

Capítulo LIII

Diagnóstico de la diarrea viral bovina para la mejora de la eficiencia reproductiva en la Ganadería de Doble Propósito

Roberto A. Palomares-Naveda, MSc

INTRODUCCIÓN

Para lograr una alta eficiencia reproductiva y garantizar la rentabilidad y sostenibilidad de la ganadería de doble propósito, es necesario que las vacas alcancen un intervalo entre partos menores de 13 meses, por lo cual deben preñarse antes de los 90 días postparto. Entre los principales problemas reproductivos que limitan el cumplimiento de estas metas se incluyen el anestro postparto, fallas en la concepción con servicios repetidos, abortos, entre otros.

La repetición de servicios o subfertilidad es considerada después del anestro postparto la causa principal de baja eficiencia reproductiva en la ganadería de doble propósito en el trópico (González-Stagnaro *et al.*, 1988). Desde el punto de vista reproductivo, una vaca se considera subfértil o repetidora cuando necesita tres o más inseminaciones para concebir y no existe un causal clínico evidente (Morrow, 1980). En explotaciones de doble propósito de la cuenca del Lago de Maracaibo-Venezuela, la frecuencia de vacas repetidoras osciló entre 17,5 y 48,0% de los problemas reproductivos existentes entre los años 1968 y 1987 (González-Stagnaro *et al.*, 1988). La etiología de los problemas de subfertilidad es diversa y multifactorial siendo consecuencia de la acción combinada y aditiva de factores hormonales, nutricionales, genéticos, climáticos, metabólicos, inmunológicos y sanitarios, entre otros (Palomares *et al.*, 2002; ver Figura 2).

Entre los factores sanitarios que afectan la eficiencia reproductiva se incluyen las infecciones bacterianas inespecíficas del tracto reproductivo, causantes de salpingitis, metritis y endometritis, así como también las infecciones específicas sistémicas (Brucelosis, Leptospirosis, Diarrea Viral Bovina, IBR, Campilobacteriosis, Tricomoniasis, etc.) que provocan mortalidad embrionaria precoz y tardía, así como abortos en diferentes momentos de la gestación, retenciones de membranas fetales, metritis, etc.

La diarrea viral bovina (DVB) es un agente infeccioso que afecta la producción bovina en casi todos los países del mundo (Barrer, 1995; Houe, 1999). La infección del virus de la DVB (VDVB) puede causar manifestaciones clínicas como, diarrea (Ful-

ton *et al.*, 2005), enfermedad respiratoria (Stott, 1980), inmunosupresión (Makoschey *et al.*, 2001), abortos, nacimiento de becerros débiles, defectos congénitos y dependiendo de la edad del feto puede provocar el nacimiento de animales inmutoleraentes persistentemente infectados (Baker, 1995) produciendo pérdidas económicas de considerable magnitud.

Dentro de las estrategias para prevenir y controlar la DVB se incluyen medidas de bioseguridad para evitar la introducción de animales infectados en el rebaño, cuarentena de los animales sospechosos para controlar la diseminación del virus, diagnóstico y eliminación de animales persistentemente infectados y la vacunación (Brock, 2004).

En el presente capítulo se discutirán los fundamentos y estrategias de diagnóstico de la DVB como punto crítico para el éxito del programa de mejoramiento de la eficiencia reproductiva en los rebaños de doble propósito. Los criterios presentados en este capítulo están basados en las experiencias del autor en el servicio de diagnóstico de DVB de Auburn University, en Alabama, USA.

EFFECTOS DEL VIRUS DE LA DVB SOBRE LA REPRODUCCIÓN BOVINA

El VDVB es un pestivirus de la familia *Flaviviridae*, dentro del cual se encuentran dos biotipos basados en sus efectos sobre los cultivos celulares: citopatogénico (CP) y no citopatogénico (NCP). A su vez las cepas de VDVB se dividen en dos genotipos, VDVB-1 y VDVB-2, existiendo a su vez subgenotipos 1a, 1b, 2a, y 2b (Fulton *et al.*, 2005). El virus es transmitido a través de la inhalación e ingestión de saliva, secreciones nasales, orina y heces contaminadas, que constituyen las fuentes más frecuentes de infección, así como también el semen, secreciones uterinas, líquido amniótico o placenta contaminada.

Las infecciones con VDVB son subclínicas en el 70-90% de los casos (Ames, 1986), evidenciando en algunos casos solo problemas de infertilidad cuyo diagnóstico como hemos visto es confuso por su naturaleza multifactorial. Las infecciones con VDVB provocan variaciones negativas en algunos de los parámetros reproductivos relacionados con la fertilidad, tal como el incremento en el porcentaje de vacas con tres o más servicios (> 15%), aumento en el número de servicios por concepción (> 2), disminución de la fertilidad (global y al primer servicio; < 50%), incremento en el intervalo parto-concepción (> 120 días), en el intervalo entre partos (> 400 días) y en la duración de las lactancias, entre otros.

