

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE TEMUCO
FACULTAD DE ACUICULTURA Y CIENCIAS VETERINARIAS
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**“ PRESENCIA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA EL VIRUS DE
DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB), EN SUEROS BOVINOS DE 4 PREDIOS DE
LA IX REGIÓN”.**

**Tesis de grado presentada como
requisito para postular al Grado de
Medico Veterinario, Licenciado en
Ciencias Veterinarias**

SUSANA MARITZA BARRIENTOS CÁRDENAS

TEMUCO

2004

Titulo : "PRESENCIA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA EL VIRUS DE DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB), EN SUEROS BOVINOS DE 4 PREDIOS DE LA IX REGIÓN".

Unidad Académica: Escuela de Medicina Veterinaria

Alumno: Susana Maritza Barrientos Cárdenas

Profesor Guía: Dra. María José Perez M.V.

Informante Interno: Dr. Angel Patitucci M. V.

Informante Externo: Dr. Cesar Hidalgo M.V

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Patobiología de la Universidad Católica de Temuco.

Financiamiento: Esta tesis fue financiada a través de un proyecto interno de la Dirección de Investigación de la Universidad Católica de Temuco: DIUCT 2002-3-1.

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres Gracias por su entrega, cariño e inmenso amor, por su confianza y por la vida. Los Quiero Mucho.

A Fernando gracias por su empuje y por tanto amor.

A Soledad gracias por todo el apoyo que me ha brindado, por los consejos y sobre todo por su amistad.

A la Dra. María José gracias por su comprensión y paciencia.

Al Senador Marco Cariola gracias por su ayuda económica, y por depositar su confianza en mi.

Muchas Gracias Andrea por todo tu apoyo, alegría, y por tu amistad.

A Marco un gran compañero y amigo gracias por tu amistad.

Pily, Joy, Sandra, Susy, Yilda, Maritza, Karo gracias por estar siempre conmigo.

A mi gran amiga Alejandra gracias, porque siempre me acompañaste en las buenas y en las malas.

A todos mis compañeros de generación, Mauro, Christian, Pato, Luis, Luchito, Víctor muchas gracias.

A Angélica gracias por la paciencia, comprensión y ayuda.

A Farid gracias por toda la ayuda que me brindaste.

Solange, Alexandra, Don Exequiel, Don Aladino, Sr. Guardia gracias por su preocupación.

DEDICATORIA

*A Mis Padres Ema y Victor
Que Dios los Bendiga Siempre*

INDICE

	Pág.
1. Resumen	1
2. Summary	2
3. Introducción	3
4. Estructura Viral	4
5. Clasificación Viral	6
6. Patogenia	7
7. Manifestaciones Clínicas	9
8. Enfermedad de las Mucosas	10
9. Diagnóstico	12
9.1 Diagnóstico Clínico	12
9.2 Diagnóstico Patológico	12
9.3 Diagnóstico de Laboratorio	13
9.3.1 Método Serológico	13
9.3.2 Detección de virus o de partículas vírales	15
10. Control en el rebaño	17
11. Erradicación	18
11.1 Factores a considerar en un programa de erradicación para DVB	18
11.2 Estrategias de Erradicación	21
11.3 Programa de erradicación y control de DVB en los países Nórdicos	23
12. Situación Mundial de DVB	27

	Pág.
13. Situación en Chile	28
14. Hipótesis	29
15. Objetivos	29
15.1 Objetivo General	29
15.2 Objetivos Específicos	29
16. Material y Método	30
16.1 Materiales	30
16.2 Cálculo Tamaño de la Muestra	31
16.3 Método	32
16.3.1 Cultivo de Células	32
16.3.2 Inmunofluorescencia Indirecta	33
16.3.3 Seroneutralización Viral	34
16.3.4 Análisis de Datos	34
17. Resultados	35
18. Discusión	41
19. Conclusiones	44
20. Bibliografía	45

