

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEÓN
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO
EN MEDICINA VETERINARIA.**

Tema:

**Determinación de terneros de 3 a 12 meses de edad permanentemente infectados
(PI) con el Virus de la Diarrea Vírica Bovina (vDVB) en el municipio de León,
Noviembre del 2010.**

Autores:

**Br. Carlos Antonio Hernández Castro
Br. Elías Heriberto Henríquez Cáceres**

Tutor:

Dr. Migdonio Quintanilla Darce.

León, Noviembre del 2010

¡A la libertad por la Universidad!



ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
III. ANTECEDENTES.....	4
IV. JUSTIFICACIÓN.....	6
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
VI. OBJETIVO GENERAL.....	8
VII.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
VIII. MARCO TEÓRICO.....	9
IX. DISEÑO METODOLÓGICO.....	41
X. RESULTADOS.....	46
XI. DISCUCIÓN.....	48
XII.CONCLUSIONES.....	49
XIII. RECOMENDACIONES.....	50
XIV. BIBLIOGRAFÍA.....	51
XV.ANEXOS.....	71



RESUMEN

La diarrea viral bovina (DVB) es una enfermedad de distribución mundial y endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas, con importantes repercusiones reproductivas y productivas que afectan no sólo la sostenibilidad del hato, sino también la salud pública. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia en terneros permanentemente infectados (PI) de 3 a 12 meses de edad con el Virus de la Diarrea Vírica Bovina (vDVB) en el municipio de León, durante el periodo de Noviembre del 2010. Se recolectaron 122 muestras en 8 fincas y se extrajeron 10 ml de sangre por venopunción de la yugular. Las muestras fueron procesadas utilizando un kit de ELISA (HERDCHEK* BVDV) para la detección de anticuerpos frente al virus de Diarrea Viral Bovina y otro kit de la misma casa comercial para captura de antígeno viral. El análisis se realizó según los procedimientos prescritos en el kit. Las 8 fincas muestreadas tuvieron animales reactivos al vDVB, resultando una seroprevalencia de Diarrea Viral Bovina fue de 46.72% (57/122) a nivel global. De los resultados negativos obtenidos por la prueba, se les realizó captura de antígeno, no obteniendo ningún positivo. En conclusión, a pesar de que se encontraron anticuerpos específicos frente al vDVB, ningún ternero dio positivo a la prueba para captura de antígeno, lo que parece indicar una evidente exposición de los animales al virus de campo.

Palabras claves: Prevalencia, vDVB, ELISA de captura de antígeno, ELISA de captura de anticuerpo.



I. INTRODUCCIÓN.

La diarrea viral bovina (DVB) es una enfermedad de distribución mundial y endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas.⁶² Es causada por el virus de la diarrea viral bovina (vDVB), antigénicamente relacionado a los virus de la Peste Porcina Clásica (PPC) y Enfermedad de la Frontera (VEF), donde los tres agentes pertenecen al género pestivirus, familia Flaviviridae.¹³⁷

El vDVB posee un biotipo citopatogénico (CP) y otro no citopatogénico (NCP) según su efecto en cultivo celular, pero ambos biotipos ocasionan la misma enfermedad con amplio rango de manifestaciones clínicas, predominando la forma subclínica en el 70-90% de los casos.⁵

La forma aguda se caracteriza por ser leve, pero el animal puede presentar fiebres moderadas, leucopenia, lesiones discretas en la mucosa oronasal y una mayor susceptibilidad a infecciones secundarias. El efecto del virus en el tracto reproductivo tiene impacto económico ya que puede inducir infertilidad temporal, muerte embrionaria, abortos, malformaciones congénitas, y nacidos débiles o con infección persistente, dependiendo del periodo de la gestación, del biotipo y virulencia de la cepa infectante.⁹²

El diagnóstico se basa únicamente en el aislamiento del virus con Inmuno Fluorescencia o detección del antígeno viral específico con pruebas ELISA. Las pruebas serológicas son la mejor alternativa para la detección del virus en las poblaciones bovinas. Dentro de las más importantes se encuentran: Inmunodifusión en agar gel (AGID)²⁶ Neutralización Viral (NV) y Ensayo Inmunoenzimático (ELISA).⁷⁹

También debido a que las infecciones por el vDVB pueden ser inaparentes o tener un desenlace fatal, esto aunado al desconocimiento de esta patología en el país, hace que no sea posible implementar medidas para controlar la diseminación de este agente y



así reducir de forma significativa el impacto que este agente ejerce sobre la reproducción y productividad.

Este estudio se realizó en terneros de 3 a 12 meses de edad en ocho fincas del municipio de León, con un total de 122 muestras con las que se pretende determinar la presencia de terneros persistentemente infectados (PI) con vDVB.



II. ANTECEDENTES.

La DVB fue descrita por primera vez en 1946 como una enfermedad aguda, epizootica, caracterizada por gastroenteritis aguda, lesiones erosivas del tracto digestivo y mortalidad alrededor de 4-8 %. En 1953, Ramsay y Chivers ¹¹² describieron una enfermedad esporádica con diarrea intensa y profusa, emaciación, lesiones ulcerativas del tracto gastrointestinal y con una morbilidad entre 5-20% y una mortalidad del 100 %, lo cual se denominó Enfermedad de las mucosas (EM). Posteriormente, se dedujo que la BVD y la EM eran dos entidades de diferente presentación ocasionadas por el mismo virus.

La naturaleza insidiosa de la DVB ha llevado a pérdidas económicas sustanciales a la industria lechera y de carne, ya que la infección por VDVB se encuentra ampliamente distribuida a través del mundo. El grado de difusión y prevalencia tiende a variar entre regiones y países, ella tiende a ser endémica en la mayoría de los países con población bovina importante, de modo que el 60 a 80% del ganado presenta anticuerpos frente al agente y entre el 1 al 2% esta persistentemente infectado. ⁷⁹

En Argentina los datos de seroprevalencia son variables. Según Lértora 2003, informan que la situación en este país es similar a la del resto del mundo, con 70% de seroprevalencia y una prevalencia en bovinos PI del 1%. Además se reportan seroprevalencia de 90,7% y 48,6% en bovinos adultos en el sudeste de la provincia de Buenos Aires y en llanos de la rioja, respectivamente. El porcentaje de bovinos seropositivos de 6 a 12 meses de edad fue de 41,9%.

En un estudio de seroprevalencia del vDVB en bovinos criollos de la provincia de Melgar, Perú; Puno, 2008,¹¹⁴ se obtuvieron muestras de sangre de bovinos (n=347) machos y hembras mayores de 6 meses de edad para la detección de anticuerpos neutralizantes mediante la prueba de neutralización viral. El $48.7 \pm 0.1\%$ (166/347)



presentó anticuerpos contra el vDVB. No se detectaron animales PI. Los anticuerpos fueron detectados en animales de todos los distritos con prevalencia entre 15.7 a 94.1%. Los títulos de anticuerpos estuvieron en un rango de 2 a 256, indicando que el vDVB está ampliamente difundido en bovinos de la zona.

En Nicaragua, en el departamento de León en el año 2009, se encontró una seroprevalencia del 21.2%, lo que representa a 60 Bovinos positivos al test de ELISA para la detección de anticuerpos frente al vDVB; resultando como mayor porcentaje de machos positivos en el municipio de Malpaisillo con un 50%(1/2), seguido del municipio de León con un 17.1%(6/35). Con referencia al porcentaje de hembras positivas de igual manera el más alto se encuentra en el municipio de Malpaisillo con 50% (4/8) seguido del municipio de León con 24.5%(48/196).⁶¹



III. JUSTIFICACIÓN

La DVB constituye un problema en el hato bovino, por ser este uno de los ejes de la economía nacional. Los efectos de la enfermedad ratifican la importancia de mantener controles sanitarios permanentes, buscando la forma de que sean asumidas las decisiones pertinentes en el destino de los bovinos positivos, a fin de poder controlarla, minimizando sus efectos en la población de vacunos de carne y leche, y su posibilidad de convertirse en fuentes de infección dentro y fuera de las fincas.

Los animales susceptibles a la enfermedad o positivos a la prueba de Detección de antígenos y/o anticuerpos mediante enzimo–inmunoensayo (ELISA) no tienen tratamiento, razón por la cual es necesario un diagnóstico certero a fin de disminuir y controlar la enfermedad.

Por este motivo, es necesario realizar este estudio en lugares donde esté latente la aparición de la enfermedad, como lo es el departamento del León; con la intención de determinar la seroprevalencia de bovinos con el pestivirus, y esto último, con la intención de intervenir en el manejo a fin de disminuir su incidencia.



IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Cuál es la prevalencia de terneros permanentemente infectados (PI) de 3 a 12 meses de edad con el Virus de la Diarrea Vírica Bovina (vDVB) en el municipio de León durante el periodo de Noviembre del 2010?



V. OBJETIVOS

Objetivo General:

- ☞ Determinar la prevalencia en terneros permanentemente infectados (PI) de 3 a 12 meses de edad con el Virus de la Diarrea Vírica Bovina (vDVB) en el municipio de León, durante el periodo de Noviembre del 2010.

Objetivos Específicos:

- ☞ Detectar anticuerpos específicos frente al virus de vDVB en muestras de suero en terneros de 3 a 12 meses de edad utilizando ELISA indirecto.
- ☞ Identificar antígenos de vDVB en muestras de suero de terneros de 3 a 12 meses de edad negativos a la prueba de anticuerpos, empleando ELISA de captura de antígenos.
- ☞ Contrastar los resultados obtenidos en ambos análisis.



VI. MARCO TEÓRICO

Concepto:

El virus de la diarrea viral bovina (vDVB), es el agente causal del complejo diarrea viral bovina (DVB)/enfermedad de las mucosas (EM), es responsable de la ocurrencia de diferentes cuadros clínicos, de variable intensidad y gravedad²⁷. El carácter inmunodepresor del virus predispone al animal a otras enfermedades causadas por agentes comensales y/o patógenos secundarios oportunistas.³⁵ La diarrea viral bovina es una enfermedad de distribución mundial y endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas. Es responsable de ocasionar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones, siendo los trastornos reproductivos los de mayor impacto económico. Las estrategias de erradicación dependen de la situación epidemiológica regional; básicamente consisten en la identificación y eliminación de bovinos persistentemente infectados, principal fuente de infección y reservorio del virus.⁷⁸

Historia y diversidad del vDVB

Este virus fue reconocido por primera vez en los Estados Unidos por Olafson en 1946, al detectar en hatos un síndrome agudo caracterizado por fiebre, diarrea, anorexia y tos.³ Ramsay y Chivers en 1953, describieron una enfermedad esporádica caracterizada por diarrea profusa, emaciación, ulceraciones en la mucosa del tracto alimenticio y una mortalidad del 100%. Luego, se determinó que el mismo virus era el responsable de los dos síndromes.³ A finales de los 60's se describieron dos biotipos del virus: el citopático (cp) y el no citopático (ncp), caracterizados por su habilidad para causar efecto citopático y muerte celular en cultivos celulares in vitro. El biotipo cp induce destrucción masiva celular mediante la formación de vacuolas citoplasmáticas llevando a la muerte de las células pocos días después de la infección, a diferencia del biotipo ncp que no induce ningún efecto aparente en cultivo¹⁰.



Los avances en secuenciación genética a finales de los ochenta permitieron establecer dos genotipos: el 1 y 2, caracterizados por diferencias en la región 5' UTR (del inglés *untranslated region* que significa *regiones no traducidas de los genes*) y en la región que codifica para la proteína E2 principalmente. El genotipo 2, el cual surgió en Norte América y Canadá se correlaciona con sintomatología hemorrágica y alta mortalidad ¹¹⁹. De esta manera, en la naturaleza existen 2 biotipos y 2 genotipos. Adicionalmente, cada genotipo presenta subgenotipos los cuales muestran una homología entre sí del 80 al 85%. En la actualidad se han reportado en la literatura 11 subgenotipos de vDVB tipo 1 (a-j) y 2 subgenotipos del vDVB- 2 (a y b). ¹¹⁶.

En Colombia, los primeros reportes de la enfermedad datan de 1975, tras el ingreso de terneros enfermos importados desde Holanda. Los hallazgos a la necropsia y las pruebas serológicas de estos animales mostraron como diagnóstico la presencia de la “Enfermedad de las Mucosas (EM). ¹⁵ Se han realizado diferentes estudios en ese país, que comprueban su presencia. Entre estos están el estudio de Mogollón et al. (1990), donde se reporta por primera vez en el país un caso de EM, con aislamiento e identificación de los dos biotipos: ncp y cp. ¹³³ En 1994, se reportó una seropositividad del 89% al vDVB en 101 animales en fincas de la Sabana de Bogotá mediante la seroneutralización viral y se identificaron coinfecciones con otras entidades como IBR (*Infectious Bovine Rhinotracheitis* o *Rinotraqueitis Infecciosa Bovina*), Leucosis y Leptospira. ¹⁰³ Para la fecha se desconoce completamente si hay presencia del genotipo 2 en el país, pero este se ha aislado en Argentina y Brasil . ⁴³

Etiología

Taxonomía y estructura.

El vDVB es un miembro del género pestivirus de la familia Flaviviridae, junto con los virus de la peste porcina clásica y la enfermedad de las fronteras en las ovejas. ⁹⁸ (Ver Anexos Fig. 1). El vDVB presenta forma esférica con un diámetro entre 40 a 60nm y



está constituido por una cápside icosaédrica, rodeado de una envoltura lipoproteica proveniente de la membrana celular.⁹⁴

Variabilidad

La principal característica de este virus es su variabilidad genética y antigénica.²³ La característica principal de un virus ARN es su plasticidad y ésta se debe a la falta de una exonucleasa eficiente para corregir las bases mal incorporadas, ocasionando una sustitución de base de alta frecuencia (1 error por cada 10.000 nucleótidos polimerizados). El vDVB usa esta estrategia para sobrevivir, originando cepas mutantes que escapan a la respuesta inmunológica del hospedador.³¹ El cruce de especies crea otra oportunidad para la diversificación, ya sea por adaptación al nuevo hospedador o por evolución divergente.

El genoma del vDVB es un ARN de polaridad positiva de 12.5 Kb, posee sólo un marco abierto de lectura (ORF) y en cada uno de sus extremos presenta regiones sin traducir o UTR (Untranslated región). El extremo 5' UTR presenta una secuencia de nucleótidos que imita la estructura CAP, de los ARNm con función de sitio de entrada ribosomal interno (IRES) que media la transducción de la poliproteína viral.⁶⁰

El ORF codifica para una poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos, la cual es posteriormente cortada por enzimas virales y celulares (endoproteasas) en los diferentes polipéptidos (proteínas estructurales y no estructurales)¹ (Ver Anexos Fig. 2).

Entre las proteínas estructurales más importantes se encuentra la glicoproteína (gp) E2, anticuerpos neutralizantes generados posterior a una que posee los epítomos que inducen la producción de infección y a la vacunación.⁸³

Otra posible causa para la variabilidad es la oportunidad para la mutación que ofrecen los prolongados períodos de replicación en animales persistentemente infectados. Sin



embargo, esta última posibilidad no parece suceder con el vDVB.¹⁰⁷ Bolin y Ridpath (1992)¹³ demostraron que nuevas variantes antigénicas se originan durante el pasaje del virus en bovinos susceptibles que desarrollan una infección aguda. Esto sugiere que, mientras los animales persistentemente infectados son más importantes como reservorios, los animales con infección aguda pueden ser más importantes para la generación de nuevas variantes antigénicas.¹⁰⁷ Las consecuencias de esta diversidad se reflejan en el espectro de manifestaciones clínicas y lesiones, dificultando además, su diagnóstico y limitando el espectro de protección brindada por el empleo de vacunas monovalentes.¹¹³

Clasificación.

Según sus efectos en los cultivos celulares, los Pestivirus se dividen en biotipos citopáticos (CP) y no citopáticos (NCP). Los virus CP ocasionan vacuolización y muerte celular, los virus NCP no ocasionan cambios visibles en el cultivo celular y la célula infectada parece normal. Esto no implica que los biotipos NCP sean no patógenos. Por el contrario, es el biotipo predominante en la naturaleza, aislado de la mayoría de las formas clínicas y el único capaz de originar infección persistente.²⁹ El biotipo CP se aísla únicamente de animales con enfermedad de las mucosas y se originan por mutación a partir del biotipo NCP; ya sea por depleción de fragmentos del genoma viral, inserción de fragmentos de ARN celular o duplicación y reordenamiento del ARN viral.