Las infecciones con una cepa CP de VDVB en hembras preñadas susceptibles causan infección del feto y usualmente provocan abortos, los cuales tienen un impacto contundente en la rentabilidad de la finca, tomando en cuenta que no solo implica la pérdida de la cría, sino también la lactancia, los costos de tratamientos como del semen, y como se mencionó se compromete la futura fertilidad de la vaca.

La infección con una cepa NCP de VDVB antes de los 125 días de gestación en vacas seronegativas susceptibles, puede provocar la infección transplacentaria del feto que origina abortos y defectos congénitos (Duffel y Hakness, 1985) o el nacimiento de becerros inmutoleraentes PI, los cuales excretan grandes cantidades de virus y dise-

minan la enfermedad durante toda su vida (Brock, 2004). El fenómeno de inmunotolerancia es debido a que la infección ocurre antes del desarrollo del sistema inmune fetal, de manera que las defensas del feto no reconocen el virus como un agente extraño. El sistema inmune de la vaca preñada, la etapa de la gestación y el biotipo viral son factores importantes que determinan el resultado de la infección vertical.

Se ha demostrado que además de los efectos directos del virus de la DVB sobre el embrión y feto bovino, la infección con una cepa NCP del virus, altera la frecuencia de pulsos de la LH, alargando la duración del intervalo entre la ovulación y el pico de la progesterona, a la vez que disminuyen las concentraciones de progesterona entre los días 3 y 11 del ciclo. Esto puede afectar la fertilidad del ganado debido a una reducción de la capacidad del folículo ovulatorio de formar un cuerpo lúteo competente, comprometiendo el desarrollo del embrión y el reconocimiento materno de la preñez (Fray *et al.*, 2002).

La DVB frecuentemente se presenta interactuando con otros agentes infecciosos como IBR (BHV1), Parainfluenza 3 (PI3), BRSV, así como también, *Leptospira* y agentes hemotrópicos los cuales pueden provocar infección como consecuencia del efecto de inmunosupresión del virus. Un estudio de seroprevalencia realizado en 4 fincas lecheras de Croacia con alto porcentaje de problemas reproductivos (60,8%), reveló que el 85,8 % de las vacas afectadas presentaron altos títulos de anticuerpos para IBR y 79,2% para DVB y una tasa de repetición de servicios variable entre 15 y 35% (Biuk-Rudan *et al.*, 1999). Además, se encontraron diferencias significativas en la presencia de anticuerpos combinados contra IBR y DVB en grupos de vacas con y sin desordenes reproductivos, siendo excesivamente alto en los primeras (80,8 vs 46,8%); ello significa que infecciones simultáneas de ambos virus pueden tener una mayor influencia en la aparición de desordenes reproductivos que infecciones simples de cada uno de los virus por separado.

IMPACTO ECONÓMICO DE LA DVB EN LA GANADERÍA BOVINA

Las pérdidas económicas provocadas por la DVB son principalmente debidas a la subfertilidad con prolongados intervalos postparto, reducción en la producción de leche, abortos, defectos congénitos, incremento de mortalidad neonatal, fallas en el crecimiento, muerte de animales jóvenes, infecciones agudas en animales adultos, entre otros. En un rebaño lechero de 67 vacas los daños asociados a la DVB incluyeron dos abortos, nacimiento de dos becerros débiles, tres becerros con defectos congénitos, dos casos de enfermedad de las mucosas y seis animales virémicos que fueron sacrificados. El cálculo de las pérdidas económicas varió entre 2.655 y 6.351 dólares; dichas pérdidas económicas estuvieron en un rango entre 40 y 95 dólares por vaca en el rebaño (Houe, 1995).

Los efectos económicos de la DVB en 14 fincas lecheras en Alemania fueron aproximadamente entre 24 y 161 dólares por vaca en el rebaño. DE manera similar, un reporte en una finca lechera de 183 vacas reveló la presencia de infecciones combinadas del virus de la DVB con *Leptospira*, registrándose pérdidas económicas que ascendieron a 75.000 dólares (410 \$ por vaca) debido a 15 vacas muertas, 20 vacas eliminadas por infertilidad, 40 abortos, 18 nacimientos de becerros débiles y tres bece-

ros que murieron después del nacimiento (Pritchard et al., 1989). Un estudio de brotes de DVB en 7 rebaños en Canadá reveló una mortalidad de 9 y 53% en animales adultos y jóvenes, una tasa de abortos de 44% y una alta incidencia de enfermedades respiratorias. Las pérdidas económicas en rebaños severamente afectados variaron entre 40.000 y 100.000 dólares por rebaño (Carman et al., 1998), habiéndose estimado que el costo de la presencia de por lo menos un animal PI en rebaños de carne varía entre 14,8 y 24,8 dólares por vaca por año, lo que hace imprescindible la eliminación de estos animales de la finca.