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1	Cantidad de animales por categoría para cada predio.	31
Tabla N°2	Total de animales analizados por la Técnica de Seroneutralización para cada predio.	31
Tabla N°3	Total de animales positivos y negativos al Test de Seroneutralización por predio.	35
Tabla N°4	Distribución de animales positivos a Seroneutralización por categorías.	36
Tabla N°5	Animales positivos a <i>N. caninum</i> y al Virus de Diarrea Viral Bovina	40

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1.	Porcentaje de animales con anticuerpos para VDVB.	36
Gráfico N° 2.	Cantidad de animales por categoría en el Predio N° 1.	37
Gráfico N° 3	Cantidad de animales por categoría en el Predio N° 4.	38
Gráfico N°2	Número de animales con anticuerpos en cada dilución de los sueros.	39
Gráfico N° 5	Comparación entre animales positivos a N. caninum y VDVB.	40

1. RESUMEN

El Virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB) es el agente causal del complejo Diarrea Viral Bovina / Enfermedad de las Mucosas (EM), pertenece al género Pestivirus, de la familia Flaviviridae, junto con el Virus de Peste Porcina Clásica y el Virus de Enfermedad de Border en ovinos.

La infección por VDVB se encuentra ampliamente diseminada a través del mundo de modo que el 60 a 80% del ganado presenta anticuerpos frente al agente y entre el 1 al 2 % está persistentemente infectado.

Con el objeto de conocer la prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra el VDVB en bovinos de predios de la IX Región, se obtuvieron muestras de sangre sin anticoagulantes de 444 bovinos pertenecientes a 4 predios de la IX Región, de las cuales se analizaron 290.

La determinación de anticuerpos neutralizantes, se realizó a través de la prueba de Seroneutralización viral, usando cultivos celulares a partir de pulmón fetal bovino (Belu) de tercer pasaje libres de contaminación con VDVB no citopático. Los sueros fueron diluidos en base dos desde 1:10 hasta 1:320 y se enfrentaron a 100 TCID₅₀ de virus DVB cepa Singer. Un animal se considero positivo cuando presentó a lo menos un pocillo sin efecto citopático (ecp) y el título neutralizante de cada suero se expresó como la reciproca de la dilución de suero mas alta que inhibió el efecto citopático viral.

De los 290 sueros procesados, 73 de ellos resultaron positivos a la prueba de seroneutralización, lo que equivale a una prevalencia de 25.17%. En el predio N°1 un 44.29% presentó anticuerpos contra VDVB, mientras que en predio N°4 ésta fue de un 33.3%.

2. SUMMARY

Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) is the causative agent of complex Bovine Viral Diarrhea / Mucosal Disease (MD) belongs genus Pestivirus, within the family Flaviviridae, together with classical swine fever virus and border disease virus.

The infection of BVDV has a worldwide and 60-80% of the cattle being antibody positive and 1 to 2% of the cattle being persistently infected.

With aim of know the prevalence neutralizing antibodies against the BVDV in cattle farm of IX Region, blood samples were collected within anticoncretive of 444 cattle belong 4 farms of the IX Region, and were analyzed 290 samples.

The determination of neutralizing antibodies was made by means of the technique of serum neutralization test in cellular cultures using cells of bovine fetal lung of third passage free of contamination with non-citopathic BVDV. The serums were diluted in logarithm bases 2 from 1:10 to 1:320 and they faced 100 TCID₅₀ of virus BVD Singer strain. One animal is positive sometime present to less a well within effect citophatic and title neutralizing of eve serum were expressed as the reciprocal of the dilution more high that inhibited the citopathic effect viral.

The 290 serum analyzed, 73 resulted positives to the serum neutralization test, with a seroprevalence of 25.17%. The farm number one a 44.29% presented antibodies against BVDV, whereast that in the farm number two this was of 33.3%.