95

Hay considerables variaciones en la virulencia de las distintas cepas aisladas del vDVB, las infecciones pueden ser inaparentes o tener un desenlace fatal. Sin embargo, no se han identificado marcadores de virulencia que permitan un sistema de clasificación de las cepas de campo en base a su patogenicidad.¹⁰⁵ También, han sido infructuosos los intentos de correlacionar los signos clínicos con la agrupación filogenética de las distintas cepas aisladas.¹³⁴



No se ha podido establecer una serotipificación del vDVB. Estudios de neutralización cruzada entre distintos virus DVB demuestran que pertenecen a un grupo serológicamente relacionado, dentro del cual hay un espectro antigénico con reacción cruzada, sin suficientes diferencias antigénicas para clasificarlos en serotipos.⁹⁹ El empleo de anticuerpos monoclonales discernen diferencias antigénicas sutiles y permiten clasificar a los Pestivirus en 4 grupos: virus de la peste porcina clásica, virus de la enfermedad de la frontera del ovino, Genotipo 1 y Genotipo 2 del vDVB. Sin embargo, algunos virus aislados de jirafas, ciervos, ovinos y bovinos no han podido ser tipificados satisfactoriamente; ellos pueden representar variantes de algunos de los 4 grupos principales o ser grupos adicionales.¹⁰⁶

La genotipificación es el método aceptado para clasificar a los Pestivirus. Bajo este sistema de clasificación el vDVB se agrupa en 2 genotipos: Genotipo 1 y Genotipo 2 del virus de la diarrea viral bovina.¹¹⁵ El genotipo I del vDVB puede ser dividido en al menos 11 genogrupos y es muy probable que nuevos genogrupos sean revelados en futuros análisis.¹³⁴

Epidemiología

Prevalencia de la infección.

Esta enfermedad tiene una distribución mundial y la infección tiende a ser endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas. La mayoría de las encuestas en los diferentes países alcanza niveles de 0,5 a 2% de bovinos persistentemente infectados (PI) y 60 a 80% de bovinos seropositivos.⁶⁵

Hospedador.

Los Pestivirus infectan naturalmente sólo a los ungulados del Orden Artiodáctila. Los Pestivirus rumiantes infectan a porcinos, bovinos, ovinos, caprinos, alpacas, llamas,



camellos, búfalos de agua y rumiantes silvestres. Estas consideraciones deben tomarse en cuenta a la hora de implementar un programa de control, ya que los Pestivirus cruzan la barrera de especie.⁹⁹

Fuente de infección.

La principal fuente de infección y reservorio del virus en la naturaleza son los bovinos PI. Ellos eliminan continuamente durante toda su vida grandes cantidades del virus en secreción nasal, saliva, orina, materia fecal, lágrimas, semen y leche. Los animales con infección aguda también son fuente de infección; aunque menos eficiente, ya que eliminan el virus en cantidades más bajas y por cortos períodos.⁶³

Modos de transmisión.

La transmisión puede ser vertical u horizontal, por contacto directo o indirecto

Transmisión vertical.

La infección transplacentaria ocurre en hembras susceptibles infectadas durante la preñez. Si el feto es infectado por biotipos NCP antes de adquirir competencia inmunológica (antes del día 125 de gestación, aproximadamente) desarrollará una infección persistente.⁹⁷ Pese a la elevada tasa de mortalidad de los animales PI en su primer año de vida (más de 50%), muchos alcanzan la madurez sexual y se reproducen.³ Hembras PI siempre dan terneros PI. La transmisión vertical también ocurre luego de la transferencia embrionaria si la receptora es PI, o la vaca donante es PI y no se realiza el correcto lavado del embrión.⁶⁴



Transmisión horizontal.

El contacto directo con animales PI, especialmente contacto nariz–nariz, es el modo más eficiente de transmisión en condiciones naturales.⁶³ El contacto directo con animales que cursan una infección aguda también puede transmitir el virus.⁶⁴

Se ha demostrado experimentalmente la transmisión por vía aérea a corta distancia entre bovinos persistentemente infectados a bovinos centinelas. Aunque la transmisión aerógena no es la principal ruta de transmisión, puede tener consecuencias graves cuando cepas de alta virulencia afectan a poblaciones susceptibles y con alta densidad animal.⁸⁹

El semen fresco o criopreservado de toros PI o con infección aguda es una importante vía de transmisión horizontal. Para evitar el uso de estos animales, en los centros de inseminación se debe recurrir al aislamiento viral y a un período de cuarentena que supere la fase aguda de la infección. Sin embargo, un toro con infección aguda puede escapar al aislamiento viral en sangre, superar el período de cuarentena y seguir siendo una amenaza. El virus puede eliminarse en semen por un corto período más allá del último día de viremia y se han detectado toros fuertemente seropositivos no virémicos que eliminan persistentemente el virus por semen.⁴⁶

Esta última situación se presenta cuando la infección ocurre en la pubertad, durante la formación de la barrera inmunológica hematotesticular, permitiendo al virus replicarse dentro del testículo y evadir la respuesta inmune. Por lo tanto, es esencial un examen del eyaculado antes que el semen sea distribuido.⁴⁶

También es posible la transmisión por transferencia embrionaria. La mayoría de las células del tracto reproductivo de la hembra son permisibles al virus; además, los cultivos celulares y el suero fetal bovino utilizados en transferencia embrionaria pueden estar contaminados. Los embriones producidos in vivo, con zona pelúcida intacta,



recolectados de vacas naturales o artificialmente infectadas, no actuarían como vectores para la transmisión de la enfermedad si se cumple con los procedimientos de lavado o lavado y tratamiento con tripsina recomendados por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria.¹²⁹ Sin embargo, la presencia de una zona pelúcida intacta y los procedimientos de lavado, no garantizan que los embriones estén libres del virus, ya que pueden desarrollarse de oocitos infectados. Se ha demostrado que los oocitos soportan la replicación del vDVB, pudiendo ingresar al oocito en forma directa o a través de las células del cumulus, las cuales son susceptibles al virus y están en estrecho contacto con el oocito por medio de procesos citoplasmáticos.

Pese a que no se ha demostrado si estos oocitos infectados son capaces de desarrollarse hasta la ovulación, no debe descartarse el potencial de las células germinales para transmitir al vDVB.⁴⁷ Los embriones producidos in vitro son una fuente potencial de introducción del vDVB. La zona pelúcida de embriones producidos in vitro presentan alteraciones estructurales y bioquímicas permitiendo al virus penetrar hasta aproximadamente 50% de su espesor, de manera que los procedimientos de lavado y tratamiento con tripsina no eliminan el virus. Sin embargo, no se ha determinado si la cantidad de virus asociado a estos embriones podría constituir una dosis infectiva para receptoras susceptibles vía intrauterina.¹²⁹

Experimentalmente se han demostrado varias vías de transmisión indirecta como el uso de agujas, moqueta, palpación rectal y la acción de insectos hematófagos, minutos después de haber estado en contacto con animales PI. Sin embargo, su importancia práctica aún no está aclarada ya que es un virus que se inactiva fácilmente. Es rápidamente inactivado por el calor, desecación, luz ultravioleta, detergente, solventes orgánicos y pH que exceda el rango de 5,7 a 9,3.¹³¹

Otro modo importante de transmisión es el uso de vacunas a partir de virus vivo modificado o vacunas contaminadas.⁶⁴



Transmisión entre rebaños.

La principal forma de introducir el virus a un rebaño susceptible es a través de la adquisición de bovinos PI o hembras que transportan fetos PI. Otras vías de introducción son: el uso de vacunas vivas, semen contaminado, cohabitación con ovinos, transferencia embrionaria y el contacto con bovinos con infección aguda.⁶⁴

Transmisión dentro del rebaño.

La tasa de transmisión dentro del rebaño depende de la forma de introducción del virus al mismo. Cuando un animal PI es introducido a un rebaño, la transmisión a animales susceptibles ocurre rápidamente a la mayoría de los animales del rebaño. Por el contrario, cuando la infección se inicia por un bovino con infección aguda o por alguna otra vía que inicie una infección aguda, la transmisión es de corta duración y solo incluye un pequeño porcentaje del rebaño antes que la transmisión cese. El sistema de producción y la virulencia de la cepa también participan en la tasa de transmisión. La diseminación es más eficiente en sistemas de producción que permiten un estrecho contacto entre animales y con cepas virulentas.⁶⁴

Patogenia

El vDVB es responsable de originar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones como resultado de la interacción de factores tales como: cepa y biotipo viral, edad y estado inmune del hospedador, respuesta inmune inducida, factores estresantes y otros patógenos concurrentes.⁹



Diarrea Viral Bovina aguda.

Es una infección post natal aguda, de severidad variable, en bovinos seronegativos e inmunocompetentes. ⁴

Infección subclínica.

La mayoría de las infecciones son subclínicas o de carácter moderado, con fiebre, descarga oculonasal, leucopenia transitoria, elevada morbilidad y baja mortalidad. ⁴

Se desarrollan anticuerpos neutralizantes 14 a 28 días postinfección y consecuentemente la protección contra reinfecciones por cepas homólogas del virus es de por vida. ⁴⁸

Complejo diarrea neonatal bovina.

Cuando fracasa la transferencia pasiva de anticuerpos, el virus participa en el complejo diarrea neonatal de los terneros. Infecciones concurrentes con enteropatógenos resultan en manifestaciones clínicas más severas, debido al efecto inmunodepresivo del vDVB o simplemente a una sumatoria de efectos. ³⁰

Infección aguda severa.

Inicialmente se prestaba poco interés a las infecciones agudas, dada su baja mortalidad. Sin embargo, cada vez son más frecuentes los informes de infección aguda severa de elevada morbilidad y mortalidad, asociada con virus de alta patogenicidad, caracterizada por fiebre elevada, signos respiratorios, diarrea, abortos, caída en la producción de leche y muerte súbita. ³⁴

En otros casos, la exposición a cepas de alta virulencia ocasiona una enfermedad con signos clínicos y lesiones anatomopatológicas similares a la forma enfermedad mucosa.



Síndrome hemorrágico.

Virus del genotipo 2 del vDVB se asocian a una condición fatal denominada síndrome hemorrágico. Se caracteriza por mucosas anémicas con hemorragias petequiales y equimóticas, hipertermia, hemorragia en múltiples sistemas orgánicos, diarrea sanguinolenta, epistaxis, sangrado constante en los sitios de inyección, anemia, leucopenia, trombocitopenia y muerte.¹⁴

Esta sintomatología se atribuye a trombocitopenia y alteración de la función plaquetaria. Se ha demostrado una disminución de la respuesta de las plaquetas a la agregación y, aunque se desconoce el mecanismo de estas alteraciones, es probable que el virus actúe por uno o más de estos mecanismos: 1) se ha detectado antígeno viral en los megacariocitos, lo que podría resultar en una menor producción de plaquetas y en un incremento en el porcentaje de plaquetas envejecidas (los trombocitos viejos son menos sensibles a los estímulos de agregación); 2) el virus se aísla de trombocitos y una interacción virus–plaqueta directa puede afectar la respuesta plaquetaria a la agregación; 3) aumento en la producción de sustancias inhibitoras de la agregación plaquetaria; bovinos infectados con el vDVB presentan altas concentraciones de prostaglandina E y óxido nítrico.¹³⁶

Hay una fuerte correlación entre la fase trombocitopénica y la viremia; además, la recuperación del recuento plaquetario está estrechamente relacionada con la aparición de anticuerpos neutralizantes. Esto sugiere que este síndrome es el resultado de una alteración y consumo de los trombocitos periféricos, más que una alteración en su producción.⁵⁷



Inmunodepresión.

El vDVB ocasiona leucopenia y altera las funciones de los leucocitos, aumentando la patogenicidad de microorganismos coinfectantes. Tiene una fuerte afinidad por el tejido linforreticular, ocasionando necrosis y atrofia de dichos tejidos.³

En el tejido linfoide el virus se localiza principalmente en las células del estroma, incluyendo macrófagos y células de soporte. Estas células elaboran citoquinas esenciales para el normal desarrollo y maduración de linfocitos, lo que sugiere que la necrosis linfoide es secundaria al trastorno del microambiente que proveen las células intersticiales y no a la acción directa del virus sobre los linfocitos.¹⁹

Enfermedades respiratorias.

El vDVB origina inmunodepresión sistémica y pulmonar, aumentando la patogenicidad de los restantes agentes respiratorios.²⁰

Además, se ha demostrado que ciertos virus de la diarrea viral bovina actúan como agentes primarios de neumonías.⁷

Trastornos reproductivos.

El mayor impacto económico de la infección con el vDVB es el ocasionado por los trastornos reproductivos.³⁶

Los efectos de la infección antes y durante la gestación se discuten en orden cronológico.

La infección aguda altera la función ovárica y reduce la fertilidad. El vDVB causa ooforitis intersticial no purulenta, con necrosis de células de la granulosa y de oocitos.⁹¹



Es posible detectar el antígeno viral en los macrófagos y células del estroma ovárico, entre los días 6 a 60 post infección⁵⁵ y en células foliculares y oocitos en distintos estados de maduración⁴⁷. Además, las infecciones agudas ocasionan un retraso en el desarrollo de los folículos pre-ovulatorios durante dos ciclos estrales consecutivos⁵⁴ reducción de los niveles de estradiol durante la fase folicular⁴⁴ y disminución o ausencia de las oleadas de hormona luteinizante pre-ovulatoria o retraso en el tiempo del pico de hormona luteinizante pre-ovulatoria⁹⁰.

No está claro de qué manera el vDVB altera la función ovárica, aunque es posible que actúe por uno o más de los siguientes mecanismos: inadecuado soporte gonadotrófico por infección de la glándula pituitaria⁴⁵, la leucopenia que acompaña a la infección aguda puede ser el reflejo de una deficiencia en la población de leucocitos ováricos, células vitales para la dinámica folicular normal⁴⁵, y la necrosis de las células de la granulosa de los folículos pre-ovulatorios, afecta negativamente la secreción de estradiol y, consecuentemente, suprime la liberación de hormona luteinizante y retrasa o impide la ovulación⁹⁰. La disfunción ovárica puede ser el resultado de la ooforitis y de los cambios en la concentración de citoquinas ováricas⁵⁴) 5) la reducción de los niveles de estradiol durante la fase folicular pueden perjudicar el comportamiento estral, impedir la ovulación o reducir el número y calidad de oocitos liberados⁴⁴).

El impacto del vDVB durante la preñez se divide en cuatro períodos, en base a las manifestaciones clínicas de la infección durante estos intervalos de tiempo específicos.

Etapas embrionaria (0–45 días):

Las infecciones de hembras susceptibles próximas al momento del apareamiento ocasiona muerte embrionaria y repeticiones de servicio hasta que desarrollen respuesta inmune⁴⁹. Se desconoce cómo los biotipos NCP afectan al embrión. El virus no tiene efecto sobre el crecimiento y desarrollo de los embriones hasta el día 8–9, momento en que pierden la zona pelúcida y se vuelven susceptibles. El resultado de la infección



puede ser citolítico o no. Ambos terminan en muerte embrionaria, aunque la infección no citolítica también puede causar daño cromosómico, resultando en el desarrollo de malformaciones. Por otra parte, la replicación del virus en células oviductales puede alterar sus funciones biológicas, como la secreción de factores embriotrópicos que soportan el desarrollo embrionario ¹³².

Día 45 a 125 de gestación:

Este período comienza al finalizar la etapa embrionaria y culmina cuando el feto adquiere competencia inmunológica. El momento exacto en que el feto adquiere competencia inmunológica al virus no es claro; se han detectado anticuerpos neutralizantes contra el virus en fetos infectados entre los días 100 y 135 de gestación. La infección con biotipos NCP antes que el feto adquiera competencia inmunológica, resulta en el nacimiento de animales persistentemente infectados e inmunotolerantes. Durante este período también se produce muerte fetal con momificación o aborto meses después y un pequeño porcentaje de teratogénesis ³⁶.