SITUACIÓN DE LA DVB EN VENEZUELA

La DVB es endémica en la mayoría de los países del mundo donde se explota la ganadería bovina, reporta una seroprevalencia que varía entre 20 y 89% de las poblaciones bovinas muestreadas (Goyal, 2005). Un estudio de seroprevalencia de VDVB en el estado Apure en Venezuela reveló 36% de seropositividad, siendo este porcentaje similar a los reportados en estudios previos llevados a cabo en otros países (Obando *et al.*, 1999). En este estudio fueron muestreados solo animales adultos no vacunados contra VDVB, de manera que la presencia de anticuerpos indicó que el virus estuvo circulando dentro de la población bovina estudiada.

La prevalencia de bovinos PI en Inglaterra, Dinamarca, Suecia y Estados Unidos varió entre 0,4 y 1,7 % (Obando y Rodríguez, 2005). Hasta el momento en Venezuela no han sido realizados estudios para determinar la prevalencia de bovinos persistentemente infectados. Según la experiencia del autor en el manejo reproductivo de rebaños bovinos de doble propósito, las limitaciones en el diagnóstico definitivo de los agentes infecciosos que afectan la fertilidad, en especial IBR y DVB han representado por años un obstáculo en el éxito de los programas reproductivo y sanitario de muchas fincas. Las medidas de control frecuentemente establecidas para dichos problemas se han basado erróneamente en aplicación a ciegas de tratamientos y vacunaciones, sin existir un conocimiento real de la prevalencia de dichas enfermedades en el rebaño. Por esta razón, se hace necesario el desarrollo de amplios programas de diagnóstico para tener una idea clara de la prevalencia de la DVB en las diferentes zonas ganaderas del país.

PROGRAMA DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA DVB

Para prevenir y controlar la DVB es necesario analizar los riesgos e identificar los puntos críticos de control para corregirlos mediante la toma de decisiones prácticas que conlleven al cumplimiento de las metas reproductivas y productivas. Entre las principales estrategias de prevención y control de la DVB se encuentran la cuarentena de los animales que ingresen a la finca, establecimiento de medidas de bioseguridad para evitar la introducción y diseminación del virus en el rebaño, vacunaciones sistemáticas y un plan integral de diagnóstico que incluya la identificación y eliminación de los animales PI (Brock, 2004).

DIAGNÓSTICO DE LA DVB COMO HERRAMIENTA CLAVE EN LA MEJORA REPRODUCTIVA

El objetivo de diagnosticar la DVB es evidenciar la presencia del virus en el rebaño, lo cual puede conllevar a la adopción de alguna medida de prevención o intensificar las medidas de bioseguridad dentro del programa sanitario. Por otra parte, la identificación de animales PI conlleva a su inmediata eliminación con el objetivo de disminuir la presión de infección en el rebaño (Moening y Greiser-wilke, 2003). Sería muy ambicioso hablar de un plan nacional masivo de erradicación de la DVB en una industria ganadera en la cual no ha sido posible la erradicación de enfermedades zoonóticas como la Brucelosis que tiene un fuerte impacto en la salud pública. De manera que, el objetivo inicial de minimizar la presión de infección es una meta acorde a las condiciones de la ganadería DP Venezolana.

Con la disminución de la presión de infección de DVB en la finca, se estarían favoreciendo condiciones óptimas para una mejor respuesta inmunológica frente a las vacunas, promoviendo una mayor eficiencia de las mismas. Aunque diversas vacunas comerciales contra VDVB disminuyen significativamente el riesgo de infecciones fatales en hembras preñadas expuestas a animales PI, la protección no es 100% efectiva. Todo ello enfatiza la necesidad de combinar la vacunación con la identificación y eliminación de animales PI, así como también la adopción de medidas de bioseguridad como una parte de un programa integral de control (Grooms et al., 2007).

Es importante enfatizar que el programa de diagnóstico debe ser precedido por la identificación de los factores de riesgo de infección de cada finca en particular, los cuales podrían estar favoreciendo el ingreso del agente infeccioso. Posteriormente, se recomienda el establecimiento o corrección de las medidas de bioseguridad en la unidad de producción; ya que sería ilógico instaurar un programa de diagnóstico en fincas en las cuales el virus tiene un acceso libre; escenario que se traduciría en una pérdida de tiempo y dinero.

Debido a la gran variabilidad en la sintomatología presentada en animales infectados con VDVB, el diagnóstico definitivo debe estar necesariamente fundamentado en pruebas de laboratorio. Hay que tomar en cuenta que la inversión para iniciar un protocolo de diagnóstico en una finca es significativa; sin embargo, si la historia de la finca hace sospechar a presencia de animales PI en el rebaño, este protocolo estaría ampliamente justificado por el incremento en el retorno económico. Un requerimiento esencial para el éxito de este programa es la disponibilidad de métodos de diagnóstico rápido, económico y simple. Cada método tiene su ventaja, desventaja y aplicabilidad de acuerdo a las condiciones de cada sistema. Los factores que puede afectar la eficiencia de los protocolos y métodos de diagnóstico incluyen: diversidad antigénica y/o genética del virus, variación de la carga antigénica, interferencia de los anticuerpos maternos obtenidos a través del calostro, alta prevalencia del virus, alta densidad de ganado y presencia de reservorios, entre otros factores.