3. INTRODUCCIÓN.

El Virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB) es el agente causal del complejo Diarrea Viral Bovina / Enfermedad de las Mucosas (EM) (Fields y col, 1995; Vilcek y col, 2003). Esta enfermedad fue diagnosticada por primera vez en 1946, como Diarrea Viral Bovina en Estados Unidos de Norte América. Posteriormente en 1953 se describe la Enfermedad de las Mucosas. Debido a que ambas presentaciones son producidas por el mismo agente, se prefiere denominarlas como complejo DVB/EM y VDVB al agente (Jensen, 1968). El virus de Diarrea Viral Bovina pertenece al género Pestivirus, de la familia Flaviviridae, junto con el Virus de Peste Porcina Clásica y el Virus de Enfermedad de Border en ovinos (Vilcek y col, 2003; Paton, 1995; Bolin y Gooms, 2004).

El complejo Diarrea Viral Bovina / Enfermedad de las mucosas, tiene una distribución mundial y provoca un importante impacto económico, principalmente por pérdidas de tipo reproductivo, que se manifiestan por abortos, defectos congénitos, mortalidad neonatal y problemas de fertilidad en rebaños de leche y carne (Houe, 1995; Barber y col, 1985). DVB/EM es considerada una de las de las enfermedades más importantes del bovino, situación que hace que en muchos países se le haya asignado prioridad para su control (Baker, 1990)

En Chile existen numerosos trabajos que demuestran la presencia de la enfermedad en forma endémica en los rebaños lecheros y principalmente en los de carne, donde el movimiento de animales es constante durante todo el año (Reinhardt y col, 1990; Celedon y col, 1996; Celedon y col, 1997; Celedon y col, 1998; Palacios, 1996; Reinhardt y col, 2001).

4. ESTRUCTURA VIRAL

El VDVB, morfológicamente corresponde a una partícula esférica de 30 a 60 nm de diámetro. Es un virus envuelto, compuesto de una cadena simple de ARN, compactado por una cápside proteica y rodeado por una membrana fosfolipídica, el genoma posee proteínas estructurales y no estructurales; las proteínas estructurales son p20, p14 (C), gp48 (E0), gp25 (E1), gp53 (E2).

La glicoproteína estructural E2 es el mayor marcador para anticuerpos neutralizantes, los cuales confieren protección luego de la infección o vacunación, además la naturaleza altamente variable de su región epitope sugiere que la proteína E2 es una fuente importante de variabilidad antigenica entre las diferentes cepas de VDVB (Brownlie y col, 2000).

La glicoproteína estructural E0 forma una unión no covalente con E2 en la superficie viral. E0 puede encontrarse libre en el suero de animales persistentemente infectados.

Las glicoproteínas no estructurales, son NS2-3, NS2 y NS3. La glicoproteína NS3 está asociada con la actividad litica del virus, es una glicoproteína altamente conservada e inmunogénica y es la base de los anticuerpos desarrollados comercialmente. Los anticuerpos contra NS3/ NS2-3 no son neutralizantes, pero juegan un rol importante en la inmunidad mediada por células (Brownlie y col, 2000).

? **Biotipo No Citopático:**

Proteínas estructurales

Proteínas no estructurales

5`	C	E0	E1	E2	3`	
gp20	p14	gp48	gp25	gp53	NS2-3	

? **Biotipo Citopático:**

Proteínas estructurales

Proteínas no estructurales

5`	C	E0	E1	E2	3`	
gp20	p14	gp48	gp25	gp53	NS2	NS3

5. CLASIFICACION VIRAL

El VDVB puede ser clasificado en 2 biotipos: citopático (cp) y no citopático (ncp). Su diferencia radica en la particularidad del primero de producir efecto citopático (ecp) en un cultivo celular susceptible, el que se traduce en vacuolización citoplasmática y muerte celular (Bolin y Gooms, 2004) , además se caracteriza por la expresión separada de las proteínas NS2 y NS3 (Brownlie y col, 2000) (Donis y Dubovi, 1987). El otro biotipo (ncp), no causa ningún efecto manifiesto en la monocapa celular que infecta y donde se multiplica adecuadamente, este biotipo es el más común en la naturaleza y expresa NS2-3 como una proteína fusionada (Bolin y Gooms, 2004).