Día 125 a 175 de gestación:

Este período representa el comienzo de la inmunocompetencia fetal y del estado de organogénesis, momento en el cual se presenta un gran porcentaje de alteraciones del desarrollo. También se pueden producir abortos, pero éstos son más frecuentes en las etapas tempranas de gestación. Se pueden observar distintos tipos y grados de malformaciones tales como hipoplasia cerebelar, microencefalia, hipomielogénesis, hidranencefalia, hidrocefalia, atrofia o hipoplasia de timo, cataratas, microftalmia, degeneración de retina, hipoplasia y neuritis del nervio óptico, alopecias, hipotricosis, hipoplasia pulmonar, braquignatismo, artrogriposis, retraso general del crecimiento y deformidades esqueléticas. Posibles explicaciones de estas malformaciones serían el daño celular directo por el virus o la destrucción de las células infectadas por el sistema inmune fetal. Los fetos ovinos infectados con el virus de la enfermedad de la frontera



desarrollan hipotiroidismo y los bajos niveles de hormonas tiroideas afectan la concentración de la enzima 2',3'- nucleótido cíclico-3'-fosfodiesterasa, esencial para la mielinización y el normal desarrollo del sistema esquelético. Se desconoce si el vDVB induce fetopatías por un mecanismo semejante³⁶. La inmunohistoquímica reveló abundante cantidad de antígeno en glándula pituitaria, hipotálamo y tiroides de un ternero infectado in útero con trastornos severos y generalizados de la osteogénesis. Este hallazgo sugiere que el virus altera el metabolismo hormonal fetal originando trastornos del desarrollo esquelético²⁵.

175 días de gestación en adelante:

En esta etapa el feto se encuentra en un período de crecimiento general y es inmunológicamente competente. Las infecciones en este período resultan en el nacimiento de terneros seropositivos normales o débiles; mientras que los abortos son ocasionales³⁶.

Infección persistente.

Un animal persistentemente infectado es aquél en que es posible aislar el virus de la sangre o tejidos en dos ocasiones sucesivas con un intervalo no menor a dos semanas. Estos animales son virémicos durante toda su vida y no producen anticuerpos contra la cepa que les originó inmunotolerancia. La infección persistente debe ser considerada en todo ternero pequeño al nacimiento, con escaso desarrollo y ganancia de peso, débil y con cuadros recurrentes de enfermedad respiratoria y digestiva. Otros son clínicamente normales, siendo indispensable el laboratorio para su diagnóstico⁷⁰.

Enfermedad de las mucosas.

Esta condición solo ocurre en animales PI que sufren sobreinfección con biotipos CP homólogos. En esta forma se aíslan ambos biotipos, que son antigénicamente



similares. El biotipo CP surge de mutaciones del biotipo NCP, aunque no se descartan fuentes externas⁵². Es una forma esporádica, fatal, de curso agudo o crónico y se caracteriza por severa leucopenia, diarrea profusa, erosiones y ulceraciones en el sistema digestivo².

MANIFESTACIONES CLÍNICAS:

Diarrea viral bovina aguda: bovinos inmunocompetentes⁴.

Infección subclínica: fiebre, descarga oculonasal, leucopenia transitoria⁴.

Complejo diarrea neonatal bovina: manifestaciones clínicas más severas, debido al efecto inmunodepresivo del vDVB³⁰.

Infección aguda severa: caracterizada por fiebre elevada, signos respiratorios, diarrea, abortos, caída en la producción de leche y muerte súbita³⁴. En otros casos, la exposición a cepas de alta virulencia ocasiona una enfermedad con signos clínicos y lesiones anatomopatológicas similares a la forma enfermedad mucosa²⁸.

Síndrome hemorrágico: Se caracteriza por mucosas anémicas con hemorragias petequiales y equimóticas, hipertermia, hemorragia en múltiples sistemas orgánicos, diarrea sanguinolenta, epistaxis, sangrado constante en los sitios de inyección, anemia, leucopenia, trombocitopenia y muerte¹⁴. Esta sintomatología se atribuye a trombocitopenia y alteración de la función plaquetaria.

Inmunodepresión: ocasiona leucopenia y altera las funciones de los leucocitos, aumentando la patogenicidad de microorganismos coinfectantes. Tiene una fuerte afinidad por el tejido linforreticular, ocasionando necrosis y atrofia de dichos tejidos³.



Enfermedades respiratorias: origina inmunodepresión sistémica y pulmonar, aumentando la patogenicidad de los restantes agentes respiratorios ²⁰. Además, se ha demostrado que ciertos virus de la diarrea viral bovina actúan como agentes primarios de neumonías ⁷.

Trastornos reproductivos: El mayor impacto económico de la infección con el vDVB es el ocasionado por los trastornos reproductivos ³⁷. Los efectos de la infección antes y durante la gestación se presentan en orden cronológico.

La infección aguda altera la función ovárica y reduce la fertilidad. El vDVB causa ooforitis intersticial no purulenta, con necrosis de células de la granulosa y de los oocitos ⁹¹. Leucopenia⁴⁶ la disfunción ovárica puede ser el resultado de la ooforitis y de los cambios en la concentración de citoquinas ováricas⁵⁴ la reducción de los niveles de estradiol durante la fase folicular pueden perjudicar el comportamiento estral, impedir la ovulación o reducir el número y calidad de oocitos liberados⁴⁴.

El impacto del vDVB durante la preñez se divide en cuatro períodos, en base a las manifestaciones clínicas de la infección durante estos intervalos de tiempo específicos.

Presentación clínica

La infección del ganado con el VDVB puede resultar en uno de tres síndromes (Figura 3): Diarrea viral bovina (o infección postnatal primaria), la infección persistente y la enfermedad de las mucosas puede desarrollar una infección respiratoria y digestiva¹⁰⁹. En la Infección postnatal, con sintomatología subclínica o severa, se puede infectar con un biotipo cp o ncp y con alta mortalidad¹³⁵. (Ver Anexos Fig. 3)

La enfermedad respiratoria puede ser una de las principales manifestaciones de la infección generalizada por vDVB. Existe evidencia epidemiológica y experimental de que BVDV está directamente asociado con el “complejo respiratorio bovino (CRB)” ¹¹⁰.



La infección reproductiva o infección fetal está asociada con la diseminación transplacentaria del virus dependiendo del momento de la infección durante la gestación, provocando muerte embrionaria, aborto, inmunotolerancia, defectos congénitos, nacimiento de terneros débiles; aunque también pueden nacer terneros normales con anticuerpos neutralizantes precolostrales para BVDV⁵³.

La Infección persistente ocurre en animales infectados entre los 35 a 125 días de la gestación con biotipos ncp. En este período, el sistema inmunológico fetal reconoce al virus como propio y no genera respuesta inmune contra este; por lo cual, estos animales nacen seronegativos y se convierten en los principales diseminadores o reservorios asintomáticos de la enfermedad²².

La enfermedad de las mucosas se desarrolla a partir de animales persistentemente infectados que adquieren un virus citopático. El desarrollo de este síndrome es dependiente de diferencias antigénicas o similitudes entre los dos biotipos del virus, por lo tanto, no todas las combinaciones de biotipos no citopáticos y citopáticos resultan en enfermedad de las mucosas. Es indispensable cierta homología entre las cepas para desarrollar esta forma de presentación³. En este cuadro, la sintomatología cursa con pirexia, anorexia, diarrea aguda, úlceras en cavidad bucal. Presenta baja morbilidad y alta mortalidad que puede llegar al 100%²².

Otra forma presentada es el síndrome hemorrágico, se comenzó a presentar en algunos hatos de Estados Unidos y Canadá a mediados de los noventa, aunque ya se ha evidenciado en países de Europa y Sur América como Argentina y Brasil respectivamente¹²⁰. Su nombre se debe a la presentación de diarrea con sangre, epistaxis, congestión en conjuntiva y mucosas, hemorragias petequiales y equimóticas en mucosas, pirexia, leucopenia, linfopenia y neutropenia. Este síndrome se ha asociado a cepas del genotipo 2, aunque no todas las cepas son altamente virulentas²⁴.



DIAGNÓSTICO

Debido al amplio tipo y severidad de lesiones inespecíficas, en ocasiones solo evidenciadas por microscopía, el diagnóstico se basa únicamente en el aislamiento del virus o detección del antígeno viral específico⁹. El objetivo principal del diagnóstico es la detección y remoción de bovinos PI, principal fuente de infección y reservorio del virus.

Serología.

La distribución de anticuerpos en los distintos grupos de edades de rebaños con animales PI y sin animales PI, determina que existan 5 fases en el ciclo de infección:

Fase A: Rebaños con infección aguda sin animales PI. Solo un pequeño porcentaje del rebaño será seropositivo.

Fase B: Rebaños infectados con animales PI menores de 3–4 meses de edad. La mayoría de los animales están bajo una infección aguda, a una velocidad variable dependiendo del sistema de producción.

Fase C: Rebaños infectados con animales PI mayores de 3–4 meses de edad. Usualmente, más del 90% del rebaño es seropositivo.

Fase D: Rebaños previamente infectados, donde los animales PI han sido removidos recientemente. Los animales jóvenes serán seronegativos cuando pierdan sus anticuerpos calostrales a los 6–8 meses de edad. Los animales adultos permanecen seropositivos.

Fase E: Rebaño previamente infectado, donde los animales PI han sido removidos hace varios años. Todos los animales jóvenes serán seronegativos (excepto algunos terneros con anticuerpos calostrales). Eventualmente el rebaño se volverá seronegativo



Estos estudios epidemiológicos han permitido desarrollar diferentes métodos serológicos para la detección de rebaños con infección activa (con bovinos PI) de manera simple, eficaz y económica.

El análisis serológico de una pequeña muestra de sangre tomada al azar de terneros de 6 a 12 meses de edad permite distinguir rebaños con infección activa, de rebaños sin bovinos PI, con un alto grado de seguridad¹². Se pueden cometer errores de clasificación cuando los rebaños poseen animales PI muy jóvenes, que no han tenido tiempo de infectar a los animales seronegativos remanentes, cuando los sistemas de explotación y la virulencia de la cepa permitan una diseminación lenta, o si se toma la muestra de animales menores de 6 meses de edad, los cuales tendrán anticuerpos calostrales. Estos problemas se solucionan repitiendo el examen unos meses después⁶².

Medir el nivel de anticuerpos en leche almacenada en tanques también permite determinar el status infeccioso del rebaño¹¹ y es ampliamente utilizado en países que están controlando la enfermedad. Sin embargo, este método no distingue entre rebaños con animales PI y rebaños donde dichos animales han sido recientemente eliminados, debido a que los títulos de anticuerpos en la leche declinan lentamente. Se recomienda el uso de este método en las fases finales de un programa de erradicación y en la vigilancia de rebaños libres⁶⁵.

Detección del virus o componentes virales.

Una vez identificados los rebaños con infección activa, se debe analizar individualmente a los animales para detectar a los bovinos PI. Para ello contamos con cuatro métodos diferentes.



Aislamiento viral.

El aislamiento viral es el método de referencia, es 100% específico y altamente sensible. Sin embargo, es económicamente prohibitivo para ser usado en el diagnóstico de animales PI en un programa de control y erradicación³⁸. El cultivo celular se ha optimizado con el sistema microtitre multi-well, donde células cultivadas en placas con múltiples pocillos son inoculadas con 10 a 50 µl de suero problema e incubadas por 4 días; la presencia de biotipos NCP se detecta con el empleo de anticuerpos anti-vDVB marcados con peroxidasa o fluorocromos¹²⁵.

Detección de antígenos mediante enzimo-inmunoensayo (ELISA).

La prueba de ELISA utiliza anticuerpos monoclonales o policlonales para “capturar” antígenos del vDVB en suero sanguíneo. Comparado con el aislamiento viral, es un método rápido y económico, por lo tanto, es el método de preferencia para la detección a gran escala de animales PI³⁸.

Los sistemas ELISA basados en anticuerpos policlonales dirigidos contra varias proteínas y glicoproteínas de cepas antigénicamente diferentes, son capaces de detectar una amplia variedad de vDVB. Este sistema, comparado con el aislamiento viral, ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad (97,9% y 99,7% respectivamente) y es comparable a los sistemas ELISA que utilizan un pool de anticuerpos monoclonales¹²¹. Por otra parte, los sistemas ELISA basados en un anticuerpo monoclonal epitope específico son cuestionables, debido a que su estrecho rango de especificidad puede fallar en detectar algunas cepas del vDVB⁵¹.

Detección de antígenos mediante inmunohistoquímica (IHQ).

La IHQ se realiza, rutinariamente, en tejido fijado en formalina y embebido en parafina; aventajando a otras técnicas en términos de conveniencia en la remisión de las



muestras, posibilita el estudio retrospectivo de muestras enviadas para examen histopatológico y permite una precisa asociación entre el antígeno viral con tipos celulares y lesiones histológicas³⁸.

La IHQ de tejidos fijados en formalina es el método diagnóstico más conveniente para la detección del vDVB en fetos. Hay un significativo número de resultados falsos positivos y falsos negativos con la inmunofluorescencia (sensibilidad: 77%, especificidad: 83%), y significativo número de falsos negativos con el aislamiento viral (sensibilidad: 83%, especificidad: 100%), mientras que la IHQ posee el mejor desempeño: especificidad: 97% y sensibilidad: 97%⁴². En casos de fetos con avanzada autólisis, la IHQ de cerebro fijado en formalina se recomienda sobre el aislamiento viral y la detección de antígeno por ELISA¹³⁰.

La presencia del antígeno del vDVB en queratinocitos de la epidermis y células epiteliales de folículos pilosos de bovinos PI clínicamente normales⁸, ha originado el desarrollo de la técnica inmunohistoquímica en biopsias de piel para el diagnóstico de estos animales. Esta técnica, en comparación con el aislamiento viral, ha demostrado ser eficaz, rápida, económica, sencilla y fácilmente implementable en cualquier laboratorio de histopatología. Además, la colección y remisión de las muestras al laboratorio es simple. Las muestras fijadas en formalina son más estables que las muestras de sangre o suero, evitándose así falsos negativos por autólisis o putrefacción, y los anticuerpos calostrales no interfieren con la técnica, permitiendo analizar terneros neonatos²¹. (Ver Anexos Fig. 4 y 5).

La inmunoreacción en piel de bovinos PI permite visualizar al vDVB como estructuras granulares de distinto diámetro, localizadas en el citoplasma de todas las células epiteliales de la epidermis y de los folículos pilosos, células de las glándulas sebáceas, células de las glándulas sudoríparas, histiocitos, músculo liso y células endoteliales⁷⁸ (Figura 1). Este patrón de tinción y la distribución de la inmunoreacción son característicos de una infección persistente y deben tenerse en cuenta a la hora del



diagnóstico inmunohistoquímico. Además, pudimos demostrar la presencia de antígenos del vDVB en el citoplasma de las células que conforman la vaina de la raíz de pelos extraídos manualmente de bovinos PI ⁷⁸ (Figura 2).

Sin embargo, no es recomendable el empleo de muestras de pelo para el diagnóstico rutinario de estos animales, ya que pese a ser sumamente fácil la toma de muestra, es una técnica laboriosa que consume gran cantidad de reactivos y no permite el estudio simultáneo de numerosas muestras. La inmunolocalización de este virus en tejidos fijados en formalina al 10% empleando anticuerpos monoclonales es difícil, ya que es un virus antigénicamente variable y sensible a los efectos de la fijación. Sólo es posible inmunomarcarse el antígeno viral con los anticuerpos monoclonales 15.c.5 (Dr. Dubovi) y WB210 (Central Veterinary Laboratory, UK), previo tratamiento proteolítico y térmico, respectivamente. Por lo consiguiente, es mejor la utilización de anticuerpos policlonales para el diagnóstico inmunohistoquímico del vDVB en tejidos fijados en formalina al 10% ⁷⁸.

Detección del ácido nucleico viral.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método rápido, sensible, que detecta diversos vDVB y permite investigar un gran número de muestras en corto tiempo¹³⁷. Su sensibilidad permite detectar el virus en pool de muestras de sangre y leche de tanque⁷⁴. Sin embargo, su elevada sensibilidad puede originar resultados falsos positivos ⁹⁹.

Para maximizar la detección de vDVB se han seleccionado partidores de la región 5' no codificante del genoma pestiviral, ya que es la región del genoma que más se conserva entre los virus aislados. Sin embargo, Vilcek y col. (2001)¹³⁴. Considerando la alta variabilidad, recomiendan un cuidadoso examen de los partidores para asegurar que sean capaces de detectar todos los virus del genotipo 1 del vDVB.



Control y prevención

La utilización de pruebas diagnósticas en los programas de control permiten: la vigilancia o monitoreo de la prevalencia a nivel del hato así como también a nivel regional; establecer el estatus del hato frente a la enfermedad, e identificar animales PI para su posterior eliminación¹²⁷. Entre las metodologías diagnósticas se tienen: la detección de antígeno, la detección de anticuerpos y la detección del genoma viral ⁶⁶.