Estrategias para el Diagnóstico de DVB

Por años ha existido la costumbre de los Médicos Veterinarios de tratar de realizar el diagnóstico de la DVB después de una crisis abortiva o después de un reporte de

una baja fertilidad del rebaño, lo cual definitivamente es una medida atrasada cuando ya se han presentado grandes pérdidas económicas. Lo ideal sería establecer el diagnóstico antes de comenzar un programa de vacunaciones, de manera que el resultado ayude en la toma de decisiones, en cuanto al tipo de vacuna a utilizar (virus inactivado o vivo modificado), así como también en cuanto a los ajustes en las medidas de bioseguridad en la finca.

En algunos países de Europa se ha utilizado como primer paso la aplicación de pruebas diagnósticas a una muestra del tanque de la leche a manera de detectar el virus o anticuerpos contra VDVB (screening). Sin embargo, independientemente del protocolo que se utilice la identificación y la eliminación de animales PI es de crucial importancia en el control de la DVB (Schelp y Greiser-wilke, 2003).

A continuación se presenta un resumen de los diferentes métodos para el diagnóstico de la DVB, haciendo énfasis en su aplicabilidad así como también en las ventajas y limitaciones de su establecimiento en la ganadería de doble propósito.

1. Pruebas para la detección de antígeno del VDVB

Estas técnicas son rápidas y tan sensibles como los otros métodos. Las pruebas más utilizadas para la detección directa de antígenos de VDVB incluyen ELISA e Inmunohistoquímica (IHQ). La prueba de ELISA de captura de antígeno es la técnica más común y práctica para el diagnóstico de animales positivos a VDVB. Esta prueba puede ser utilizada para detectar virus en sangre, secreciones nasales y biopsias de piel (previamente colocadas en una solución buffer por 1 hora). La técnica usa anticuerpos monoclonales primarios dirigidos contra una proteína estructural (E^{ns}) o no estructural presente en el virus (antígeno). Luego es aplicado un anticuerpo secundario (específico contra el anticuerpo primario), el cual está ligado a una enzima capaz de degradar un substrato generador de un color cuando el antígeno de VDVB está presente.

El resultado de esta prueba se interpreta basado en la aparición de un color en las muestras positivas. Sin embargo, para lograr una mayor especificidad, minimizando la posibilidad de falsos positivos, es necesario utilizar un lector de ELISA mediante espectrofotometría. La desventaja de realizar esta prueba utilizando muestras de suero en becerros de menores de 6 meses es la posibilidad de que los anticuerpos maternos puedan inhibir o neutralizar el virus, de manera que la prueba resulte en falsos negativos, siendo posiblemente animales PI. El suero es una muestra óptima para la detección de animales PI por ELISA de captura de antígeno en animales adultos (si se toman muestras pareadas). En animales jóvenes, es indispensable la toma de una biopsia de piel de la oreja, la cual debe ser colocada en una solución buffer por 1 hora y someter el fluido a la técnica de ELISA.

Esta prueba no es muy recomendada para el diagnóstico de infecciones agudas utilizando muestras de suero ya que el virus está presente en la sangre de los animales con infección aguda solo por un corto tiempo. Sin embargo, para descartar una infección aguda se recomienda tomar muestras pareadas de suero con 21 a 30 días de diferencia y someterlas a la prueba de ELISA de captura de antígeno. Si la primera muestra resulta positiva y la segunda negativa se podría concluir que se trata de una infección aguda. La ausencia de antígenos en la segunda muestra indicaría la eliminación

del virus por parte del sistema inmunológico típico de la resolución de una infección aguda. Si la segunda muestra resulta también positiva el animal es considerado PI.

La prueba de Inmunohistoquímica (IHQ) es otra técnica para la detección de antígenos de VDVB la cual tiene una alta sensibilidad y especificidad. Esta prueba puede ser realizada en tejidos congelados o fijados en formalina como en los tejidos fetales (bazo, hígado, riñones, pulmones, etc.) después de un aborto, permitiendo la identificación del virus en conjunto con los hallazgos histopatológicos (Grooms, 2005).

En animales vivos se recomienda la toma de una biopsia de piel de la oreja para detectar el VDVB y diagnosticar la presencia de animales PI. Las muestras son fijadas en formalina, cortadas y sometidas a una tinción con un sistema de anticuerpos primarios (monoclonales) y secundarios (ligados a una enzima) similar a la prueba de ELISA. Finalmente, los cortes histológicos son observados bajo el microscopio, evidenciando la presencia del antígeno de VDVB a través de un color rojizo en áreas extensas del tejido cutáneo (Figura 1).