Además sobre la base de su secuencia genética el VDVB se puede dividir en 2 genotipos: Tipo I y tipo II (Ridpath y col, 1994) (Ridpath, 1996). El VDVB tipo I causa primariamente enfermedad leve, pero en vacas preñadas las infecciones fetales pueden inducir abortos y otras fallas reproductivas además del nacimiento de animales persistentemente infectados (P.I). El VDVB tipo II es asociado principalmente con enfermedad respiratoria severa (Jones y Weber, 2001) y un cuadro hemorrágico agudo, caracterizado por trombocitopenia, diarrea hemorrágica, epistaxis, petequias, equimosis en mucosas, anemia, sangrado en zonas de inyección, pirexia, leucopenia y muerte. La diferencia en la virulencia entre el tipo I y el tipo II de VDVB y los mecanismos por los cuales el VDVB tipo II causa enfermedad hemorrágica son desconocidos (Waltz y col, 2001).

6. PATOGENIA

La vía de infección puede ser horizontal o vertical. En la forma horizontal el virus penetra en forma directa por vía oro-nasal, conjuntival o genital, a partir de bovinos clínicamente afectados o asintomáticos que eliminan virus por secreciones nasales, saliva, sangre, semen, fecas y orina; en forma indirecta a través de vectores (mangas de palpación, agujas). En la forma vertical el virus llega al feto vía transplacentaria (Ames, 1986).

Cuando se infecta una vaca preñada no inmune con VDVB se produce una enfermedad subclínica y el virus rápidamente atraviesa la placenta. El éxito de la infección fetal depende de la virulencia de la cepa de VDVB y la edad del feto al momento de la infección:

? *Si la infección del feto ocurre durante la gestación temprana (antes del día 60), puede causar reabsorción fetal, muerte embrionaria y aborto (Dean y col, 2003), lo cual se observa cuando la vaca regresa rápidamente al celo.*

? *Si la infección ocurre entre los 60 y 100 días de gestación, cuando el sistema inmune fetal está en desarrollo, éste no reconoce como extraño al virus y el animal se vuelve inmunotolerante, siendo clínicamente normal pero portador del virus a lo largo de su vida, estableciéndose una infección persistente(Brownlie y col, 1989). Estos animales pueden ser más pequeños y desarrollar Enfermedad de las Mucosas. Los animales persistentemente infectados son el principal reservorio del virus de Diarrea Viral Bovina (Dean y col, 2003; Baker, 1990; Bolin y Gooms, 2004).*

? *Cuando la infección ocurre entre los días 100 a 150 de gestación, puede provocar el nacimiento de terneros débiles con alteraciones congénitas, ataxia, hipoplasia cerebelar, lesiones oculares como degeneración de retina e hipoplasia y neuritis del nervio óptico.*

? *Si la infección ocurre luego del día 150, cuando el sistema inmune se encuentra desarrollado no se produce aborto y el animal es capaz de producir anticuerpos contra el VDVB. Estos animales nacen sanos y no son portadores del virus.*

La ruta principal de infección post natal es la oronasal, luego del ingreso del virus al organismo animal, éste replica inicialmente en la mucosa alrededor del sitio de entrada lo cual lleva a ulceración y la consecuente salivación o descargas nasales (Thiel y col, 1996). Posteriormente ocurre una diseminación sistémica la cual puede ser como virus libre en suero o bien virus asociado a células, principalmente linfocitos y monocitos (Brownlie, 1990). El animal enferma luego de la infección debido a que el virus de BVD daña el tejido epitelial del sistema gastrointestinal, respiratorio y tegumentario. El virus posee afinidad por el tejido linfoide siendo posible detectarlo en células de timo, linfonódulos, placas de Peyer, tonsilas y bazo (Ames, 1986)

Los primeros tejidos en infectarse son el epitelio del tracto respiratorio y tonsilas desde donde se disemina a todas las superficies epiteliales y tejido linfoide (Baker, 1990).

7. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las infecciones postnatales de animales inmunocompetentes conducen al síndrome de Diarrea Viral Bovina, luego de un período de incubación de 5 a 7 días. La presentación de la enfermedad va desde una forma subclínica o leve de gran morbilidad y baja mortalidad, que se caracteriza por fiebre, leucopenia, inapetencia, diarrea leve con curación rápida en pocos días y producción de anticuerpos neutralizantes, una forma aguda de la enfermedad que provoca depresión, anorexia, diarrea a menudo hemorrágica, disnea, descarga oculonasal y ocasionalmente erosiones bucales, además hay leucopenia, linfopenia y neutropenia, lo que potencia la acción de otros microorganismos patógenos bacterianos y vírales (Duffell and Harkness, 1985; Bolin y Gooms, 2004). Puede presentarse cojera y enrojecimiento e inflamación de la piel y los tejidos subyacentes de la pezuña, lo que lleva también a una baja en la producción láctea. Los animales desarrollan anticuerpos neutralizantes en 3 a 4 semanas luego de la infección y se considera que persisten por el resto de la vida del animal, aunque el título disminuye con la edad. (Duffell and Harkness, 1985)

La infección aguda altera también la función ovarica y reduce la fertilidad. El VDVB causa ooforitis intersticial no purulenta, con necrosis de células de la granulosa y de oocitos. Es posible detectar el antígeno viral en los macrófagos y células del estroma ovárico, entre los días 6 a 60 post infección, y en células foliculares y oocitos en distintos estados de maduración. Además las infecciones agudas ocasionan un retraso en el desarrollo de los folículos pre-ovulatorios durante dos ciclos estrales consecutivos. En los machos el VDVB infecta el tejido testicular

estableciendo una infección persistente en los túbulos seminíferos, y es excretado continuamente por un período de 7 a 22 meses, por lo tanto el VDVB puede ser aislado a partir de semen, el cual es de baja calidad y potencialmente puede infectar a hembras seronegativas (Brownlie y col, 2000).

Cuando los animales se infectan por BVDV tipo II y se produce el síndrome hemorrágico el cuadro es más violento y de alta mortalidad, el cuadro se caracteriza por fiebre, diarrea hemorrágica, epistaxis, petequias, equimosis diseminadas en conjuntiva, mucosa bucal, tejido subcutáneo, peritoneo parietal y visceral, mesenterio, pared del estomago, intestino, riñones, vesícula biliar, bazo, vejiga, diafragma, pleura parietal, pericardio, miocardio, nódulos linfáticos, y meninges. También hay neumonía y pleuresía fibrinosa localizada, trombocitopenia, leucopenia y finalmente la muerte (Bolin y Ridpath, 1992).

8. ENFERMEDAD DE LAS MUCOSAS

La enfermedad de las mucosas es otra de las manifestaciones clínicas provocadas por VDVB. Esta enfermedad se presenta de forma aguda cuando un animal persistentemente infectado durante la vida intrauterina con un biotipo no citopático, se sobre infecta con una cepa antigenicamente homóloga pero de tipo citopática (Brownlie y col, 1984; Bolin y col, 1985; Bolin y Gooms, 2004). El biotipo citopático se origina por mutación a partir del biotipo no citopático; ya sea por depleción de fragmentos del genoma viral, inserción de fragmentos de ARN celular o duplicación y reordenamiento del ARN viral (Goyal y col, 2002; Dean y col. 2003; Meyer y col, 1996).