La detección del antígeno mediante el aislamiento viral se facilita debido a que el virus crece rápidamente en muchas líneas celulares. Sin embargo, esta prueba es de alto costo, su ejecución es laboriosa y se requieren varios días para obtener resultados¹²⁴. Es importante resaltar que una limitante mayor para el aislamiento es la posibilidad de una contaminación de los cultivos celulares con virus adventicio de DVB proveniente del suero utilizado como suplemento, por tal motivo la interpretación de resultados se debe realizar cautelosamente¹¹¹. El aislamiento se realiza a partir de suero o sangre, tejidos fetales, secreciones corporales como fluido nasal, secreción vaginal, semen entre otros¹²³.

Los antígenos también se detectan en tejidos o improntas, mediante la utilización de las técnicas inmunohistoquímicas. Estas técnicas emplean anticuerpos (Acs) monoclonales o policlonales marcados, los cuales se visualizan con fluorescencia (IF) o peroxidasa (IP). Esta metodología es útil para confirmar el aislamiento, debido a que la replicación del VDVB en las células puede o no inducir un efecto citopático¹⁷. Otra técnica de detección de antígeno es el ELISA de captura, la cual emplea anticuerpos monoclonales (MAbs) para inmovilizar un antígeno en particular como la proteína NS2-3 o la Erns¹²⁷.

La detección de anticuerpos específicos se realiza mediante pruebas serológicas las cuales miden los títulos de anticuerpos tales como la seroneutralización o el ELISA indirecto y competitivo. Los resultados de estas pruebas varían de laboratorio a laboratorio, por la diversidad antigénica entre los diferentes aislamientos del VDVB¹²³.



Los métodos de detección de genoma a través de la PCR se fundamentan en la capacidad de oligonucleótidos específicos de DNA para unirse a blancos de secuencias específicas como la región 5' del genoma. La RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction* o *Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa*) ha tenido amplia distribución como método de diagnóstico; así como también para la genotipificación de cepas virales, permitiendo distinguir entre los diferentes virus dentro del género Pestivirus¹²³.

Para la realización de esta prueba se emplean muestras de leche, órganos homogenizados o suero, posteriormente el RNA viral se purifica y se transcribe a DNA complementario (cDNA), mediante la enzima transcriptasa reversa. La aplicación de RT-PCR para propósitos diagnósticos puede verse limitada por la contaminación con RNAsas o proteínas, generando falsos negativos¹²².

El diagnóstico de los animales PI es de gran importancia debido a que ellos constituyen los principales diseminadores de la enfermedad representando entre el 1 al 2% de la población bovina afectada⁶⁶. Estos animales son inmunotolerantes, lo que indica que eliminan altas cantidades de virus sin presentar anticuerpos dificultando su diagnóstico cuando se emplean métodos serológicos. Por lo anterior, el diagnóstico de estos animales se debe basar en la detección del antígeno o del genoma viral. Entre los métodos disponibles se encuentra la RT-PCR; para animales mayores de 3 meses se puede realizar ELISA de captura de antígeno (Ag) o aislamiento viral, igualmente, la inmunohistoquímica en biopsia de piel (oreja)¹⁸.

Identificación y remoción de los animales persistentemente infectados.

Esta es una de las medidas de enorme trascendencia puesto que los animales con infección persistente (inmunotolerantes) son los principales diseminadores del virus.



Afortunadamente estos animales no superan al 2%, pero en algunos hatos pueden alcanzar porcentajes superiores¹¹⁷.

Este procedimiento debe hacerse cuando existen sospechas de tener la infección en el hato; por ejemplo: incremento de la frecuencia de abortos, nacen terneros débiles o con malformaciones congénitas, incremento en el número de vacas que repiten el celo. En tal situación, debe muestrearse todos los animales mayores a 6 meses. Si en el hato hay DVB, la prevalencia debe ser alta y los negativos deben ser considerados sospechosos y eliminados del hato, si el porcentaje de estos animales es mínimo.

La otra posibilidad de encontrar a estos animales es después de la vacunación con vacuna a virus muerto a todos los animales mayores a 6 meses, incluyendo la segunda dosis al tiempo recomendado, y posteriormente se realiza el análisis serológico a todos los animales vacunados, aquellos que no responden a la vacunación serán eliminados del hato lo más pronto posible. Esta medida será repetida periódicamente para el chequeo de aquellos animales que no fueron muestreados (terneros menores a 6 meses)⁶.

Programas de erradicación

En cuanto a la erradicación de la enfermedad, algunos países han instaurado programas basados en el control sistemático sin vacunación y el control sistemático con vacunación⁶⁷.

El primero, el control sistemático sin vacunación, consiste en la identificación y eliminación de animales PI, seguido de un monitoreo continuo del hato, mediante la realización de pruebas diagnósticas para confirmar su estatus libre o para detectar nuevas infecciones⁸⁵. En este programa también se implementan medidas de bioseguridad como el control en el desplazamiento de animales entre fincas, la realización de cuarentenas para animales nuevos que ingresen a las fincas, uso de



semen certificado libre de la enfermedad, control en el ingreso del personal al hato, entre otras.⁸⁵ Este esquema se comenzó a implementar desde la década de los noventa en los países de la región escandinava (Dinamarca, Finlandia, Noruega, Suecia) donde en su mayoría hay declaración de erradicación de la enfermedad.⁵⁶ Posteriormente, las islas Shetland implementaron este programa donde también se declaró la erradicación del BVDV.¹²⁶ Las pruebas diagnósticas realizadas bajo esta estrategia de erradicación se basan en serologías al azar o muestras del tanque de la leche para medir los títulos de anticuerpos, así como también la realización de RT-PCR.⁶⁶

El Control sistémico con vacunación: consiste en la implementación de esquemas de vacunación destinados a la erradicación. Este programa se ha desarrollado en países donde el control mediante la eliminación de PI y la implementación de medidas de bioseguridad no han sido suficientes, como es el caso de Alemania.⁸⁸ En este país se implementó la vacunación con el fin de prevenir la reintroducción de la enfermedad y la reintroducción de animales PI. Con el empleo de vacunas se espera que se reduzcan los signos clínicos asociados con la infección con el BVDV y que estas provean un mejoramiento reproductivo al reducir las tasas de abortos, muertes embrionarias y el nacimiento de terneros PI.

Para un control eficiente de la enfermedad es importante que la vacunación confiera altos niveles de protección para la madre y para el feto; así mismo, que la vacuna proteja contra los dos genotipos de VBVB.⁷¹ Entre los protocolos vacunales empleados se ha sugerido una primo-vacunación con una vacuna inactivada y 4 semanas después una revacunación con una vacuna a virus modificado; esto con el fin de generar una eficiente inmunidad humoral y celular, así como también desarrollar protección fetal.⁹⁶ En otros países como Colombia, los métodos de control para BVDV se basan sólo en el empleo de vacunas desconociendo el estatus libre del hato frente a la infección viral, de igual manera no se realiza la detección de animales PI y no se implementan medidas de bioseguridad, este tipo de programa es conocido como control no sistemático.⁸⁴



Entre las vacunas disponibles actualmente en el mercado nacional e internacional se encuentran las vacunas inactivadas y las de virus vivo modificado (VLM). En su mayoría, estas vacunas vienen en presentación polivalente junto con otros antígenos virales tales como: IBR (Rinotraqueítis Bovina Infecciosa), PI-3 (Parainfluenza Bovina), BRSV (Virus Sincitial Respiratorio Bovino); así como algunos antígenos bacterianos (*Pasteurella* spp, *Moraxella* spp, entre otros) (Tabla 1). Actualmente se vienen desarrollando vacunas con vectores recombinantes basadas en DNA plasmídico o vectores virales, las cuales todavía están en etapa de experimentación.¹⁰¹ (Ver Anexos tabla 1).

Vacunas Inactivadas: Son vacunas en las que los virus pierden su capacidad infectiva y replicativa mediante la inactivación con químicos como la Etilamina Binaria (BEI), la Beta propiolactona, entre otros. Este tipo de vacunas se deben administrar con adyuvantes para alcanzar una mejor respuesta inmune.¹⁰² Son vacunas muy seguras y se pueden administrar en cualquier momento de la gestación; pero requieren de una inmunización cada 6 meses para mantener los niveles de anticuerpos vacunales.¹⁰² Estas vacunas no inducen inmunidad celular y pueden retener una efectividad residual si la inactivación no fue realizada correctamente.¹³⁹ Así mismo, pueden inducir reacciones inflamatorias localizadas, y adicionalmente requieren altos costos en su producción.⁸⁷

Vacunas a virus vivo modificados (LMV): Estas vacunas contienen cepas atenuadas del VBDV capaces de replicarse en el huésped. La atenuación se realiza mediante pasajes en serie en los cultivos celulares.¹⁰² La inducción de la respuesta inmune es rápida pudiéndose detectar Acs dentro de las 4 semanas posvacunales y manteniéndose estos altos por más de un año. Entre las desventajas en el empleo de estas vacunas están la presentación de efectos colaterales por la capacidad de atravesar la barrera placentaria e infectar el feto, así como la generación de inmunosupresión predisponiendo al animal a infecciones con otros patógenos.⁶⁶ La LMV ha mostrado seguridad cuando se administra al ganado 4 semanas pre-



inseminación. ⁹⁶Estas vacunas también pueden presentar alta frecuencia de recombinación genética con cepas de campo y mala respuesta inmune por fallas en el almacenamiento o manejo. ⁷²

Muchas de las vacunas LMV e inactivadas que se encuentran comercialmente contienen el genotipo 1 y no proveen protección cruzada contra el genotipo 2, esto indica que la exposición a uno de estos genotipos no asegura la protección contra el otro. Se ha establecido una mayor protección cuando los animales se exponen al mismo genotipo con el cual han sido vacunados, que cuando se exponen a un genotipo diferente, ¹⁰⁸ Para mayor protección, algunas casas comerciales han introducido los dos genotipos en sus vacunas. ¹¹⁸ (Tabla 1).

Vacunas en Experimentación: Entre las metodologías biotecnológicas más usadas para la generación de vacunas se encuentran el empleo de DNA plasmídico y los vectores virales. Estas técnicas se fundamentan en el uso de un vector que permite una eficiente expresión de un transgen (generalmente un antígeno viral) y su correcta presentación generando una potente inmunidad humoral y celular. ⁵⁹ Los vectores empleados en terapia génica se clasifican en dos categorías: virales y no virales. ¹⁶ Para incrementar su eficiencia cuando son empleados como vacunas recombinantes, se introducen elementos o secuencias dentro de los vectores que maximicen la expresión de las proteínas virales. Estos elementos son promotores, intrones, señales de poliadenilación, entre otros. ⁷⁶

En el caso del vDVB, el transgen más empleado es el que codifica para la proteína viral más inmunogénica: la glicoproteína (gp) E2 de la envoltura. La secuencia de esta proteína se ha clonado de forma completa, truncada o quimérica (unida a proteínas del vector). Esto se debe a que cada una de estas formas modifica la expresión de la glicoproteína en la superficie celular y por consiguiente su presentación y respuesta inmune. ³³.



El empleo de la proteína incompleta se debe a que la proteína completa es retenida dentro de la célula ya que su extremo C-terminal funciona como dominio de anclaje de membrana; de igual manera, contiene una señal de localización intracelular la cual es responsable de su retención en el retículo endoplásmico. Esta retención hace que genere una menor respuesta inmune al no ser detectada por el sistema inmune, a diferencia de la proteína truncada o con delección del dominio de anclaje en membrana, la cual alcanza la superficie celular y por lo tanto genera una mayor respuesta inmune.

32

Así mismo, la construcción de proteínas quiméricas unida a secuencias señales como la gp D del Herpesvirus o el factor activador plasminógeno t-Pas o unida a proteínas virales como la proteína G del VSV, facilitan la expresión de la proteína E2 en la superficie celular.⁸² Esta proteína ha sido la única detectada tanto en lisados como en sobrenadantes de cultivos de células Cos-7 transfectadas.⁸¹ Es importante resaltar, que no solo la versión completa o truncada de la proteína E2 afecta la respuesta inmune en el organismo, esta respuesta también está asociada con el tipo de vector en que se transporte la proteína. Igualmente con la presencia de promotores en el vector que faciliten la expresión del transgen.

En el mismo estudio de Liang et al (2006)⁸¹ el plásmido DNA con la proteína E2 truncada unida a una secuencia señal fue la única capaz de inducir títulos neutralizantes posteriores a la inmunización de ratones. Estos resultados difieren de los realizados por Medhy et al. (1996)⁹³ donde la proteína E2 completa insertada en un vector adenoviral fue capaz de inducir títulos neutralizantes.

En la construcción de plásmidos policistrónicos para el vDVB que codifiquen la proteína E2 de los dos genotipos, la expresión e inmunogenicidad se puede ver alterada por cambios conformacionales, esto se relaciona con la posición de las secuencias ya sea en el extremo C terminal o N terminal del plásmido. Se ha determinado que los plásmidos con las secuencias en el extremo N-terminal presentan una mayor expresión de la proteína transgénica.⁸⁰



Las proteínas inmunogénicas del vDVB se han expresado a través de varios plásmidos DNA y en diferentes vectores virales. Entre los vectores virales vacunales usados para el vDVB y otros virus animales se encuentran: los herpesvirus, adenovirus, baculovirus, poxvirus, togavirus y retrovirus. Para poder ser empleados como vectores, a estos virus se les realiza delección de genes involucrados en el proceso replicativo lo que disminuye su infectividad; en estos sitios de delección se introduce el gen o genes de interés (transgen).¹⁶ En algunos vectores virales se han realizado delecciones completas del genoma dejando sólo sus extremos para incrementar la capacidad de clonaje.

En otros vectores se han realizado detecciones de secuencias para proteínas involucradas en la respuesta inmune del huésped para disminuir la citotoxicidad.⁸⁶ Entre las desventajas que presentan estas vacunas están la corta expresión del transgen, ya sea por la respuesta inmune generada contra las proteínas del vector viral o por la presencia de anticuerpos pre-existentes contra el virus que sirve como vector vacunal. Para solucionar este problema se utilizan serotipos virales que infectan otras especies contra los cuales no hay inmunidad preexistente.⁶⁹ Otras de las desventajas potenciales son el riesgo de generar mutaciones por integración del vector viral en el genoma de la célula huésped (retrovirus), pérdida de la atenuación y/o diseminación de una infección inadvertida.⁷⁵

En el caso de las vacunas de DNA plasmídico las cuales usan los plásmidos como vector, se puede expresar una (plásmidos monocistrónicos) o varias proteínas virales de interés (plásmidos policistrónicos)⁷⁵ La respuesta inmune celular generada por estas vacunas ha mostrado ser mayor a la respuesta alcanzada por las vacunas vivas atenuadas; sin embargo, la respuesta inmune humoral se ha visto limitada probablemente debido a la cantidad de antígeno administrado intradérmico o intramuscular ya sea mediante agujas hipodérmicas o mediante el uso de pistolas liberadoras de genes.¹⁰⁰



Los plásmidos se pueden administrar de forma desnuda (N-DNA) o unidos a liposomas cationicos (L-DNA); estas dos formas inducen una respuesta inmune; sin embargo, estudios realizados por Harpin et al ⁵⁸ han mostrado luego del desafío con BVDV una mejor respuesta o mayor protección contra la enfermedad con el DNA desnudo que con el L-DNA.⁵⁸

Para lograr una mayor respuesta tanto humoral como celular se ha comenzado a introducir dentro del DNA plasmídico genes que codifiquen Interleuquinas, tales como la IL-2, IL4, IL12, entre otras; las cuales estimulan las células Th1 y Th2.⁷³

Al igual que las vacunas convencionales, los factores que afectan la inmunogenicidad empleando vectores, son la ruta de administración y el número de inmunizaciones requeridas.⁷⁵ Adicionalmente, se debe tener en cuenta la estructura del vector (presencia de secuencias estimuladoras como promotores), cantidad del vector liberado y los niveles de expresión del antígeno.⁷⁵

Para ejecutar un programa de control exitoso en cualquier hato se requiere conocer el estatus de la enfermedad, detectar la presencia de animales PI, determinar las características del hato (abierto o cerrado, número de animales, tipo de producción, entre otras) para implementar el siguiente paso: la eliminación paulatina de animales PI, la vacunación y el empleo de medidas de bioseguridad.



VII. DISEÑO METODOLÓGICO.

Tipo de estudio:

Descriptivo de tipo transversal.

Ubicación del estudio:

Se realizó en el municipio León, que se encuentra a unos 20 km de la costa pacífica en una posición geográfica de 12° 26' latitud norte y 86° 53' longitud oeste, a 109 msnm. Las fincas de estudio serán 8 fincas aledañas: Ceiba Mocha, Sin Nombre (S/N), Palo Quemado, Alimentos Metropolitanos, Chiriquí, La Cabullera, El Pegón y Santa Clelia.