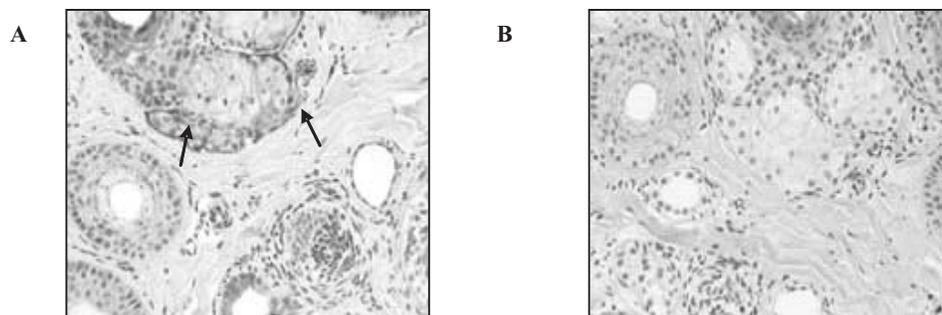


Figura 1. Prueba de Inmunohistoquímica (IHQ) de biopsias de piel de la oreja de becerros PI (A) y control (B). Observe tinción oscura en el tejido cutáneo (flechas). Cortesía Dr. KV. Brock.

Esta técnica puede ser llevada a cabo cuando se sospecha de infección aguda en casos de enfermedad respiratoria o puede aplicarse en animales muertos y en tejidos fetales en casos de abortos cuando se sospeche de DVB. Otros autores sugieren que esta prueba no es muy adecuada para la detección de infecciones agudas, siendo óptima solo para el diagnóstico de animales PI (Ridpath *et al.*, 2002). La cantidad y distribución de antígenos en muestras de piel de animales PI es mucho mayor y más extensa que en animales con infección aguda, siendo la IHQ la prueba de elección para identificar los animales PI.

La prueba tiene la ventaja de permitir cierto tiempo de preservación cuando las muestras de campo no pueden ser sometidas inmediatamente al laboratorio de diagnóstico. Además la IHQ de biopsias de piel tiene la ventaja de que puede ser llevada a cabo en animales recién nacidos y becerros menores de 6 meses sin riesgo de una inhibición por parte de los anticuerpos maternos derivados del calostro. En caso de resultar positivo un animal recién nacido deberá ser eliminado del rebaño antes de in-

corporarlo al sistema de producción con el resto de los animales, ubicándolo temporalmente en un lugar aislado hasta el momento de su eliminación.

Esta técnica no es costosa y no tiene mayores complicaciones cuando se cuenta con los equipos básicos de un laboratorio de histopatología. La adquisición de los anticuerpos monoclonales contra VDVB es un punto crítico, el cual puede ser superado debido a la disponibilidad comercial de los mismos. El costo de esta prueba en los Estados Unidos es alrededor de 4 dólares por muestra; sin embargo, una vez establecido el programa de diagnóstico las ganancias por la mejora de la eficiencia reproductiva después de identificar y eliminar los animales portadores y diseminadores del virus superarían los costos de inversión.

2. Pruebas Serológicas

Estas técnicas se basan en la detección de anticuerpos en el suero contra VDVB como medida indirecta de la infección viral. Para la determinación de anticuerpos se pueden utilizar básicamente dos métodos, ELISA y neutralización viral. Los anticuerpos neutralizantes del virus usualmente aparecen 3-4 semanas después de la infección y persisten por años. De igual manera, los títulos inducidos por las vacunas también pueden persistir por un largo tiempo (Oguzoglu *et al.*, 2003).

Las pruebas serológicas pueden ser utilizadas cuando se sospeche de infecciones agudas, siendo recomendable tomar muestras pareadas de sueros con 21-30 días de diferencia, para detectar las fases aguda y de convalecencia de la infección. La seroconversión de animales centinelas introducidos en el ganado, puede ser utilizada como una evidencia de la posible presencia de animales PI en el rebaño (Goyal, 2005).

Las pruebas serológicas también pueden utilizarse como chequeo preliminar o "screening" de rebaños no vacunados para determinar la prevalencia de exposición al VDVB. Para el caso de animales jóvenes es recomendable muestrear entre 6 y 12 meses de edad para determinar si el VDVB ha estado recién o actualmente circulando en el rebaño. El muestreo de animales menores de 6 meses tiene la desventaja de que en caso de existir aun anticuerpos maternos contra VDVB, existe una alta posibilidad de obtener un resultado falso positivo. De manera que una desventaja de estas pruebas es no poder diferenciar anticuerpos vacunales, anticuerpos por infección y anticuerpos maternos, por lo que en un rebaño vacunado no tienen una gran significancia.

Dentro de las pruebas serológicas, la neutralización viral es el método principal para determinar títulos de anticuerpos a nivel mundial (Rossi y Kiesel, 1971). En esta prueba se evalúa la habilidad de los anticuerpos en el suero problema para neutralizar una cepa conocida de DVB. Diluciones seriadas de muestras de suero se incuban con una cantidad constante del virus por una hora, seguido de la incorporación de células y se someten a incubación por 3-5 días a 37° C. La dilución más alta de suero que inhibe la infección viral en el 50% de las células inoculadas es considerada el título de anticuerpo del suero.

