

Capítulo XLVI

Actualidad en el manejo y control de la diarrea viral bovina

César Torrano J.

El virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB) fue identificado por primera vez en 1946 como la causa de abortos en vacas y de diarreas y úlceras en las mucosas del ganado. En la actualidad se conoce que debido a su carácter inmunosupresor, el virus de DVB está asociado a una gran variedad de enfermedades como son: Neosporosis, Salmonelosis, *Moraxela bovis*, Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y virus respiratorio sincicial bovino (BRSV), entre muchas otras enfermedades infecciosas.

Tanto en la ganadería lechera como de recría más del 75% de los casos de DVB transcurren de manera subclínica; sin embargo, no es de extrañar que las enfermedades más impactantes, asociadas a DVB, están relacionadas con la reproducción (Grooms, 2004), prolongando el periodo entre partos. La presencia del virus de DVB ocasiona una disminución de la fertilidad en vacas debido a problemas reproductivos, pérdidas embrionarias, abortos y malformaciones congénitas en terneros, así como el nacimiento de becerros con poco peso y débiles. Es por ello que este tipo de manifestaciones capte más la atención que sus efectos inmunosupresores.

En otras áreas de la ganadería bovina, los problemas de salud del virus de DVB pueden también incluir distintos niveles de diarrea y neumonía en animales lactantes o en terneros destetados, los cuales también generan suficiente alarma. A pesar que la presencia de animales persistentemente infectados (PI) del virus de DVB fluctúa entre 0,4% y 1,7%, estos niveles resultan más que suficiente para considerarse como la enfermedad de mayor impacto económico dentro de la ganaderías de USA (Wittum *et al.*, 2001). De acuerdo al Servicio de Inspección de Salud Agrícola y Animal (APHIS) en el 2007, las pérdidas económicas en casos de brotes de DVB fluctúan desde \$50 a un máximo de \$100 dólares por vaca (Elam, 2008), mientras que Larson *et al.* (2004) estimaron un costo de \$20 dólares por animal en las ganaderías de carne.

En la actualidad, el control de DVB se centra en 4 puntos principales que tienen la finalidad de eliminar la presencia de animales PI:

1. Erradicación de animales PI implementando actividades de diagnóstico.
2. Vacunación con productos que garanticen en su etiqueta, la prevención en vacas gestantes contra el desarrollo de animales Persistentemente Infectados y que contengan los genotipos 1 y 2 del virus de DVB.
3. Implementar actividades de bioseguridad y prevención de hato.
4. Estrategias de monitoreo.

El futuro inmediato en el control de DVB encuentra una alternativa mediante el uso de estudios genéticos destinados a determinar la predisposición a procrear nacimientos de animales PI, ya que se ha encontrado en el cromosoma 2 y 26 de *Bos taurus* y de cruces Brahman x Hereford locis que permitirán seleccionar ganado que no genere este tipo de animales PI, inmunotolerantes (Neibergs *et al.*, 2011) y ahora estas bases científicas están dado paso a productos comerciables para identificar al ganado de acuerdo a las características de su genoma mediante la identificación de marcadores genéticos <https://animalhealth.pfizer.com/sites/pahweb/US/EN/Pages/Animal%20Genetics.aspx>

BIOLOGÍA MOLECULAR

El virus de DVB pertenece a la familia Flaviviridae miembro del género de los pestivirus de polaridad positiva envuelto en cadena o ARN de filamento simple. El tamaño de su genoma ARN es ligeramente diferente entre cada virus aislado con un promedio de 12,5 kilobases (Kb) de largo. Contienen una estructura larga denominada marco abierto de lectura (ORF) que codifica un polipéptido que después de su translación genera 4 áreas estructurales y por lo menos 6 proteínas no estructurales (Figura 1). Las proteínas estructurales se codifican en el genoma 5 y su gran ORF esta enmarcado por 5 regiones no traducidas (UTR) y 3 UTRs. Las UTR 3 y 5 no son grandes (con bases de 360 a 390 y de 200 a 240 respectivamente) comparadas con el tamaño del genoma del virus.