Población en estudio:

El presente estudio se realizó en el departamento de León, municipio de León; ubicado en el occidente de Nicaragua, y el tamaño de la población en las 8 fincas a muestrear es de 226 terneros.

Tamaño y selección de la muestra:

Se recolectaron 122 muestras en 8 fincas. Se muestrearon terneros de 3 a 12 meses de edad machos y hembras equitativamente según el porcentaje de estos en las fincas. Para la determinación del tamaño de la muestra, se realizó el cálculo utilizando el programa Win Episcopo 2.0, estimación de porcentajes. A partir de una población de 226 terneros, una prevalencia esperada del 22% (Hernández Centeno, Méndez Antón, 2009)⁶¹, error aceptado del 5% y un nivel de confianza del 95%, se determinó una fracción de muestreo de 53.85% que equivale a 122 terneros.



La selección de la muestra se hizo por conveniencia, tomando en cuenta solamente las fincas en donde no se aplicó vacunas contra el vDVB; y se codificaron del número 1 al 8 según la siguiente tabla:

Número de la finca	Nombre de la finca
1	Ceiba Mocha
2	S/N
3	Palo quemado
4	Alimentos Metropolitanos
5	Chiriquí
6	La Cabullera
7	El Pegón
8	Santa Clelia

Criterios de inclusión:

- Que los terneros tengan entre 3 y 12 meses de edad.
- Que sean terneros machos y hembras.
- Que no hayan sido castrados.
- Que el propietario acepte la participación voluntaria.

Criterios de exclusión:

- Que hayan sido vacunados - ellos o la madre - frente al vDVB.
- Que los propietarios no hayan querido participar.

Técnicas y métodos de recolección de los datos:

En primera instancia se les explicará a los dueños de los terneros los objetivos del estudio (consentimiento informado), luego se procederá a la aplicación de un instrumento de recolección de datos sobre el hato, para posteriormente extraer 10 ml de sangre por venopunción de la yugular de los bovinos muestreados.



Limitaciones:

- Muestras perdidas por mal manejo y hemólisis.
- Falta de estudios realizados anteriormente en terneros.

Ventajas:

- Acceso fácil al muestreo, debido a que las fincas están cerca de la ciudad.
- Participación voluntaria de parte de los propietarios.
- La prueba ELISA de captura de antígenos es de alta confiabilidad para detectar animales PI.

Divulgación de los resultados:

- Tesis de pregrado.
- Retroalimentación a los propietarios.
- MAGFOR.

Recolección de las muestras de sangre:

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena yugular, utilizando jeringas descartables con agujas No. 16 para cada ternero. Se enviaron las muestras inmediatamente en termos al laboratorio dispuestas en gradillas y en tubos debidamente rotulados.

Diagnóstico:

Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 7 minutos para la extracción del suero y se depositaron en viales de 1.5 ml, luego se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.



Se utilizaron dos diferentes tipos de diagnóstico, uno de detección de animales serológicamente positivos (Prueba de captura de anticuerpos) y el otro de confirmación de los virológicamente positivos (Prueba de captura de antígenos).

Las muestras fueron procesadas utilizando un kit de ELISA (HERDCHEK* BVDV) para la detección de anticuerpos frente al virus de Diarrea viral bovina y otro kit de ELISA de la misma casa comercial para captura de antígeno viral. El análisis se realizó según los procedimientos prescritos en el kit.

El de detección consiste en una técnica ELISA indirecta donde se utilizan placas de microtitulación tapizadas con antígenos del vDVB. Los anticuerpos frente al vDVB presentes en la muestra se unen al antígeno de la placa. El diagnóstico de confirmación está diseñado para detectar antígenos de vDVB. Se han configurado placas de microtitulación tapizadas con anticuerpos monoclonales específicos al virus.

Técnica:

Detección de anticuerpos frente al vDVB:

Los anticuerpos frente al vDVB presentes en la muestra se unen al antígeno de la placa. El material no ligado se elimina mediante un lavado. El complejo antígeno-anticuerpo se detecta mediante un conjugado peroxidasa de rábano, el resto de conjugado se elimina mediante el lavado de la placa y se añade una solución de sustrato/cromógeno. En presencia del enzima, el sustrato se convierte en producto que reacciona con el cromógeno generando una coloración azul. Al añadir la solución de frenado se genera un color amarillo. La absorbancia se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda única de 450 nm. [A (450)] o a una longitud de onda dual de 450 nm y 650 nm [A (450/650)]. El cociente M/P de las muestras se calcula usando la absorbancia [A (450)] o [A (450/650)] de la muestra y un control positivo, corregida con



la absorbancia del control negativo. El desarrollo del color indica la presencia de anticuerpos frente al vDVB en la muestra (resultado positivo).

Detección de antígenos del vDVB:

El antígeno del vDVB de la muestra es capturado en las placas. Tras la incubación de la muestra en el pocillo, el antígeno es detectado por anticuerpos específicos y conjugado de peroxidasa de rábano picante. Después se lava el conjugado sin enlazar para eliminarlo y se añade una solución de sustrato/cromógeno. En presencia del enzima, el sustrato se convierte en un producto que reacciona con el cromógeno, generando una coloración azul. Con la adición de la solución de frenado se genera un color amarillo. La absorbancia se mide con el espectrofotómetro a una longitud de onda única de 450 nm. $[A (450)]$ o doble de 450 nm y 650 nm $[A (450/650)]$. El valor de la densidad óptica (DO) corregida de las muestras se calcula usando la absorbancia $[A (450)]$ o $[A (450/650)]$ obtenida con la muestra del ensayo y corregida con la absorbancia del control negativo.

Interpretación estadística:

Se estructuró una base de datos en el programa estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences), en la que se ingresaron los datos de cada ternero muestreado. Se utilizó la estadística descriptiva, donde se describió las frecuencias relativas de los animales que dieron positivos o negativos a la prueba de captura de anticuerpos. A los animales que den negativos a la prueba para captura de anticuerpos se les realizó la otra para detección de antígenos, y de esta manera confirmar a los animales PI. Además se realizó una inferencia sobre parámetros en ambas variables. Los resultados se presentaron a través de gráficas y tablas de frecuencias mostrando el porcentaje de las variables del estudio.



VIII. RESULTADOS

La seroprevalencia de Diarrea viral bovina fue de 46.72% (57/122) en las ocho fincas, y el porcentaje de positivo en cada una de las fincas se describe en la siguiente tabla:

Distribución de animales positivos a Diarrea viral bovina por ELISA (Ac) en fincas del municipio de León.

Finca	Positivos	Porcentaje
1. Ceiba Mocha	13/31	41.9
2. S/N	1/10	10
3. Palo quemado	3/18	16.7
4. Alimentos Metropolitanos	2/9	22.2
5. Chiriquí	2/7	28.6
6. La Cabullera	1/5	20
7. El Pegón	5/5	100
8. Santa Clelia	30/37	81.1

La menor prevalencia se encuentra en las finca No. 2 con 10% (1/10), No. 3 con 16.7% (3/18) y No. 6 con 20% (1/5).

En Cambio las No. 7 y No. 8 presentaron prevalencias de 100% (5/5) y 81.08% (30/37), respectivamente.



En relación a la cantidad de hembras y machos positivos a Diarrea viral bovina, los resultados se distribuyeron de la siguiente manera:

Categoría	Resultado	Porcentaje
Machos Positivos	28	22.9
Machos Negativos	24	19.7
Machos Dudosos	1	0.8
Hembras Positivas	29	23.8
Hembras Negativas	34	27.9
Hembras Dudosas	6	4.9
TOTAL	122	100

En cuanto la cantidad de hembras y machos positivos no se obtuvieron resultados significativos, con una diferencia que oscila entre el 0.9% - 8.2%, incluyendo en ese rango también a los animales dudosos.

De los resultados positivos obtenidos por la prueba de ELISA tipo indirecto, se les realizó un ELISA de captura de antígeno, no obteniendo ningún positivo.



IX. DISCUSIÓN

La detección de anticuerpos frente al vDVB en el 46.72% de la población bovina de hatos sin historia de vacunación, indica una evidente exposición de los animales al virus de campo, en comparación con los resultados obtenidos en el 2009 que fue de 21.2%.⁶¹ Los resultados también indican que el virus se encuentra distribuido en todas las fincas del estudio, con animales reactivos en mayor o menor cuantía en cada una de ellas.

La infección fue aparentemente de tipo subclínica, ya que los animales muestreados no presentaron sintomatología, pero sí un contacto con el agente.

El virus tiene mayor oportunidad para infectar a los animales susceptibles en poblaciones numerosas y de crianza intensiva, situación que podría estar ocurriendo en la Finca No. 8 que presentó el 81.08% (30/37).

Es importante considerar la inmunidad de tipo calostrado del ternero, y que en los bovinos los anticuerpos pasivos no son detectados partir de los 6 meses de edad, lo cual nos permite inferir que los animales reactivos en la mayoría de los casos estuvieron expuestos en algún momento al virus de campo.¹²

En cuanto a la detección de animales PI, no se encontraron posiblemente porque estos animales, en caso de aparecer, probablemente murieron tempranamente.



X. CONCLUSIONES

- Se encontraron anticuerpos específicos frente al vDVB en el 46.72% de los animales muestreados.
- Ningún ternero dio positivo al prueba de ELISA para captura de antígeno.
- No se encontró una correlación significativa entre el porcentaje de animales reactivos y PI.



XI. RECOMENDACIONES

- ☞ Tratar de no hemolizar las muestras porque puede provocar falsos positivos.
- ☞ Para los próximos estudios, es muy apropiado realizar también la prueba ELISA Ag. a todos los animales independientemente del resultado obtenido en la prueba ELISA Ac., ya que la muestra pudo ser tomada en una fase de infección aguda con seroconversión.
- ☞ Iniciar un programa de vacunación frente al vDVB en las fincas muestreadas, vacunando antes de la primera monta o inseminación, y revacunando cada seis meses. Vacunar a las madres, terneros mayores de seis meses y también sementales, todo esto, dirigido a los animales reactivos a la prueba ELISA Ac. y también a los negativos a ELISA ag., ya que el vDVB de campo puede infectar a cualquier animal sano.
- ☞ Aplicar una prueba más específica tipo RT-PCR, para la detección de PI.
- ☞ Establecer un programa de vigilancia epidemiológica en el hato que permita conocer la condición sanitaria de los animales que ingresan.
- ☞ Mejorar las condiciones higiénico-sanitarias de las fincas, con el fin de disminuir la incidencia del agente a través de fómites.



XII. BIBLIOGRAFIA

1. Agapov E, Murray C, Frolov I, Qu L, Myers T. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoea virus. J virol 2004; 78: 2414-2425.; Lectora W. Diarrea viral bovina: Actualización. Rev Vet 2003; 14: 1-17.
2. Ames TR. 1986. The causative agent of BVD: its epidemiology and pathogenesis. Vet. Med. 81: 848–869.; Baker JC. 1987. Bovine viral diarrhoea virus: A review. JAVMA 190: 1449–1458.; Kelling CL. 1996. The effects of BVDV infection on cattle. Vet. Med. 91: 862–863.
3. Baker JC. Bovine viral diarrhoea virus: a review. J AVMA Vet Med Assoc 1987; 190: 1449-58.
4. Baker JC. 1987. Bovine viral diarrhoea virus: A review. JAVMA 190: 1449–1458.; Kelling CL. 1996. The effects of BVDV infection on cattle. Vet. Med. 91: 862–863.
5. Baker JC. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. Vet Clin N Am: Food Anim Pract 11: 425-445.
6. Baker J. Bovine Viral diarrhoea virus: A review. JAVMA. 1987; 190: 1449-1458. ; Brownlie J, Clarke MC. Bovine virus diarrhoea: Speculation and observations on current concepts. Rev Sci Tech (France). 1990, 9: 223-230. ; Bolin S.R. Control of bovine virus diarrhoea virus. Rev Sci Tech (France). 1990; 9: 163-171.
7. Baule C. 2000. Molecular characterization of bovine viral diarrhoea virus, an important pathogen of cattle. Acta Universit. Agric. Sueciae 95: 9–38. ; Hamers C, Couvreur B, Dehan P, Letellier C, Lewalle P, Pastoret P, Kerkhofs P. 2000.



Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea virus strains isolated from hemorrhagic syndromes. Vet. J. 160: 250–258.

8. Bielefeldt Ohmann H. 1983. Pathogenesis of bovine viral diarrhea–mucosal disease: distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves. Res. Vet. Sci. 34: 5–10.
9. Bielefeldt Ohmann H. 1995. The pathologies of bovine viral diarrhea virus infection. Food Anim. Pract. 11: 447–476.
10. Birk A, Dubovi E, Cohen-Gould L, Donis R, Szeto H. Cytoplasmic vacuolization responses to cytopathic bovine viral diarrhea virus. Virus Research 2008; 132: 76-85.
11. Bitsch V, Houe H, Nylin B, Ronsholt L. 1997. Examination of blood and bulk tank milk samples to monitor the bovine viral diarrhoea infections status of cattle herds, Proceedings of the 3th Symposium on Pestiviruses, sept. 1996, Lelystad, Netherlands. ESVV, pp. 158–161.
12. Bitsch V, Houe H, Nylin B, Ronsholt L. 1997. Examination of blood and bulk tank milk samples to monitor the bovine viral diarrhoea infections status of cattle herds, Proceedings of the 3th Symposium on Pestiviruses, sept. 1996, Lelystad, Netherlands. ESVV, pp. 158–161.
13. Bolin SR, Ridpath JF. 1992. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea virus in calves. Am. J. Vet. Res. 53: 2157–2163.



14. Bolin SR, Ridpath JF. 1992. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea virus in calves. Am. J. Vet. Res. 53: 2157–2163.; Pernthaner A, Schilcher F, Baumgartner W. 1997. Acute bovine viral diarrhea virus infections in Austrian cattle. Israel J. Vet. Med. 52: 104–107.
15. Borda A. Diarrea viral bovina en terneros y terneras procedentes de Holanda. Tesis de pregrado, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1975.
16. Bostock CJ. Virus as vectors. Vet microbiology 1990; 23: 55-62.
17. Brodersen B. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhea virus infection. Vet Clin Food Anim 2004; 20: 85-93.
18. Brodersen B. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhea virus infection. Vet Clin Food Anim 2004; 20: 85-93.; Rossmanith W, Vilcek S, Wenzl H, Rossmanith E, Loitsch A, et al. Improved antigen and nucleic acid detection in a Bovine Viral Diarrhea Virus eradication program. Vet microbial 2001; 81: 207-218.
19. Brodersen BW, Kelling CL. 1998. Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhea virus infections on respiratory tract and enteric diseases in calves. Am. J. Vet. Res. 59: 1423–1430.
20. Brodersen BW, Kelling CL. 1998. Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhea virus infections on respiratory tract and enteric diseases in calves. Am. J. Vet. Res. 59: 1423–1430.; Grooms DL. 1998. Role of bovine viral diarrhea virus in the bovine respiratory disease complex. Bov. Pract. 32: 7–12.



21. Brodersen BW, White AK, Smith DR. 1998. Immu-nohistochemical test on skin biopsies as a method for detection of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Proc. Am. Assoc. Bov. Pract.* 31: 246.
22. Campbell J. Effect of bovine viral diarrhea virus in the feedlot. *Vet Clin Food Anim* 2004; 20: 39-50.
23. Caropi WV, Donis RO, Dubovi EJ. 1990. Characteriza-tion of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarr-hea virus. *Am. J. Vet. Res.* 51: 1388–1394.; Ridpath JF. 1996. Sequence diversity and genotyping. *International Symposium Bovine Viral Diarrhea Virus a 50 Year Review*, Cornell University, USA, pp. 39–42.
24. Chul B, Walz P, Kennedy G, Kapil S. Biotype, genotype and clinical presentation associated with bovine viral diarrhea virus isolates from cattle. *Intern J Appl Res Vet Med* 2005; 3: 319-25.; Ridpath J, Neill J, Vilcek S, Dubovi E, Carman S. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Vet Microbiology* 2006; 114: 196-204.
25. Constable PD, Hull BL, Wicks JR, Myer W. 1993. Femoral and tibial fractures in a newborn calf after transplacental infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 132: 383–385.
26. Cotrino B. IBR Y DVB, su importancia en reproducción. En: *Memorias, seminario, taller “Actualización en IBR Y DVB 2003”, aspectos moleculares epidemiológicos y de control* Universidad Nacional de Colombia, Septiembre 25 y 26. 2003.