Una desventaja de esta prueba es la falta de estandarización entre laboratorios, lo que hace imposible las comparaciones entre los resultados de los títulos de anticuerpos de diferentes laboratorios. Esto es principalmente debido a diferencias en las diluciones, cepas de virus utilizadas, líneas celulares en los cultivos y condicio-

nes de cultivo, entre otros. La prueba de ELISA de anticuerpos ha sido la prueba más utilizada por los Médicos Veterinarios para tratar de detectar indirectamente infecciones virales en las fincas de Venezuela. Sin embargo, la exposición de los rebaños venezolanos a VDVB (naturalmente o a través de las vacunas) ha hecho muy difícil su interpretación.

3. Pruebas de Aislamiento Viral

Históricamente este ha sido el método más común y válido para identificar de manera directa el ganado infectado con VDVB en especial cuando se sospecha de infecciones agudas. Para esta prueba pueden utilizarse muestras de suero, capa blanca (leucocitos), hisopados nasales y muestras de tejidos (timo, hígado, bazo, riñones, etc.) de animales muertos o fetos abortados, semen y heces (Goyal, 2005). La prueba consiste en someter las muestras de suero o tejido a un cultivo celular para lograr la replicación viral, seguido de su identificación a través de la visualización de los efectos citopáticos (en caso de cepas CP) o a través de una tinción inmunoenzimática similar al utilizado para las pruebas de ELISA (para cepas NCP) (Figura 2). Por otra parte, en animales persistentemente infectados con DVB el virus también puede ser aislado del suero, capa blanca y la mayoría de los tejidos. El aislamiento viral tiene como desventajas el tiempo necesario para obtener los resultados (aproximadamente 5 días), uso de materiales costosos y la necesidad de técnicos capacitados en biología celular, las cuales limitan su aplicación como prueba rutinaria de diagnóstico.

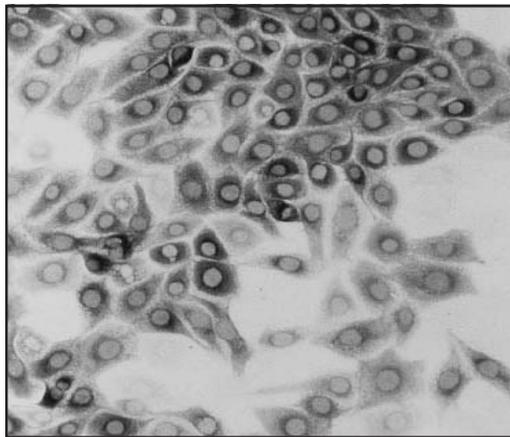


Figura 2. Aislamiento del VDVB en cultivo celular utilizando la tinción de inmunoperoxidasa. Observe tinción en el citoplasma indicando la presencia del virus.

4. Pruebas de Detección de Ácidos Nucleicos

Consisten en la identificación del genoma viral (RNA). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una prueba que tiene una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de animales con infecciones agudas y persistentemente infectados con VDVB. Para esta técnica se requieren materiales y equipos costosos, alto nivel de tecnificación, teniendo una limitada aplicación para el diagnóstico de rutina. Además se debe tener un cuidado extremo debido a que el RNA puede ser degradado fácilmente por enzimas

presentes en la mayoría de los ambientes. La técnica de PCR ha sido recientemente utilizada en protocolos de screening usando muestras mezcladas de múltiples animales (ej. muestra de leche del tanque de enfriamiento) para detectar la presencia de VDVB en el rebaño, pudiendo reducir el costo por animal (Goyal, 2005).

PROTOSCOLOS DE DIAGNÓSTICO DE DVB

A continuación se presentan una serie de recomendaciones sobre como proceder en los diferentes escenarios para diagnosticar la DVB. Como se mencionó, antes de comenzar con un plan sistemático de diagnóstico es necesario evaluar y ajustar las medidas de bioseguridad en el rebaño para que el diagnóstico pueda surtir los efectos deseados.

1. Evidencia de VDVB en el rebaño (Screening)

Cuando se quiere evidenciar si el VDVB esta circulando en el rebaño se recomienda tomar muestras de sangre de un número representativo de terneros entre 7 y 12 meses de edad no vacunados contra BVDV (aproximadamente 10-15 % de la población), y realizar la determinación de anticuerpos contra VDVB a través de una prueba práctica y rápida como ELISA. Desde un punto de vista global, los resultados de seropositividad indican que el VDVB produjo infecciones naturales en estos animales, sugiriendo que el virus ha circulado o esta circulando en el rebaño. Desde un punto de vista específico se puede decir que estos animales seropositivos sufrieron la infección pero debido a la respuesta inmunológica desarrollada son libres de VDVB con un 99% de seguridad. Por otra parte, estos resultados de seropositividad podrían hacer sospechar sobre la presencia de una fuente de infección de VDVB en el rebaño, la cual podría estar representada por animales PI.

Los animales que resultan seronegativos podrían crear falsas expectativas en los Veterinarios de campo, al catalogarlos erróneamente como libres de DVB. Es posible que algunos de estos animales seronegativos sean PI inmunotolerantes, pudiendo ser la fuente de diseminación del virus en la finca. Sin embargo, aunque los animales PI son usualmente seronegativos a VDVB, se ha reportado que algunas cepas heterólogas naturales o de vacunas podrían estimular cierta respuesta inmune en estos animales (Brock *et al.*, 1998).