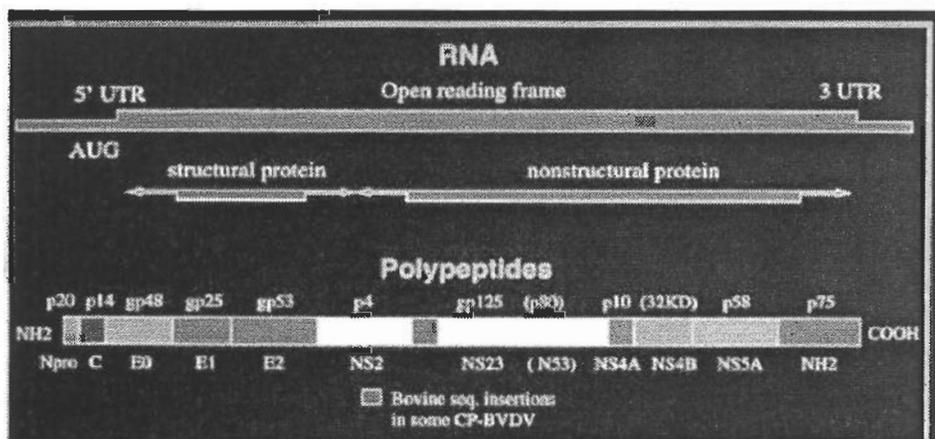


Figura 1. Secuencia genómica del virus de la DVB.

La secuencia que se encuentra en el UTR 5 es la parte del genoma que muestra niveles más elevados de conservación. Por otro lado, la secuencia que menos se conserva dentro del genoma es la que codifica para la estructura proteica del virus denominado E2 (o gp53). Se sabe que los epítopes neutralizantes son precisamente los que se encuentran en esta proteína E2. Cada vez que el virus replica se generan más de 125 mutaciones cambiando proteínas codificadas en esta región lo que resulta en importantes variaciones antigénicas que le permiten al virus evadir la respuesta inmune.

GENOTIPOS DEL VIRUS DE DVB

Cuando se comparan las bases de distintos virus de DVB, estas evaluaciones se llevan a cabo precisamente en la secuencia de esta región 5 UTR, que a la fecha han dado origen a dos grandes genotipos, los virus de DVB tipo 1 y tipo 2 con muchos sub-genotipos en cada uno. Ambos genotipos inducen enfermedad similar, sin embargo, el genotipo 2 se ha asociado con signos clínicos más severos aun en el ganado adulto, incluyendo trombocitopenia (niveles reducidos de plaquetas), sin que con esto no se encuentren también genotipos del tipo 2 que pueden no ser tan patógenos.

Muchos, si no es que la mayoría de los problemas en el diagnóstico y el control de la enfermedad ocasionada por el virus de DVB pueden ser explicados por la existencia de estos dos genotipos y de sus mutaciones. Los investigadores han demostrado diferencias en su patogenicidad y antigenicidad expuesto en mapeos de anticuerpos monoclonales, comprobando que existen fallas en la inmunización mediante el uso de vacunas con protección cruzada muy pobre o nula (Bolin *et al.*, 2009; Ridpath *et al.*, 2011).

BIOTIPOS DEL VIRUS DE DVB

Existen dos biotipos del virus de DVB, el virus citopático (CP) cuyas cepas destruyen el epitelio celular de los cultivos *in vitro*, y los no-citopáticos (NCP) que son el estado natural del virus que representa del 90% al 95% de los virus en campo. Ambos biotipos se encuentran indistintamente dentro de los diferentes genotipos 1 y 2 antes mencionados. Es ampliamente reconocido que los biotipos citopáticos emergen en la naturaleza por mutación de los virus no-citopáticos, sin que esto tenga ningún impacto en la respuesta inmune específica, reconocido así desde hace mucho tiempo (Ridpath *et al.*, 1994). Los virus citopáticos muestran una proteína adicional (p120) que ocasiona la muerte de las células *in vitro*, por lo que al contrario de lo que se podría pensar las vacunas originadas de cepas citopáticas tienen más epítopes al contener todas las proteínas de las cepas no-citopáticas más este epítipo p120, por lo que se esperaría una mejor protección de aquella vacuna proveniente de cepas "citopáticas" como la de Cattle Master® GOLD, aunque el biotipo de los virus en las vacunas no correlaciona con protección, independientemente de que ambos biotipos no muestran ninguna diferencia en su patogenicidad en los animales, a diferencia de su característica genotípica.

ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI)

La infección persistente en el ganado ocurre cuando una vaca gestante se infecta con el virus no citopático de DVB aproximadamente entre el día 40 y 125 de gestación; los virus pasan al feto pudiendo o no ocasionar defectos congénitos generando el naci-

miento de un ternero Persistentemente Infectado (PI). Antes de contar con la capacidad de diagnóstico que ahora existe, se estimaba que los animales PI no lograban subsistir por periodos prolongados y que siempre mostraban signos severos como diarrea sanguinolenta y úlceras en membranas mucosas con fallecimientos tempranos. En la actualidad, se estima que 17% del 50% de animales PI logran llegar a su etapa reproductiva y 68% de los animales PI logran llegar al peso de sacrificio (Larson *et al.*, 2004), mientras que en otro estudio el 71% de estos animales lograron llegar al peso final de sacrificio (Hessman, 2006), lo que se demuestra por evidencias de que la apariencia saludable de los terneros (Foto 1), no garantiza de que no se trate de un animal PI.

Debido a que diariamente y durante todos los días de su vida, estos animales PI están eliminando millones de partículas virales al medio ambiente, es la razón por la que la presencia de animales PI impacta en una reducción del 4,1% en las ganancias diarias de peso, aunque favorablemente el impacto no es tan negativo cuando se muestra una diferencia significativa a favor de animales previamente vacunados con ambos genotipos 1 y 2 de DVB.

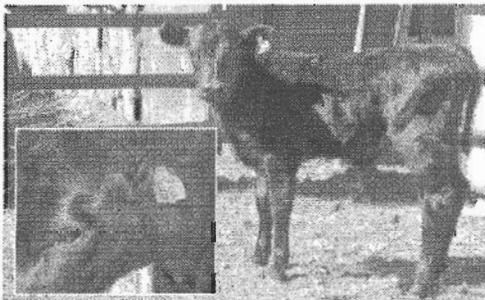


Foto 1. Animal PI aparentemente sano, positivo al virus de DVB mediante IHC con doble muestra de tejido de oreja.

SIGNOS CLÍNICOS

La infección del virus de DVB puede manifestarse en una gran variedad de formas, pero los efectos más visibles y significativos ocurren en forma rutinaria después de la infección en vacas gestantes. Las vacas infectadas con el virus de DVB raramente muestran signos de enfermedad, pero el efecto en el feto puede ser devastador. El efecto del virus de DVB también varía dependiendo

del estadio de la gestación, del biotipo y del genotipo del virus de DVB (Grooms, 2004). De acuerdo a la etapa de gestación podemos encontrar:

Día 0 a 45 de gestación: Muerte embrionaria o fetal debido tanto a los biotipos CP y NCP.

Día 40 a 124 de gestación: El biotipo CP raramente induce la muerte fetal y el aborto o momificación. El biotipo NCP resulta en infección del feto e inmunotolerancia al VDVB. Los becerros infectados en este periodo se convierten en animales PI y secretan enormes cantidades de partículas virales durante TODA su vida. Los defectos en ojos y cerebelo pueden estar presentes en algunos casos.

Día 100 al 150 de gestación: Esta es la etapa donde comienza la respuesta inmune fetal ya sea virus CP o NCP; ambos virus pueden ocasionar defectos congénitos (cerebro/ojos) en los becerros, pero ya no se induce inmunotolerancia y/o animales PI. También podemos encontrar aborto en esta etapa.

Día 125 al término de la gestación: Nacimiento de terneros normales con evidencia de respuesta inmune, pero también pueden tener abortos o nacimientos de terneros débiles.

La infección persistente ocurre cuando una vaca gestante infectada durante los días 40 a 120 de gestación pasa el virus de DVB del biotipo NCP al feto, pero estos terneros no siempre tienen defectos congénitos, pero si eliminarán millones de partículas virales en forma constante en todas sus secreciones nasales, orales, urinarias y en el excremento. Paradójicamente algunos de estos animales PI pueden ganar peso en forma relativamente normal, y en ocasiones hasta pueden formar parte del grupo de reemplazos. Los animales Persistentemente Infectados son la fuente principal de la infección en el hato (Larson *et al.*, 2004). Las vacas que logran integrar el hato reproductor siempre parirán animales PI. Sin embargo, más del 90% de animales PI son el resultado de vacas con infecciones transitorias del virus de DVB (Wittum *et al.*, 2001).

Terneros que han nacido normales y que muestran anticuerpos al virus de DVB en muestras tomadas antes de recibir calostro, son el resultado de infecciones después del día 125 de gestación y estos terneros no representan un problema de nuevas infecciones, ya que fueron expuestos al virus pero tuvieron respuesta inmune y han eliminado al virus.