27. Corapi, W.V., R.D. Elliott, T.W. French, D.G. Arthur, D.M. Bezek, E.J. Dubovi. 1990. Trombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus, J. Am. Vet. Med. Assoc. 196: 590-596.
28. David GP, Crawshaw TR, Gunning RF, Hibberd RC, Lloyd GM, Marsh PR. 1994. Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. Vet. Rec. 134: 468–472.
29. Deregt D, Loewen KG. 1995. Bovine viral diarrhea virus: biotypes and disease. Can. Vet. J. 36: 371–377.
30. De Verdier Klingenberg K. 2000. Enhancement of clinical signs in experimentally rotavirus infected calves by combined viral infections. Vet. Rec. 147: 717–719.
31. Donis RO. 1995. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. Food Anim. Pract. 11: 393–423.
32. Donofrio G, Bottarrelli E, Sandro C, Filippo C. Expression of Bovine Viral Diarrhea Virus Glycoprotein E2 as a soluble form in a Mammalian cell line. Clinical and vaccine immunology 2006; 13: 698-701.
33. Donofrio G, Bottarrelli E, Sandro C, Filippo C. Expression of Bovine Viral Diarrhea Virus Glycoprotein E2 as a soluble form in a Mammalian cell line. Clinical and vaccine immunology 2006; 13: 698-701.; Lian R, Babiuk L. Compatibility of plasmid encoding bovine viral diarrhea virus type 1 and type 2 E2 in a single DNA vaccine formulation. Vaccine 2007; 25: 5994-6006.
34. Drake TR, Moore DA, Whitlock RH, Castro AE, Hattel AL, Reams R, Stoffregen W. 1996. An outbreak of acute BVD in Pennsylvania cattle. International



- Symposium Bovine Viral Diarrhea Virus a 50 Year Review, Cornell University, USA, pp. 208.; Sockett D, Bolin D, Ridpath J, Bolin S. 1996. Outbreak of acute bovine viral diarrhea (BVD) in Wisconsin. International Symposium Bovine Viral Diarrhea Virus A 50 Year Review, Cornell University, USA, pp. 207.
35. Duffell, S.J., J.W. Harkness; 1985. Bovine virus diarrhoea mucosal disease infection in cattle. Vet. Rec. 117: 240-245.
36. Dubovi EJ. 1994. Impact of bovine viral diarrhea virus on reproductive performance in cattle. Food Anim. Pract. 10: 503–514.
37. Dubovi EJ. 1994. Impact of bovine viral diarrhea virus on reproductive performance in cattle. Food Anim. Pract. 10: 503–514.; Moennig V, Liess B. 1995. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. Food Anim. Pract. 11: 477–487.
38. Dubovi EJ. 1996. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. Vet. Med. 91: 867–872.
39. Elahi SM, Shen SH, Talbot BG, Massie B, Harpin S, Elazhary Y. Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of bovine viral diarrhea virus by adenovirus vector with an inducible promoter. Virology 1999; 261: 1-7.
40. Elahi SM, Shen SH, Talbot BG, Massie B, Harpin S, Elazhary Y. Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of bovine viral diarrhea virus by adenovirus vector with an inducible promoter. Virology 1999; 261: 1-7.; Young N, Thomas C, Thompson I, Collins M, Brownlie J. Immune responses to non-structural protein 3 (NS3) of BVDV in NS3 DNA vaccinated and naturally infected cattle. Prev Vet Med 2005; 72: 115-120.



41. Elahi SM, Shen SH, Talbot BG, Massie B, Harpin S, Elazhary Y. Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of bovine viral diarrhea virus by adenovirus vector with an inducible promoter. *Virology* 1999; 261: 1-7.; Nobiron I, Thompson I, Brownlie J, Collins M. Coadministration of IL-2 enhances antigen-specific immune responses following vaccination with DNA encoding the glycoprotein E2 of bovine viral diarrhea virus. *Vet microbiol* 2000; 76:129-142.
42. Ellis JA, Martin K, Norman GR, Haines DM. 1995. Comparison of detection methods for bovine viral diarrhea virus in bovine abortions and neonatal death. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7: 433–436.
43. Flores E, Ridpath J, Weiblen R, Vogel F, Gil L. Phylogenetic analysis of Brazilian Bovine Viral Diarrhea Virus type 2 (BVDV-2) isolates: Evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Research* 2002; 87: 51-60.
44. Fray MD, Mann GE, Clarke MC, Charleston B. 1999. Bovine viral diarrhea virus: its effects on estradiol, progesterone and prostaglandin secretion in the cow. *Theriogenology* 51: 1533–1546.
45. Fray MD, Paton DJ, Alenius S. 2000. The effects of bovine viral diarrhea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61: 615–627.
46. Fray MD, Paton DJ, Alenius S. 2000. The effects of bovine viral diarrhea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61: 615–627.); la necrosis de las células de la granulosa de los folículos pre-ovulatorios (McGowan MR, Kafi M, Kirkland PD, Kelly R, Bielefeldt Ohmann H, Occhio MD, Jillella D. 2003. Studies of the pathogenesis of bovine Pestivirus-induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology* 59: 1051–1066.



47. Fray MD, Prentice H, Clarke MC, Charleston B. 1998. Immunohistochemical evidence for the localization of bovine viral diarrhea virus, a single-stranded RNA virus, in ovarian oocytes in the cow. *Vet. Pathol.* 35: 253–259.
48. Fredriksen B, Sandvik T, Loken T, Odegaard SA. 1999. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 144: 111–114.
49. Grahn TC, Fahning ML, Zemjanis R. 1984. Nature of early reproductive failure caused by bovine viral diarrhea virus. *JAVMA* 185: 429–432.; McGowan MR, Kirkland PD, Rodwell BJ, Kerr DR, Carroll CL. 1993. A field investigation of the effects of bovine viral diarrhea virus around the time of insemination on the reproductive performance of cattle. *Theriogenology* 39: 443–449.
50. Grahn TC, Fahning ML, Zemjanis R. 1984. Nature of early reproductive failure caused by bovine viral diarrhea virus. *JAVMA* 185: 429–432.
51. Graham DA, McLaren IE, German A. 1998. Evaluation of the suitability of a commercial bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA for diagnostic testing. *Vet. J.* 157: 149–154.
52. Grooms DL. 1998. Role of bovine viral diarrhea virus in the bovine respiratory disease complex. *Bov. Pract.* 32: 7–12.
53. Grooms D. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am* 2004; 20:5-19.
54. Grooms DL, Brock KV, Pate JL, Day ML. 1998. Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhea virus. *Theriogenology* 49: 595–605.



55. Grooms DL, Brock KV, Ward LA. 1998. Detection of bovine viral diarrhea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Vet. Diag. Invest.* 10: 125–129.
56. Gunn G, Saatkamp H, Humphry R, Stot A. 2005. Assessing economic and social pressure for the control of BVDV. *Prev Vet Med* 2005; 72: 149-162.; Valle P, Skjerve E, Wayne S, Larsen R, Nyberg O. Ten years of BVDV control in Norway: A cost benefits analysis. *Prev Vet Med* 2005; 72: 189.
57. Hamers C, Couvreur B, Dehan P, Letellier C, Lewalle P, Pastoret P, Kerkhofs P. 2000. Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea virus strains isolated from hemorrhagic syndromes. *Vet. J.* 160: 250–258.
58. Harpin S, Hurley D, Mbikay M, Talbot B, Elazhary Y. Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the Bovine Viral Diarrhea Virus major glycoprotein E2. *Journal of general Virology* 1999; 80: 3137-44.
59. Harpin S, Hurley D, Mbikay M, Talbot B, Elazhary Y. Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the Bovine Viral Diarrhea Virus major glycoprotein E2. *Journal of general Virology* 1999; 80: 3137-44.; Liu Q, Murwe Da. Molecular basis of the inflammatory response to Adenovirus vectors. *Gene therapy* 2003; 10: 935-940.
60. Hellen C, Breyne S. A distinct group of Hepacivirus/Pestivirus_ like Internal Ribosomal Entry Sites (IRES) in members of Diverse Picornavirus genera: Evidence for Modular Exchange of Functional Noncoding RNA elements by Recombination. *Journal of Virology* 2007; 81: 5850-5863.
61. Hernández Centeno Y, Méndez Antón W. Seroprevalencia de Diarrea Viral Bovina en 5 municipios del departamento de León, durante el período comprendido de Marzo a Septiembre del año 2009. Tesis para optar al título de licenciado en Medicina Veterinaria. Nicaragua: UNAN – León; 2009.



62. Houe H. 1992. Serological analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy herds. *Res. Vet. Sci.* 53: 320–323.
63. Houe H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Food Anim. Pract.* 11: 521–547.
64. Houe H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Food Anim. Pract.* 11: 521–547.; Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64: 89–107.
65. Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64: 89–107.
66. Houe H, Lindberg A, Moennig V. Test strategies in Bovine Viral Diarrhea Virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest* 2006; 18: 427-36.
67. Houe H, Lindberg A, Moennig V. Test strategies in Bovine Viral Diarrhea Virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest* 2006; 18: 427-36.; Lindberg A, Alenius S. Principles for eradication of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infectious in cattle populations. *Vet Microbiol* 1999; 64: 197-222.
68. Jaime J. Infección persistente con el virus DVB en hatos lecheros de la Sabana de Bogotá. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1996.
69. Jooss K, Chimule N. Immunity Adenovirus and Adenovirus associated virus for gene therapy. *Gene therapy* 2003; 10: 955-63.



70. Kelling CL. 1996. The effects of BVDV infection on cattle. *Vet. Med.* 91: 862–863.; Taylor LF, Janzen ED, Ellis JA, Van Den Hurk JV, Ward P. 1997. Performance, survival, necropsy, and virological findings from calves infected with the bovine viral diarrhoea virus originating from a single Saskatchewan beef herd. *Can. Vet. J.* 38: 29–37.
71. Kelling C. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Vet Clin Food Anim* 2004; 20: 115-129.
72. Kovács F, Magyar T, Rinehart C, Elbers K, Ohnesorge WC. The live attenuate bovine viral diarrhoea virus components of a multi-valent vaccine confer protection against fetal infection. *Vet Microbiol* 2003; 96: 117-131.
73. Kowalczyk D, Erti H. Immune responses to DNA vaccines. *Cell Mole Life Sci* 1999; 55: 751-770.; Liang R, Hurk J, Babiuk L, Hurk F. Priming with DNA encoding E2 and boosting with E2 protein formulated with CpG oligodeoxynucleotide induces strong immune response and protection from BVDV in cattle. *Journal of general Virology* 2006; 87: 2971-82.
74. Laamanen UI, Neuvonen EP, Yliviuhkola EM, Veija-lainen PML. 1997. Comparison of RT–PCR assay and virus isolation in cell cultures for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in field samples. *Res. Vet. Sci.* 63: 199–203.; Renshaw RW, Ray R, Dubovi EJ. 2000. Comparison of virus isolations and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk tank samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 184–186.
75. Leitner, W., Ying, H., Restifo, N. DNA and RNA-based vaccines: principles progress and prospects. *Vaccine* 2000; 18: 765-77.



76. Lertora WJ. 2002. Inmunohistoquímica en biopsias de piel y en bulbos pilosos, para el diagnóstico de bovinos persistentemente infectados con el virus diarrea viral bovina. Tesis de Maestría, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, p. 61–90.
77. Lertora, W. J. Diarrea Viral Bovina: Actualización. Cátedra de Patología General y Sistemática, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE Argentina. 1:42-51.2003.
78. Lian R, Babiuk L. Compatibility of plasmid encoding bovine viral diarrhea virus type 1 and type 2 E2 in a single DNA vaccine formulation. *Vaccine* 2007; 25: 5994-6006. ; Mehdy S, Shen S, Talbot B, Massie B, Harpin S, Elazhary Y. Recombinant adenoviruses expressing the E2 protein of Bovine Viral Diarrhea virus induce humoral and cellular responses. *Microbiology Letters* 1999; 177: 159-165.
79. Lian R, Babiuk L. Compatibility of plasmid encoding bovine viral diarrhea virus type 1 and type 2 E2 in a single DNA vaccine formulation. *Vaccine* 2007; 25: 5994-6006.
80. Lian R, Babiuk L. Compatibility of plasmid encoding bovine viral diarrhea virus type 1 and type 2 E2 in a single DNA vaccine formulation. *Vaccine* 2007; 25: 5994-6006. ; Wang L, Whitbeck C, Lawrence W, Volgin D, Bello L. Expression of the genomic form of the BVDV E2 ORF in a Bovine Herpesvirus-1 Vector. *Virus genes* 2003; 27:83-91.
81. Liang R, Hurk J, Babiuk L, Hurk F. Priming with DNA encoding E2 and boosting with E2 protein formulated with CpG oligodeoxynucleotid induces strong immune response and protection from BVDV in cattle. *Journal of general Virology* 2006; 87: 2971-82.



82. Lindberg A, Alenius S. Principles for eradication of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infectious in cattle populations. *Vet Microbiol* 1999; 64: 197-222. ; Lindberg A, Browlie J, Gunn G, Houe H, Moennig V. The control of bovine viral diarrhea virus in Europe: today and in the future. *Rev sci tech off int Epiz* 2006; 25:961-979.
83. Lindberg A, Browlie J, Gunn G, Houe H, Moennig V. The control of bovine viral diarrhea virus in Europe: today and in the future. *Rev sci tech off int Epiz* 2006; 25:961-979.
84. Liu Q, Murwe Da. Molecular basis of the inflammatory response to Adenovirus vectors. *Gene therapy* 2003; 10: 935-940.
85. Makoschey B, Becher P, Orlich M, Thiel HJ, Lutticken D. Bovine viral diarrhea virus with deletions in the 5'-nontranslated region: reduction of replication in calves and induction of protective immunity. *Vaccine* 2004; 22:3285-3294.
86. Makoschey B, Janssen MG, Vrijenhoek MP, Korsten JHM. An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2. *Vaccine* 2001; 19:3261-3268.
87. Mars MH, Bruschke CJ, Van Oirschot JT. 1999. Air-borne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Vet. Microbiol.* 66: 197–207.
88. McGowan MR, Kafi M, Kirkland PD, Kelly R, Bielefeldt Ohmann H, Occhio MD, Jillella D. 2003. Studies of the pathogenesis of bovine Pestivirus-induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology* 59: 1051–1066.



89. McGowan MR, Kafi M, Kirkland PD, Kelly R, Bielefeldt Ohmann H, Occhio MD, Jillella D. 2003. Studies of the pathogenesis of bovine Pestivirus–induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology* 59: 1051–1066;
- Ssentongo YK, Johnson RH, Smith JR. 1980. Association of bovine viral diarrhea–mucosal disease virus with ovaritis in cattle. *Aust. Vet. J.* 57: 272–274.
90. McGowan MR, Kirkland PD. 1995. Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *Br Vet J* 151: 263-269.; Brownlie J, Hooper LB, Thompson I, Collins ME. 1998. Maternal recognition of fetal infection with bovine virus diarrhea virus (BVDV) – the bovine pestivirus. *Clin Diagn Virol* 10: 141-150.
91. Mehdy S, Shen S, Talbot B, Massie B, Harpin S, Elazhary Y. Recombinant adenoviruses expressing the E2 protein of Bovine Viral Diarrhea virus induce humoral and cellular responses. *Microbiology Letters* 1999; 177: 159-165.
92. Mettenleiter T, Sobrino F, editors. *Animal Viruses: Molecular Biology*. Madrid: Caister Academic Press; 2008.
93. Meyers G, Tautz N, Dubovi EJ, Heinz–Jürden Thiel. 1996. Origin and diversity of cytopatogenic Pestivirus. *International Symposium Bovine Viral Diarrhea Virus a 50 Year Review*, Cornell University, USA, pp. 24–34.
94. Moennig V, Eicken K, Flebbe U, Frey HR, Grummer B. Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhea (BVD). *Prev Vet Med* 2005; 72:109-114.
95. Moennig V, Liess B. 1995. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. *Food Anim. Pract.* 11: 477–487.