Si en la finca no se ha aplicado ningún tipo de vacuna contra VDVB, el muestreo podría estar basado en el 10% del total de los animales dentro del rebaño, cuyo resultado daría una idea mucho más general de la seroprevalencia en la finca y una mejor inferencia sobre la difusión del virus en la unidad de producción. Además, las muestras de leche de un pool común (tanque de enfriamiento) pueden ser sometidas a las pruebas para detección de antígenos y/o anticuerpos contra BVDV y conocer si el virus esta circulando en la finca.

2. Diagnóstico de infecciones agudas de BVDV

En caso de observarse un alto porcentaje de animales con enfermedad respiratoria o abortos en el rebaño, es necesario descartar la presencia de una infección aguda de DVB como causa del problema. Durante las infecciones agudas, el virus es solo detectado por un periodo de 1 a 4 días entre los días 3 y 12 post-infección, debido a que después de producirse la respuesta inmune el virus es eliminado lo cual hace difícil su detección. Sin embargo, el aislamiento viral de la capa blanca puede realizarse por un tiempo más prolongado, siendo esta la muestra de elección (sangre completa) en casos de infecciones agudas. Las pruebas de detección de antígeno (ELISA de captura) son

de utilidad cuando se realizan en muestras pareadas en cuyo caso la primera muestra resulta positiva mientras que la segunda es negativa, debido a la eliminación del virus por parte del sistema inmune.

Las pruebas serológicas pueden ser utilizadas para detectar la concentración de anticuerpos contra DVB. Debido al incremento relativamente lento en los títulos de anticuerpos después de una infección aguda con DVB, también se recomienda coleccionar muestras pareadas de suero, una durante los primeros tres días de haberse presentado la enfermedad (respiratoria o abortos) y otra tres o cuatro semanas después. Como se mencionó, la presencia de anticuerpos en la segunda muestra de un animal que resultó negativo en la primera o un incremento de 4 veces en la concentración de anticuerpos en la segunda muestra es indicativo de una infección aguda. En caso de brotes de DVB se recomienda también tomar muestras del rebaño no afectado como controles (becerros sin enfermedad respiratoria y vacas con fertilidad y parto normal). Otras pruebas como la PCR podrían ser utilizadas cuando se sospecha de infecciones agudas de VDVB en el rebaño.

3. Diagnóstico de animales PI

Los animales PI son considerados “fábricas de virus” para sus compañeros de rebaño. Ellos eliminan grandes cantidades de virus durante su vida por lo cual deben ser identificados y eliminados del rebaño tan pronto como sea posible (Goya, 2005). La prueba de IHQ en muestras de piel de la oreja de los becerros es considerada la prueba más efectiva para detectar los animales PI. Cuando la prueba de IHQ es utilizada para evaluar los becerros, el resultado positivo sugiere la eliminación del animal del rebaño y el inmediato muestreo de su madre para determinar si es un animal PI. Si el resultado es negativo, indica que su madre no es un animal PI; de manera que la aplicación de esta prueba en los becerros indirectamente indica el estatus de sus madres, por lo que se recomienda la aplicación inmediata en los animales recién nacidos.

Otras pruebas como el aislamiento viral de muestras de sangre (capa blanca) o suero pueden utilizarse para la detección de animales PI (Goya, 2005). Adicionalmente, las hembras sin cría y los toros también deben ser sometidos a las pruebas de IHQ o ELISA de captura para determinar si son animales PI. Cuando se compran animales (novillas y toretes para reproducción), se recomienda que estos sean aislados del resto del rebaño durante 30-60 días y probados mediante la técnica de IHQ para saber si ellos están persistentemente infectados con VDVB.

CONCLUSIONES

El diagnóstico de la DVB y otros agentes infecciosos que afectan la eficiencia reproductiva del rebaño, así como también el establecimiento de un plan de vacunación y medidas de bioseguridad adaptadas a cada zona, representan un punto crítico en el éxito del programa de control reproductivo de la finca. El diagnóstico presuntivo de la DVB puede basarse en los signos clínicos, la historia de la finca y el examen postmortem. Sin embargo, para un diagnóstico definitivo se deben llevar a cabo pruebas de laboratorio rápidas y válidas. Las pruebas de IHQ y ELISA para la determinación de antígeno y anticuerpos son las técnicas de elección para el diagnóstico de la DVB bajo

las condiciones actuales de la ganadería de doble propósito. Independientemente del programa de control que se utilice, la identificación y eliminación de animales PI es de crucial importancia para mantener una baja prevalencia de la DVB en la finca. Para mantener los resultados logrados, es necesario dar continuidad al programa de prevención y control establecido. Si el proceso se interrumpe es posible que se observe nuevamente un incremento de los problemas de fertilidad afectando la productividad y rentabilidad de la finca.