Otros signos notables incluyen fiebre, reducción en los consumos de alimento, síntomas de tipo digestivo y respiratorio, infertilidad, incremento de la mortalidad embrionaria y fetal, momificaciones, defectos congénitos, pérdidas económicas en hatos, terneros pequeños o débiles, incremento en la eliminación de animales retrasados. Los signos clínicos en animales adultos incluyen:

- a) Fiebre no específica o relacionada a alguna enfermedad o en situaciones de estrés.
- b) Disminución de la fertilidad.
- c) Incremento de los índices de abortos (> 3% anual).
- d) Incremento de animales nacidos muertos por arriba del 4 al 5% (DOA).

Todas estas condiciones conllevan a una reducción en la producción láctea y menores ganancias económicas. El virus de DVB también reduce la resistencia y la habilidad de las vacas para evitar enfermedades incluyendo mastitis, laminitis y neumonías.

Los animales PI tienen forzosamente que ser eliminados del hato ya que no hay cura, por lo que una vez identificado deberá sacrificarse de forma humanitaria. La carne de un animal PI puede ser consumida con seguridad por los seres humanos, ya que el virus de DVB no es patógeno para los seres humanos.

El virus se distribuye por contacto directo con la saliva, orina o excremento de animales PI o animales transitoriamente infectados. De igual manera, el contacto con el semen de un toro positivo puede infectar a algún animal que no este adecuadamente vacunado, fenómeno que puede continuarse hasta por seis meses después de que este toro fue infectado, ya que el virus puede mantenerse en constante replicación en los testículos.

DIAGNÓSTICO DE DVB Y/O ANIMALES PI

La única manera de identificar a los animales PI es a través de pruebas de diagnóstico. **Existen varias pruebas** disponibles para identificar animales positivos al virus de DVB, las cuales incluyen aislamiento viral, que a pesar de ser la prueba más contundente para otras enfermedades, en el caso de DVB no resulta ser la prueba más eficiente para la identificación de antígeno. Las otras pruebas como las denominadas PCR (Reacción de la Cadena de Peroxidasa) y rtPCR, la misma prueba en tiempo real son muy confiables pero deben realizarse en laboratorios con mucha experiencia. Otra prueba muy popular es la de Inmuno-histoquímica (IHC) mediante el uso de una muesca de piel tomada comúnmente en la oreja (Foto 2); la muestra se fija en 5 ml de solución formol neutro-tampón (100 ml de formaldehído al 37% + 6,5 gr. de fosfato de sodio dibásico + 4 gr fosfato de sodio monobásico + 900 ml de agua destilada), para enviarlo al laboratorio antes de una semana.



Foto 2: Muestreo de piel para realizar prueba de Inmuno-histoquímica para diagnóstico de animales PI

Las pruebas de serología aunque con resultados de sensibilidad y especificidad menos eficiente son una alternativa mucho más accesible en sitios donde no se encuentran laboratorios con un alto nivel tecnológico, además de ser un poco más económicas, por lo que su accesibilidad pone a estas pruebas de captura de antígeno por ELISA: SERELISA® BVD p80 Mono indirecto y determinación de anticuerpos también por ELISA: SERELISA® BVD p80 Mono Blocking test, como las pruebas más idóneas para campo. Cualquier prueba para determinar animales PI que resulte positiva deberá de repetirse ya que pudiera tratarse de una infección transitoria en la cual también el virus está replicándose. Si al repetirla 3 semanas después, la prueba sale nuevamente positiva, sin duda alguna ese animal será PI y como se mencionó anteriormente, ese animal deberá de ser eliminado del hato sin importar su valor genético, ya que genera muchísimo más daño al mismo propietario que el intentar conservarlo.

ESTRATEGIAS DE VIGILANCIA Y MONITOREO

Se recomienda, como medida preventiva, mantener constante alguna de las 3 estrategias de monitoreo, particularmente cuando aún no se sospecha de tener presencia/problemas con DVB.

Estrategia 1. Estrategia de bajo costo y de baja sensibilidad.

- Evaluar (muestrear) la población de animales con 21 días de gestación.
- Muestrear animales nacidos muertos, determinar morbilidad neonatal y presencia de mortalidad neonatal y determinar cuál es el nivel de porcentaje de destete.
- Realizar necropsias y someter tejidos a diagnóstico de laboratorio en timo, placas de Peyer, bazo, hígado, piel y sangre, de todos los abortos, neonatos y terneros muertos antes del destete.

