuniones con los laboratorios oficiales de sanidad animal:

- 2020 → Especial IBR
- 2023 → Actualización

## ACTIVIDADES DEL LNR



CONTROL DE  
REACTIVOS DE  
DIAGNÓSTICO

### Kits ELISA registrados en España

Titular	Fabricante	Denominación	Nº Registro
HIPRA	HIPRA	CIVTEST BOVIS IBRgB	2338-RD
HIPRA	HIPRA	CIVTEST BOVIS IBR gE	2339-RD
IDvet Biológicos, S.L.	Innovative Diagnostics, Sarl	ID Screen® IBR gB Competition	2667-RD
IDvet Biológicos, S.L.	Innovative Diagnostics, Sarl	ID SCREEN IBR gE COMPETITION	2707-RD
IDvet Biológicos, S.L.	Innovate Diagnostics, Sarl	ID SCREEN IBR Milk Indirect	11135-RD
WERFEN ESPAÑA	QIAGEN	CATTLETYPE BHV1 gB Ab	3194-RD
IDEXX LABORATORIOS	IDEXX LABS, INC (USA)	IDEXX IBR gE	0689-RD
IDEXX LABORATORIOS	IDEXX LABS, INC (USA)	IBR POOL	2666-RD
IDEXX LABORATORIOS	IDEXX Switzerland GmbH	IDEXX IBR Tank Milk	11396-RD
IDEXX LABORATORIOS		TRACHITEST SERUM SCREENING	3013-RD
INGENASA, S.A.	INGENASA	INGEZIM IBR COMPAC 2.0	0962-RD
INGENASA	INGENASA	INGEZIM IBR gE	3467-RD
ZOETIS	DELPHARM Biotech	SERELISA BHV-1 gB Ab MONO BLOCKING	0882-RD
IDEXX LABORATORIOS	IDEXX	IDEXX IBR gB X3	0688-RD
ZOETIS	SYNBIOTICS	SERELISA BHV-1 TOTAL Ab MONO INDIRECT	0883-RD
INGENASA	INGENASA	INGEZIM IBR 2.0	0526-RD
WERFEN ESPAÑA, S.A.U.	INDICAL BIOSCIENCE GmbH	cattletype BHV1 gE Ab	10059-RD
HIPRA	HIPRA	CIVTEST BOVIS IBR	0337 RD
IDEXX LABORATORIOS	IDEXX Montpellier SAS	IDEXX IBR INDIVIDUAL	3477-RD
IDEXX LABORATORIOS	IDEXX Switzerland AG	IDEXX BHV-1 BULB MILK	3019-RD
IDvet Biológicos, S.L.	Innovative Diagnostics Sarl	ID SCREEN IBR INDIRECT (ES)	10923-RD

Control de Lotes



CONTROL DE REACTIVOS DE DIAGNÓSTICO

## PROBLEMA FALSOS POSITIVOS ELISA gE INGENASA

2021

Algunos laboratorios y SSVV oficiales nos comunican un **elevado número de positivos/dudosos empleando el kit ELISA gE de INGENASA** (adquirido por el MAPA para la ejecución del Programa), que no se confirman con un kit ELISA gE alternativo



Se trabaja con la compañía INGENASA para tratar de mejorar el kit

Se emite la NI-LCV-20 el 16.09.21 (doble análisis ELISA gE en serie) para garantizar la especificidad

## PROBLEMA FALSOS POSITIVOS ELISA gE INGENASA



Se trabaja con la compañía INGENASA para tratar de mejorar el kit

PUNTO DE CORTE ANTIGUO					
INGENASA					
		POS/Dud	Neg		
IDEXX	POS/Dud	55	0	55	100%
	Neg	15	23	38	61%
		70	23	93	

PUNTO DE CORTE NUEVO					
INGENASA					
		POS	Neg		
IDEXX	POS/Dud	54	1	55	98%
	Neg	9	29	38	76%
		63	30	93	

17/12/2021 → modificación del punto de corte (55%) y eliminación del rango de Dudosos

24/06/2022 → INGENASA modifica el diluyente del kit (lote 220056)

## PROBLEMA FALSOS POSITIVOS ELISA gE INGENASA

Se emite la NI-LCV-20 el 16.09.21 (doble análisis ELISA gE en serie) para garantizar la especificidad

Ha resultado una buena medida para garantizar la especificidad en el diagnóstico serológico de IBR en animales vacunados

**Problema:** mayor consumo de kits de ELISA y más trabajo para el personal de los laboratorios

Teniendo en cuenta las modificaciones en el kit de INGENASA ...

Los datos muestran un 85% de muestras que se confirman POS con el segundo kit.

**SSVV y laboratorios debemos valorar la conveniencia del doble análisis en serie**

## Conclusiones

- IBR es una enfermedad de **control oficial en la UE (categoría C)**. Algunos países de la UE ya la han erradicado y otros tienen un programa aprobado por la UE.
- Aunque no existe un EU-LR, **en España en 2019 el LCV fue nombrado LNR** y trabaja en actividades para la armonización del diagnóstico, siguiendo las pautas establecidas por la OMSA.
- Las **técnicas serológicas resultan fundamentales** debido a la existencia de infecciones subclínicas, especialmente en animales con infecciones latentes.
- Las técnicas de identificación del agente, especialmente la **PCR**, se utilizan **exclusivamente para confirmación de casos clínicos**.
- La **detección de infecciones latentes** (por técnicas serológicas) y su eliminación es fundamental para el control y la erradicación.
- La **correcta elección de las técnicas de diagnóstico**, en función del estatus vacunal, y la **interpretación de los resultados de laboratorio con datos epidemiológicos** resulta fundamental para una correcta vigilancia.



MUCHAS GRACIAS



## AGRADECIMIENTOS

Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo.  
Agencia Gallega de la Calidad Alimentaria. Consellería del Medio Rural  
Rubén Villalba Martínez y Departamentos de Virología 1 y DM