96. Murphy F, Fauquet C, Bishop D, Ghabrial S, Jarvis A, editors. Virus taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of virus. Vienna and New York: Springer-verlag; 1999.
97. Nettleton PF, Entrican G. 1995. Ruminant Pestiviruses. Br. Vet. J. 151: 615–642.
98. Nobiron I, Thompson I, Brownlie J, Collins M. Coadministration of IL-2 enhances antigen-specific immune responses following vaccination with DNA encoding the glycoprotein E2 of bovine viral diarrhea virus. Vet microbiol 2000; 76:129-142.
99. Nobiron I, Thompson I, Brownlie J, Collins M. DNA vaccination against Bovine Viral Diarrhea Virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. Vaccine 2003; 21: 2082-92.
100. Oirschot J, Brruschke C, Rijn P. Vaccination of cattle against Bovine Viral Diarrhea Virus. Vet Microbiol 1999; 64: 169-83.
101. Parra J. Influencia de la infección por el virus de la diarrea viral bovina (DVB) y de la coinfección con el virus de leucosis bovina, leptospira y rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR) sobre la producción en ganado de leche. Universidad Nacional de Colombia 1994.
102. PARRA J., VERA V., VILLAMIL., RAMIREZ G. Seroepidemiología de la diarrea viral bovina en explotaciones lecheras de la Sabana de Bogotá. Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, 42(1):29-44.1994
103. Paton DJ. 1995. Pestivirus Diversity. J. Comp. Path. 112: 215–236.



104. Paton DJ, Edwards S, Sands J, Lowings P, Ibata G. 1996. Antigenic variation amongst Pestiviruses. Interna-tional Symposium Bovine Viral Diarrhea Virus a 50 Year Review, Cornell University, USA, pp. 61–64.
105. Paton DJ, Lowings JP, Ramírez GC. 1994. Stability of the gp53 gene of a bovine viral diarrhoea virus isolated at different times from a persistently infected steer. Br. Vet. J. 150: 603–607.
106. Paton D, Sharp G, Ibata G. Fetal cross-protection experiments between type 1 and type 2 BVDV in pregnant ewes. Vet Microbiol 1999; 64: 185-196.; Ridpath J. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. Control program. Prev Vet Med 2005; 72: 17-30.
107. Potgieter L, Bovine Respiratory Tract Disease caused by Bovine Viral Diarrhea virus. Vet Clin North Am 1997; 13:471-481.
108. Potgieter L, Bovine Respiratory Tract Disease caused by Bovine Viral Diarrhea virus. Vet Clin North Am 1997; 13:471-481.; Ridpath J, Neill J, Peterhans E. Impact of variation in acute virulence of BVDV 1 strain on design of better vaccine efficacy challenge models. Vaccine 2007; 25: 8058-66.
109. Ramírez MC. Evaluación de cultivos celulares y SFB con PEI en el estudio del virus DVB. Trabajo de investigación. Facultad de Medicina veterinaria, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá 1993.
110. Ramsey FK, Chivers WH. 1953. Mucosal disease of cattle. North Am Vet 34:629-634.



111. Reinhardt G, Riedemann S, Tadich N. 2002. Muestreo predial pequeño para predecir una infección activa por virus diarrea viral bovina (VDVB) en planteles lecheros de la Xª Región, Chile. Arch. Med. Vet. 34: 97–101.
112. Richard Quispe Q., Alberto Ccama S. Hermelinda Rivera G. y Mari luz Arainga R. EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL EN BOVINOS CRIOLLOS DE LA PROCINCIA DE MELGAR, PUNO. Rev. Inv. Vet. Perú 2008; 19(2): 176-182.
113. Ridpath JF. 1996. Sequence diversity and genotyping. International Symposium Bovine Viral Diarrhea Virus a 50 Year Review, Cornell University, USA, pp. 39–42.
114. Ridpath J. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. Control program. Prev Vet Med 2005; 72: 17-30). Esta diversidad genética del BVDV está asociada con la propensión de los virus RNA a modificaciones genómicas como mutaciones y recombinaciones (Bolin S, Grooms D. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. Vet Clin Food Anim 2004; 20: 51-86.
115. Ridpath JF, Bolin SR. Hybridization analysis of genomic variability among isolates of bovine viral diarrhoea virus using cDNA probes. Mol Cell Probes. 1991; 5: 291-298.
116. Ridpath J, Neill J, Peterhans E. Impact of variation in acute virulence of BVDV 1 strain on design of better vaccine efficacy challenge models. Vaccine 2007; 25: 8058-66.
117. Ridpath J, Neill J, Vilcek S, Dubovi E, Carman S. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. Vet Microbiology 2006; 114: 196-204.



118. Ridpath J, Neill J, Vilcek S, Dubovi E, Carman S. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Vet Microbiology* 2006; 114: 196-204.; Vilcek S, Durkovic B, Kolesarova M, Paton D. Genetic diversity of BVDV: Consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev Vet Med* 2005; 72: 31-35.
119. Ronsholt L, Nylin B, Bitsch V. 1997. A BVDV anti-gen– and antibody blocking ELISA (DVIV) system used in a Danish voluntary eradication program, *Proceedings of the 3er Symposium on Pestiviruses*, sept. 1996, Lelystad, Netherlands. *ESVV*, pp. 150–153.
120. Rossmanith W, Vilcek S, Wenzl H, Rossmanith E, Loitsch A, et al. Improved antigen and nucleic acid detection in a Bovine Viral Diarrhea Virus eradication program. *Vet microbial* 2001; 81: 207-218.
121. Saliki J, Dubovi E. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet Clin Food Anim* 2004; 20: 69-83.
122. Saliki J, Dubovi E. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet Clin Food Anim* 2004; 20: 69-83. ; Sandvik T. Selection and use laboratory diagnostic assays in BVD control programmers. *Prev Vet Medicine* 2005; 72: 3-16.
123. Sandvik T. 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet. Microbiol.* 64: 123–134.
124. Sandvik T. Progress of control and prevention programs for Bovine Viral Diarrhea Virus in Europe. *Vet Clin Food Anim* 2004; 20: 151-169.; Synge B, Clark A, Moar J, Nicolson T, Nettleton P, et al. Control of Bovine Viral Diarrhea Virus In Shetland. *Vet Microbiol* 1999; 64: 223-229.



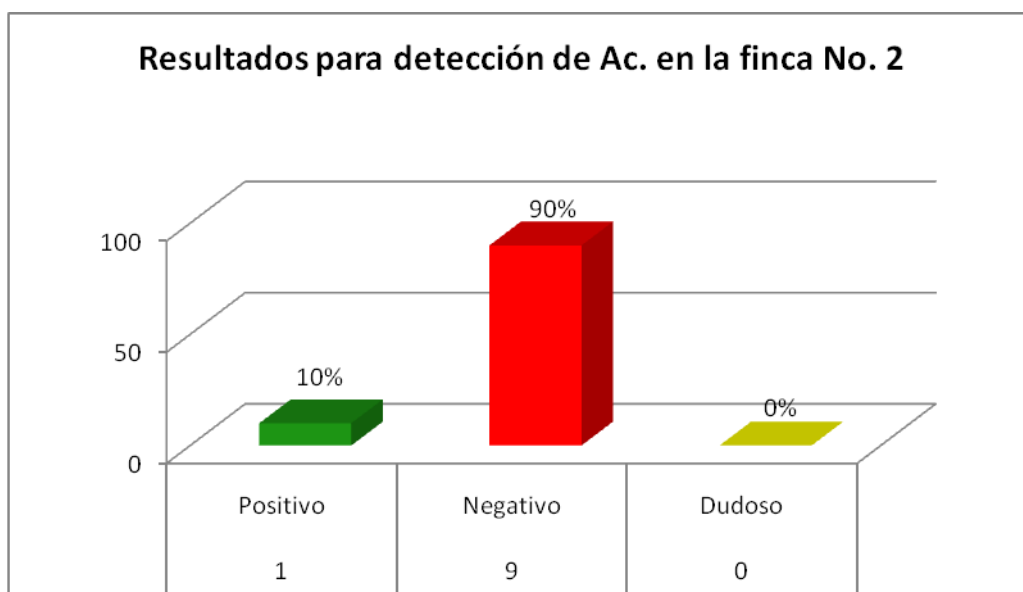
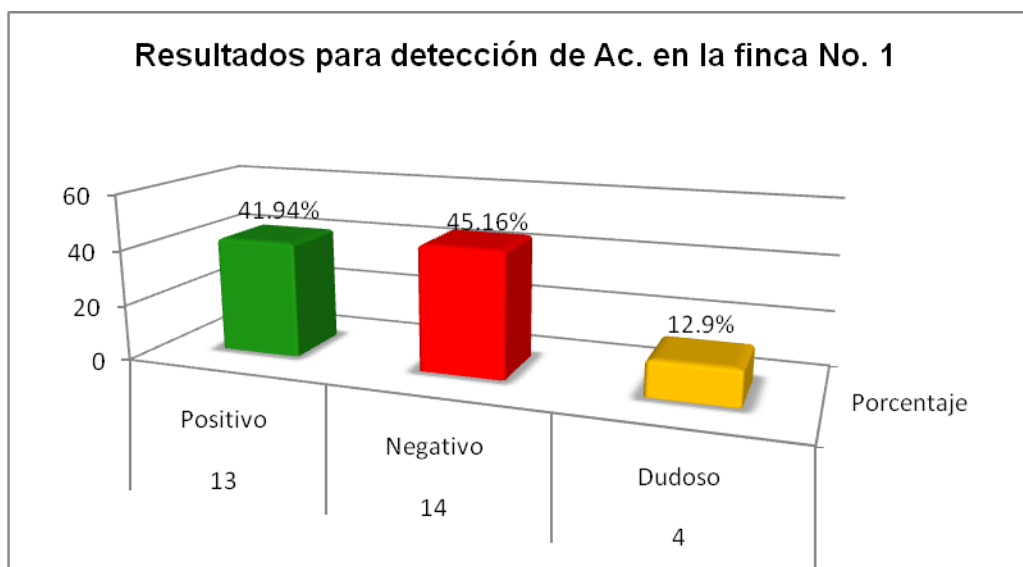
125. Sandvik T. Selection and use laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Prev Vet Medicine* 2005; 72: 3-16.
126. Stokstad M, Brownlie J, Collins M. Analysis of variation BVDV E2 sequence following transplacental infection in cattle. *Vet Microbiol* 2004; 102: 141-45.
127. Stringfellow DA, Givens MD. 2000. Epidemiologic concerns relative to in vivo and in vitro production of livestock embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61: 629–642.
128. Thür B, Hilber M, Strasser M, Ehrensperger F. 1997. Immunohistochemical diagnosis of Pestivirus infections associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. *Am. J. Vet. Res.* 58: 1371–1375.
129. Tremblay R. 1996. Transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Med.* 91: 858–866.
130. Vanroose G, De Kruif A, Van Soom A. 2000. Embryonic mortality and embryo–pathogen interactions. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61: 131–143.
131. Vera V, Ramirez G, Villamil L, Jaime J. *Biología molecular, epidemiología y control de IBR y BVDV*. ed. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá 2003.
132. Vilcek S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmanith W, Vega S, Scicluna MT, Paifi V. 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 146: 99–115.
133. Walz P, Bell T, Wells J, Grooms D, Kaiser L, et al. Relationship between degree of viremia and disease manifestations in calves with experimentally induced bovine viral diarrhoea virus infection. *Am J Vet Res* 2001; 62: 1095-1103.



134. Walz PH, Steficek BA, Baker JC. 1999. Effect of experimentally induced type II bovine viral diarrhea virus infections on platelet function in calves. Am. J. Vet. Res. 60: 1396–1401.
135. Ward P, Misra V. 1991. Detection of bovine viral diarrhea virus, using degenerate oligonucleotide primers and the polymerase chain reaction. Am. J. Vet Res. 52: 1231–1236.
136. Wengler G. 1991. Family Flaviviridae. Arch Virol (Suppl) 2: 228-229.
137. Young N, Thomas C, Thompson I, Collins M, Brownlie J. Immune responses to non-structural protein 3 (NS3) of BVDV in NS3 DNA vaccinated and naturally infected cattle. Prev Vet Med 2005; 72: 115-120.