Estrategia 2. Estrategia de costo moderado y alta sensibilidad

- Identificar animales PI antes de comenzar la etapa de reproducción y antes de que el toro se integre al hato.
- Haga mezclas de 20 a 30 muestras grupales y repita aquellos resultados positivos solamente.
- Recuerde que PCR no diferencia de animales transitoriamente (activamente) infectados de aquellos animales PI por lo que se recomienda correr otro tipo de prueba como Inmunohistoquímica (IHC) o ELISA.
- Mandar mezcla de sangre o de muescas de orejas para análisis en grupo con PCR, de toda la población de crías, terneros y terneras.

Estrategia 3. Estrategia de costos altos y alta sensibilidad

- Llevar a cabo en todos los animales las pruebas en piel de IHC o captura de antígeno por ELISA.
- Identificar animales PI antes de iniciar la etapa de reproducción en el hato.
- Hacerla antes de introducir al toro semental dentro del hato reproductor.

Vacunación

Los dos principales objetivos de la vacunación contra el virus de DVB son evitar y/o detener la aparición de animales PI y proteger clínicamente a los animales sanos. Al comparar el uso de vacunas que contienen ambos genotipos 1 y 2 del virus de DVB contra aquellas vacunas que solo contienen el genotipo 1 de DVB, se ha demostrado que estas últimas solo otorgan una protección limitada del 65% contra la infección del feto del genotipo 2, por lo que se hace evidente que este principal objetivo solo se logra adecuadamente cuando se emplean vacunas que contienen ambos genotipos 1 y 2 del virus de DVB como los contenidos en Cattle Master® GOLD (Figura 2).

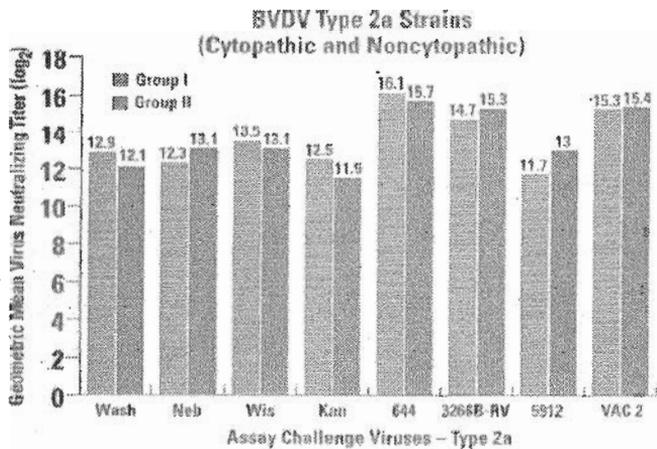


Figura 2. Media geométrica de título de anticuerpos neutralizantes del virus de DVB tipo 2 de bovinos vacunados con Cattle Master® GOLD.

La vacunación se deberá ejercer antes de la inseminación o monta, de preferencia 30 días antes, usando las vacunas a virus vivo en aquellos países donde se tengan registradas y solo aquellas vacunas que demuestren la mayor eficacia ante el desafío de la prevención contra la infección fetal de ambos genotipos. En caso contrario, se deberán emplear vacunas con virus muertos, que también contengan ambos genotipos, asegurando aplicar la segunda dosis, en aquellos animales con primo-vacunación (cuando se van a vacunar por primera vez en su vida o han pasado más de 12 meses de su última vacuna); esta segunda dosis se debe realizar 21 después de la primera dosis y un mes antes de la monta y/o inseminación artificial. Lo que se busca es acercar la última dosis al momento de la monta con la finalidad de elevar al máximo los anticuerpos durante la edad fetal de riesgo a la creación de animales PI, hacia los 40 a 120 días de gestación.

Ninguna vacuna puede evitar que un animal PI continúe eliminando virus patógeno al medio ambiente. La vacunación de 3 dosis en novillas antes de el primer servicio es una práctica sumamente recomendada, recordando que las dos primeras dosis en primo-vacunación deberán tener un espacio de 21 días entre cada una, con revacunaciones anuales para evitar perder la población de linfocitos T y B de memoria específicos para DVB Tipo 1 y 2.

En EUA, el porcentaje promedio de hatos que vacunan contra el virus de DVB es alrededor del 75% en vacas y 73,7% en novillas, pero estos porcentajes son mayores en las ganaderías grandes, lo que demuestra que cuando se tiene más tecnificación y servicios de monitoreo y diagnóstico, la necesidad de proteger contra ambos genotipos de DVB se hace más evidente y necesaria ya que los porcentajes de vacunación son mayores al 95% (Figura 3).