LITERATURA CITADA

- Ames TR. 1986. The causative agent of BVD: Its epidemiology and pathogenesis. *Vet Med.* 81: 848-869.
- Baker JC. 1995. The clinical manifestation of bovine viral diarrhoea infection. *Vet Clinics North Am Food Anim Pract.* 11:425-445.
- Biuk-Rudan N, Cvetnic S, Madic J, Rudan D. 1999. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. *Theriogenology* 51: 875-881.
- Brock KV, Grooms DL, Ridpath J, Bolin SR. 1998. Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest* 10 (1):22-26.
- Brock KV. 2004. Strategies for the control and prevention of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 20(1):171-80.
- Carman S, van Dreumel T, Ridpath J, Hazlett M, Alves D, Dubovi E, Tremblay R, Bolin S, Godkin A, Anderson N. 1998. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. *J Vet Diagn Invest* 10 (1):27-35.
- Duffell SJ, Harkness JW. 1985. Bovine virus Diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet Rec* 117, 240-245.
- Fray MD, Mann GE, Bleach EC, Knight PG, Clarke MC, Charleston B. 2002. Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Reproduction* 123 (2): 281-289.
- Fulton RW, Briggs RE, Ridpath JF, Saliki JT, Confer AW, Payton ME, Duff GC, Step DL, Walker DA. 2005. Transmission of bovine viral diarrhoea virus 1b to susceptible and vaccinated calves by exposure to persistently infected calves. *Can J Vet Res* 69 (3):161-169.
- González-Stagnaro C, Soto E, Goicochea J, González R, Soto G. 1988. Identificación de los factores causales y control del anestro en la ganadería mestiza de doble propósito. LUZ-GIRARZ. Premio Agropecuario Banco Consolidado. Maracaibo. Venezuela. 90 pp.
- Goyal SM. 2005. Diagnosis. In: *Bovine Viral Diarrhoea Virus. Diagnosis, management and control.* SM Goyal, JF Ridpath (Eds) 12: 197-208.
- Grooms DL, Bolin SR, Coe PH, Borges RJ, Coutu CE. 2007. Fetal protection against continual exposure to bovine viral diarrhoea virus following administration of a vaccine containing an inactivated bovine viral diarrhoea virus fraction to cattle. *Am J Vet Res* 68 (12):1417-1422.
- Grooms DL. 2005. Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus: a key component to a comprehensive bvdv control program. <http://www.ars.usda.gov>. 5 pp.
- Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol* 64:89-107.

- Houe H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am, Food Anim Pract.* 11: 521-548.
- Makoschey B, Janssen MGJ, Vrijenhoek MP, Korsten JHM, Marel PVD. 2001. An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2. *Vaccine* 19: 3261-3268.
- Moennig V, Greiser-Wilke I. 2003. Perspectives on BVD eradication in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 116(5-6):222-226.
- Morrow DA. 1980. Repeat-Breeding or Conception Failure in Cattle. In: *Current Therapy in Theriogenology*. W. B. Saunders Company. Section V. 1287 pp.
- Obando CA, Rodríguez JM. 2005. Diarrea Viral Bovina. En: *Manual de Ganadería de Doble Propósito*. C González-Stagnaro, E Soto-Belloso (eds) Edic Astro Data Maracaibo-Venezuela. Cap V (7): 317-322.
- Obando RC, Hidalgo M, Merza M, Montoya A, Klingeborn B, Moreno-López J. 1999. Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). *Prev Vet Med* 41(4):271-8.
- Oguzoglu TC, Frey HR, Eicken K, Grummer B, Liess B, Moennig V. 2003. Kinetics and persistence of neutralizing antibodies against bovine viral diarrhoea virus-1 and -2 and border disease virus after two step vaccination of cattle. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 110(1):14-17.
- Palomares-Naveda R, De Ondiz-Sanchez A, Perea-Ganchou F, Soto-Belloso E. 2002. Síndrome de la Vaca Repetidora. En: *Avances en la Ganadería de Doble Propósito*. C González-Stagnaro, E Soto-Belloso, L Ramírez Iglesia (eds) Ediciones Astro Data Maracaibo- Venezuela. Cap V (30): 476-496.
- Pritchard GC, Borland ED, Wood L, Pritchard DG. 1989. Severe disease in a dairy herd associated with acute infection with bovine virus diarrhoea virus, *Leptospira harjo* and *Coxiella burnetii*. *Vet Rec* 124(24):625-629.
- Ridpath JF, Hietala SK, Sorden S, Neill JD. 2002. Evaluation of the reverse transcription-polymerase chain reaction/probe test of serum samples and immunohistochemistry of skin sections for detection of acute bovine viral diarrhoea infections. *J Vet Diagn Invest* 14(4):303-307.
- Rossi CR, Kiesel GK. 1971. Microtiter tests for detecting antibody in bovine serum to parainfluenza 3 virus, infectious bovine rhinotracheitis virus, and bovine virus diarrhoea virus. *Appl Microbiol* 22(1):32-36.
- Schelp C, Greiser-Wilke I. 2003. BVDV diagnosis: An overview. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 116: 227-233.
- Stott EJ, Thomas LH, Collins AP, Crouch S, Jebbett J, Smith GS, Luther PD, Caswell R. 1980. A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease. *J Hygiene* 85:257-270.