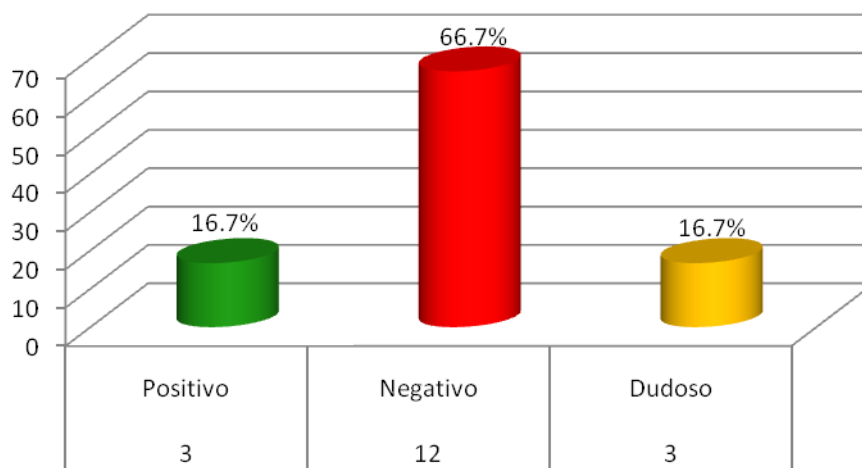


ANEXOS

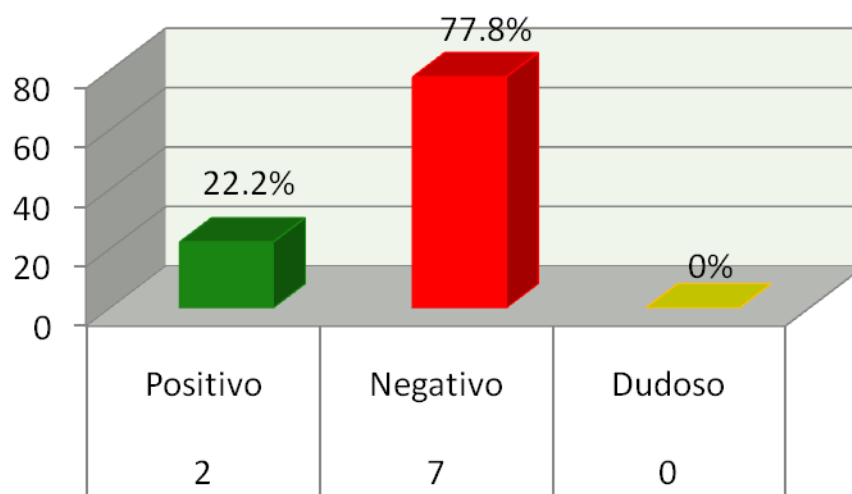




Resultados para detección de Ac. en la finca No. 3

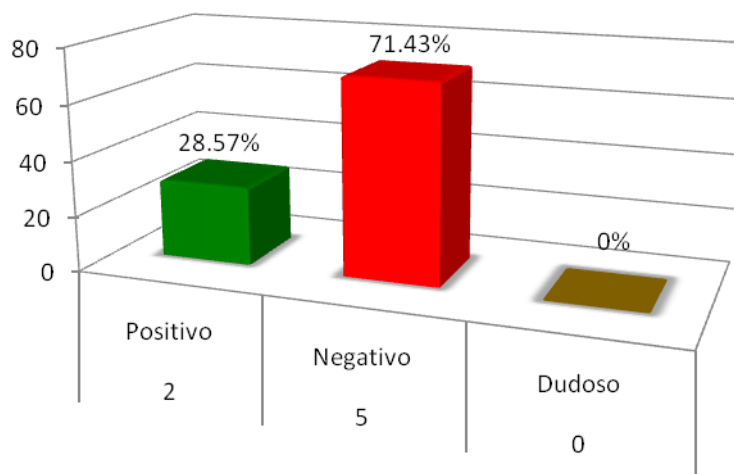


Resultados para detección de Ac. en la finca No. 4

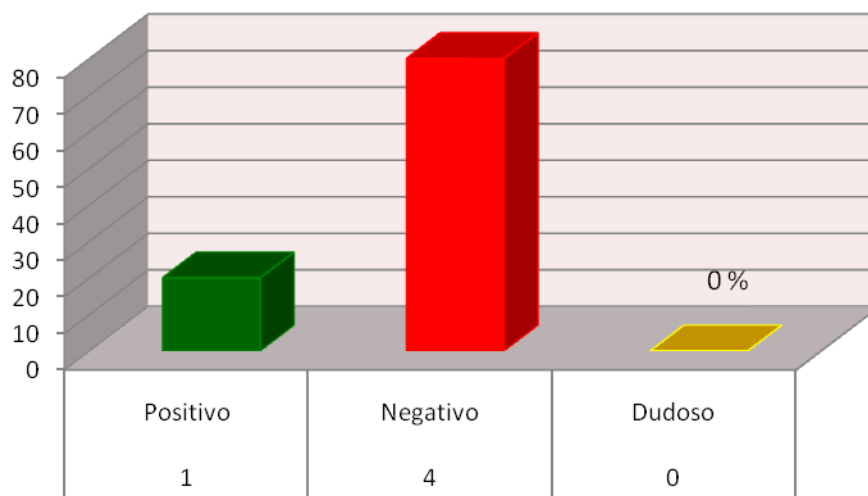


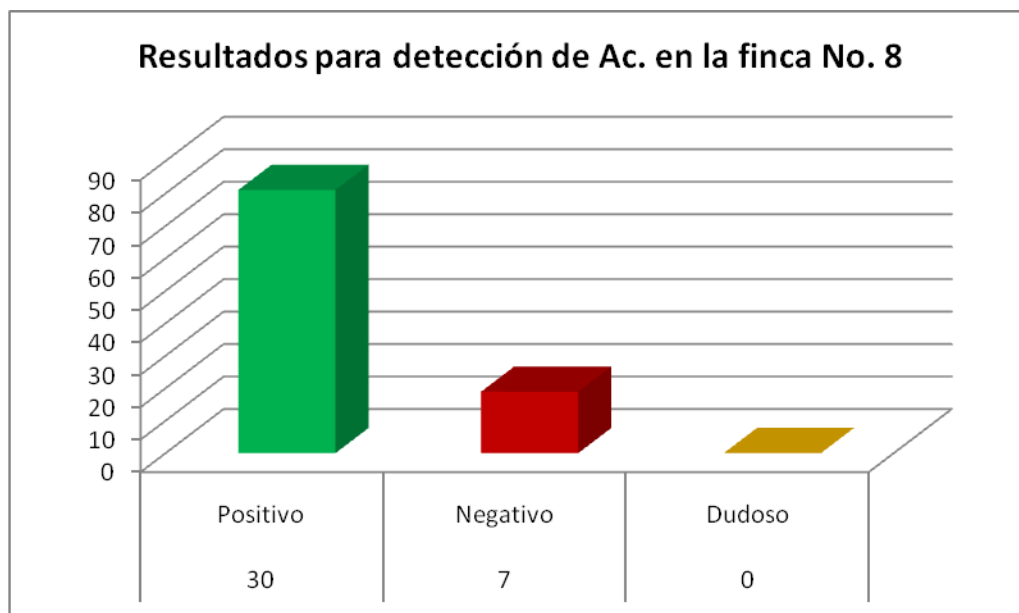
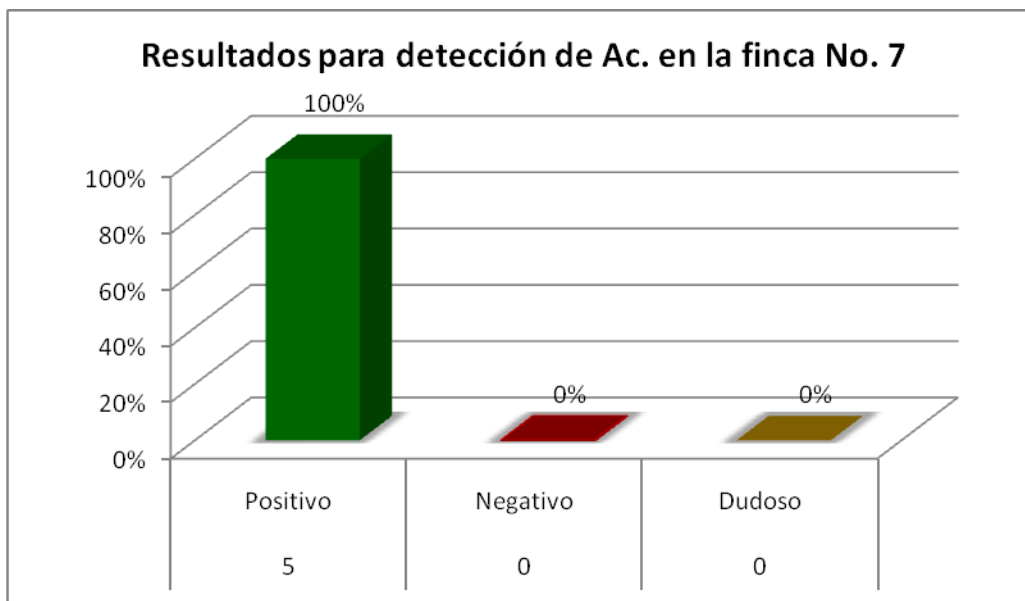


Resultados para detección de Ac. en la finca No. 5



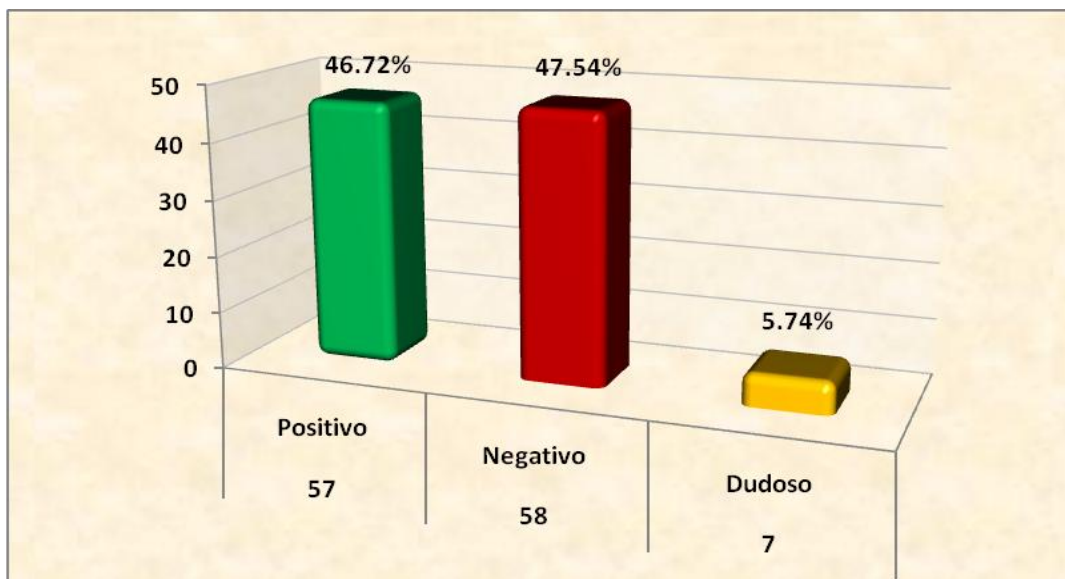
Resultados para detección de Ac. en la finca No. 6



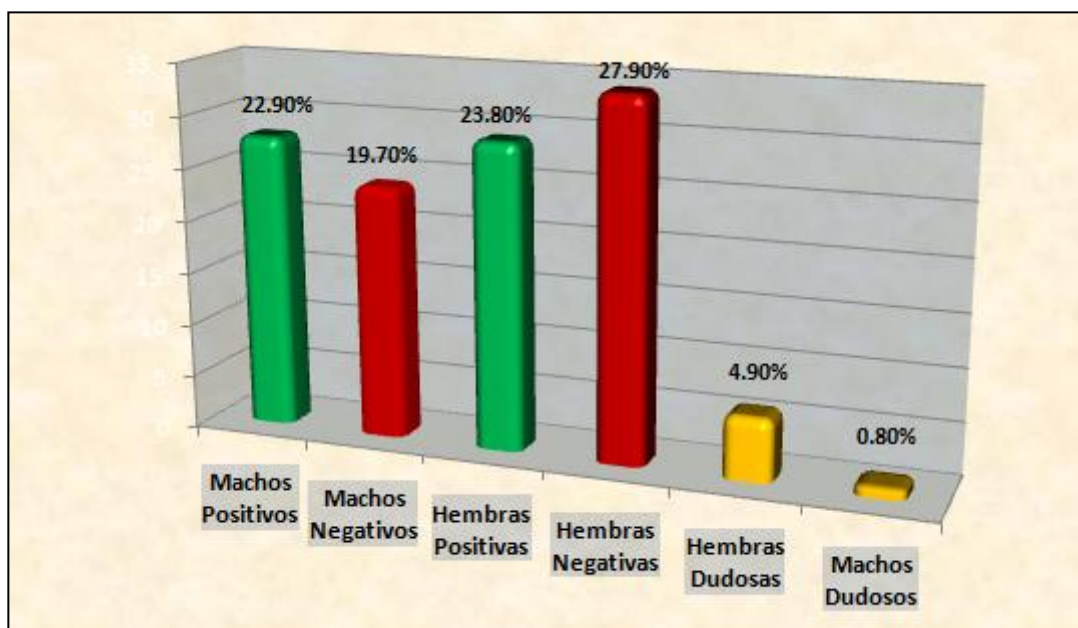




Resultados obtenidos en la prueba de ELISA Ac. en todas las fincas



Gráfica comparativa según el sexo de los terneros.





Resultados obtenidos en la prueba de ELISA Ag. en todas las fincas

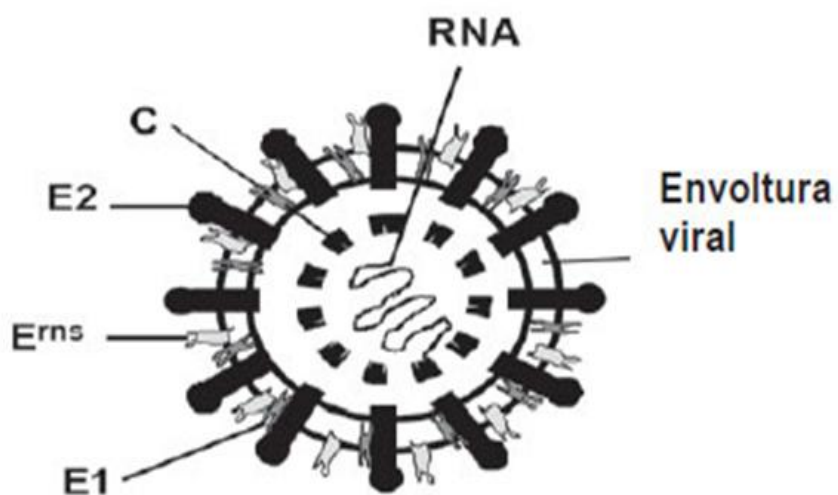
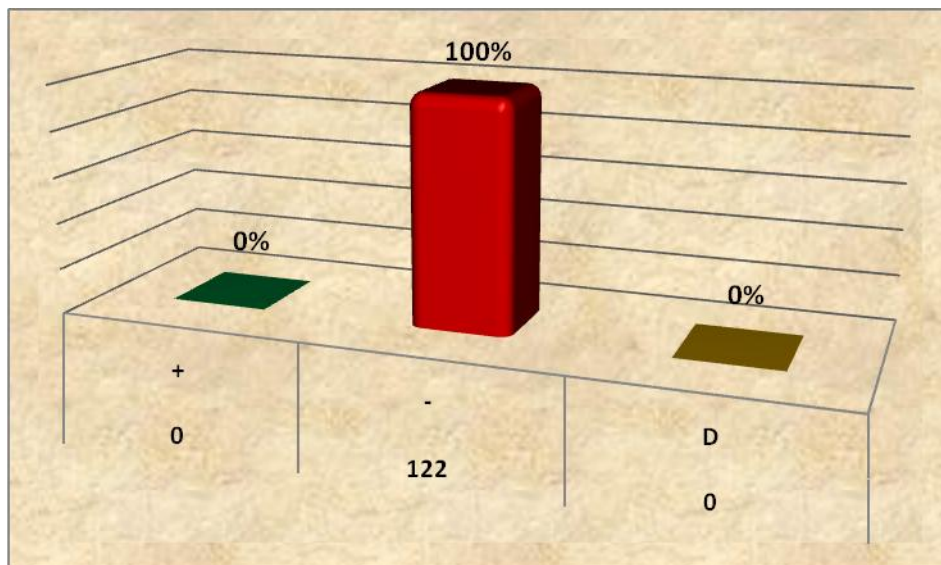


Figura 1. Representación esquemática del virión del BVDV. El BVDV está constituido por 3 proteínas de envoltura (Erns, E1 y E2) y la proteína de la cápside viral la cual empaqueta el ARN genómico.

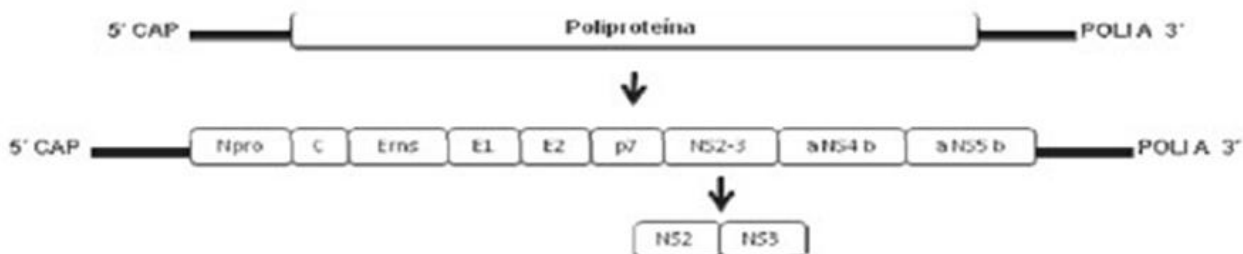


Figura 2. Representación esquemática del genoma del VDBV. El BVDV está compuesto por 4 proteínas virales estructurales (C, Erns, E1 y E2) y de 7 a 8 proteínas no estructurales dependiendo el biotipo. Esta diferencia de proteínas en los biotipos ocurre por clivaje de la NS2-3 en los biotipos cp dando origen a la proteína NS3.

Primer Síndrome: Diarrea Viral



Segundo Síndrome: Persistentemente infectados



Tercer Síndrome: Enfermedad de las mucosas

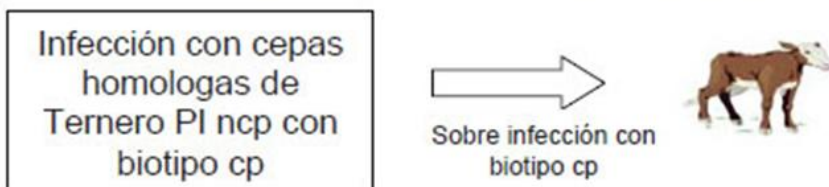


Figura 3. Diagrama de los diferentes síndromes ocasionados por la infección con VDBV. La infección posnatal es la forma clásica de la enfermedad, la cual resulta en infección subclínica o enfermedad severa. El desarrollo de la infección persistente se debe a la exposición al virus en el primer tercio de la gestación cuando el sistema inmune del feto está en desarrollo, convirtiendo a los terneros en los principales diseminadores de la enfermedad. La enfermedad de las mucosas se desarrolla a partir de animales PI que adquieren un virus citopático.



Tabla 1. Vacunas disponibles para el control de BVDV. Adaptado de Registro de Biológicos veterinarios vigentes 2008, <http://www.ica.gov.co>

Biológicos disponibles para BVDV en Colombia			
Laboratorio	Nombre	Componentes	Tipo de vacuna para DVB
Novartis	Viral Shield 4	IBR, DVB cp y ncp; PI -3,BRSV	Inactivada*
	Viral Shield 6+VL5	<i>Campylobacter fetus</i> , <i>Leptospira spp</i> (5)	
Fort Dodge	Triangle 3	IBR, DVB cp y ncp; PI -3,BRSV	Inactivada**
	Traingle 8 +II DVB	IBR, DVB I y II, PI-3,VRSB, <i>Leptospira spp</i> (5)	
Pfizer	Bovishield 4	IBR, DVB I y II, PI -3,BRSV	LMV***
	Bovishiel Gold FP5 +L5	IBR, DVB, PI -3,VRSB, <i>Leptospira spp</i> (5)	Inactivado***
	Cattle Master 4	IBR, DVB, PI -3,BRSV	
Santa Helena	Bovisan	IBR, DVB, <i>Campylobacter fetus</i> , <i>Leptospira spp.</i>	Inactivado
Tecnovax	Providean respiratoria	IBR, DVB,PI3, <i>Pasteurella haemolytica</i> y <i>multocida</i> , <i>Haemophilus sommus</i>	Inactivado****
	Providean reproductiva	IBR, DVB, <i>Leptospira spp.</i> (5), <i>Campylobacter foetus</i> , <i>Haemophilus sommus</i>	

Tomado de: *<http://www.vecol.com>, **www.fortdodge.com, ***www.tecnovet.com, ****www.tecnovax.com.





**Determinación de terneros permanentemente infectados (PI) de 3 a 12 meses de edad con el Virus de la
Diarrea Vírica Bovina (vDVB) en el municipio de León.**