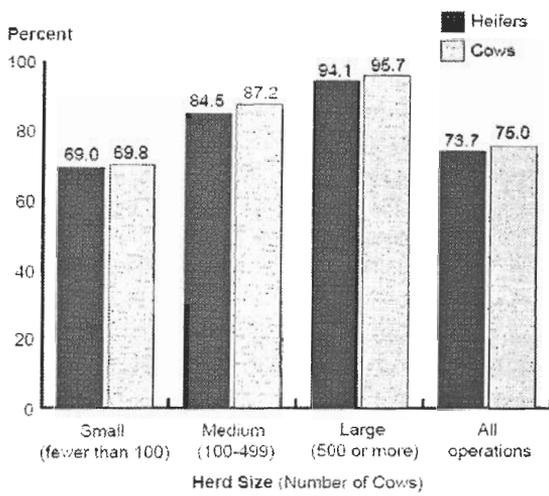


Figura 3. Promedio de hatos vacunados contra el virus de DVB en USA, en relación con el tamaño del hato en vacas y novillas.

CONCLUSIONES

El virus de Diarrea Viral Bovina (DVB) por su carácter inmunosupresor, no permite visualizar claramente su gran impacto devastador en la economía de la ganadería en América Latina. Solamente el 25% de los casos se manifiesta con relativa claridad cuando alguna de las cepas presentes actúa de forma más patógena o ataca a los hatos que no cuentan con una adecuada protección inmune.

Se sabe que en medicina veterinaria a toda aquella enfermedad que no sea diagnosticada y evaluada, no se le podrá medir su impacto y sus efectos en la ganadería y lamentablemente este es el caso en los países latinoamericanos para la enfermedad de DVB.

A manera de analogía, con lo que se sabe de DVB en otros países, lo menos que podemos hacer para proteger a nuestros hatos es poner en práctica actividades encaminadas a controlar y/o disminuir los efectos negativos de esta devastadora enfermedad.

Existen 4 puntos principales que tienen como principal finalidad eliminar la presencia de animales Persistentemente Infectados (PI), a saber:

1. Erradicación de animales PI implementando actividades de diagnóstico.
2. Vacunación con productos que garanticen en su etiqueta, la prevención en vacas gestantes contra el desarrollo de animales PI y que contengan los genotipos 1 y 2 del virus de DVB.
3. Implementar actividades de bioseguridad y prevención de los rebaños.
4. Llevar a cabo alguna de las Estrategias de Monitoreo sugeridas en este artículo o alguna otra fuente experta en evaluaciones epidemiológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bolin S, Lim A, Grotelueschen DM, McBeth WW, Cortese VS. 2009. Genetic characterization of bovine viral diarrhoea viruses isolated from persistently infected calves born to dams vaccinated against bovine viral diarrhoea virus before breeding. *Am J V Res.* 70 (1) 86-91.
- Elam NA, Thomson DU, Gleghorn JF. 2008. Effects of long- or short-term exposure to a calf identified as persistently infected with bovine viral diarrhoea virus on feedlot performance of freshly weaned, transport-stressed beef heifers. *J Anim Sci* 86:1917-1924.
- Grooms DL. 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 20(1):5-19.
- Hessman B. 2006. Effects of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) persistently infected (PI) calves in the feedyard and management of PI calves after initial identification. Proc. BVD conference administered by Conference of Research Workers in Animal Disease. Denver, CO 41.
- Larson RL, Tyler JW, Schultz LG, Tessman RK, Hostetler DE. 2004. Management strategies to decrease calf death losses in beef herds. *JAVMA* 224 (1): 42-48.
- Neiberghs H, Zanella R, Casas E, Snowden GD, Wenz J, Neiberghs JS, Moore D. 2011. Location on *Bos taurus* chromosome 2 and *Bos taurus* chromosome 26 are linked with bovine respiratory disease and associated with persistent infection of bovine viral diarrhoea virus. *J Anim Sci* 89:907-915.
- Ridpath JF, Lovell G, Neill JD, Hairgrove TB, Velayudhan B, Mock R. 2011. Change in predominance of Bovine Viral Diarrhoea virus subgenotypes among samples submitted to a diagnostic laboratory over a 20-year time span. *J Vet Diag Invest.* 23 (2):185-193.
- Ridpath JF, Qi F, Bolin SR, Berry ES. 1994. Natural recombination in bovine viral diarrhoea viruses. *Arch Virol Suppl* 9:239-244.
- Wittum TE, Grotelueschen DM, Brock KV, Kvasnicka WG, Floyd JG, Kelling CL, Odde KG. 2001. Persistent Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection in US Beef Herds. *Prev Vet Med* 49: 1-2: 83-94.