Generalmente, ésta enfermedad se presenta en animales de 6 a 18 meses de edad, aunque también se ha reportado en terneros de 5 semanas y en vacas de más de 5 años de edad, provocando un 100% de mortalidad. Los casos pueden presentarse en transcurso de varios días, o aparecer esporádicamente en varias semanas a meses (Brownlie y col, 2000).

Los animales con Enfermedad de las Mucosas se presentan deprimidos, con pirexia (40.5-41°C), anorexia, sialorrea. Los movimientos ruminales están ausentes y luego de 2 a 3 días de iniciados estos síntomas se producen una diarrea acuosa y profusa a veces sanguinolenta; se presentan lesiones erosivas en la mucosa bucal, lengua, faringe, fosas nasales y morro; generalmente hay descarga nasal mucopurulenta y a veces lagrimeo y edema corneal. En algunos casos hay claudicación producto de la laminitis, coronitis, y lesiones erosivas de la hendidura interdigital. La deshidratación y debilidad son progresivas y la muerte ocurre 5 a 7 días después de iniciados los signos (Blood y col, 2002).

Cuando la sobreinfección de un animal inmunotolerante portador del BVDV ocurre con una cepa citopática pero antígenicamente diferente, heteróloga, se desencadena una enfermedad de las mucosas de tipo crónica, la que se manifiesta con inapetencia, diarrea intermitente y emaciación progresiva; el pelaje se presenta hirsuto, deformación de las uñas y lesiones erosionadas con escaras a nivel del periné, escroto orificio prepucial y vulva, entre piernas, en el rodete coronario y a nivel de la hendidura interdigital, que pueden hacerse extensivas al resto de la piel. Los casos crónicos pueden sobrevivir por varias semanas a meses y finalmente la

muerte ocurre por inanición crónica, neumonía u otras enfermedades (Duffell and Harkness, 1985).

9. DIAGNÓSTICO

9.1 Diagnóstico Clínico:

El diagnóstico clínico se basa en la historia, signos clínicos y lesiones. La enfermedad aguda en general cursa como una infección subclínica que pasa inadvertida en la mayoría de los rebaños (Baker, 1990), sin embargo puede hacerse evidente en algunas circunstancias. Los animales pueden evidenciarse febriles, inapetentes, presentar problemas respiratorios, leucopenia, y diarrea. Así como ulceraciones y erosiones de la mucosa bucal. Algunos animales también evidencian lesiones pódales (úlceras interdigitales y inflamación del rodete coronario). El aborto como consecuencia de la infección con BVDV puede suceder desde unos días hasta varias semanas después de la infección sub-clínica o enfermedad clínica (Bolin, 1990; Jubb, 1994)

9.2 Diagnóstico Patológico:

El diagnóstico de enfermedad por VDVB en bovinos incluye lesiones macroscópicas y microscópicas en diversos órganos (Fulton y col, 2000).

Los cambios patológicos macroscópicos involucran ulceraciones o erosiones de la mucosa de la boca, esófago e intestino delgado, hiperemia, hemorragia y edema

de las mucosas digestivas acompañada de atrofia del tejido linfoide. En el caso de las infecciones fetales podemos encontrar hipoplasia cerebelar, malformaciones cerebrales (hidranencefalia, porencefalia, microcefalia e hidrocefalia), cataratas, alopecia, hipoplasia tímica, retardo en el crecimiento. Los fetos abortados como consecuencia de la infección por el VDVB pueden estar frescos, autolíticos o momificados.

Los cambios microscópicos se evidencian con necrosis e infiltración de células mononucleares en diferentes tejidos, en fetos se puede apreciar atrofia de la retina, hiperplasia reticuloendotelial, degeneración de la capa granular externa del cerebelo, desmielinización, vasculitis entre otras (Bolin, 1990; Jubb, 1994; Baker, 1990).

9.3 Diagnóstico de laboratorio:

El diagnóstico de infección por virus DVB puede realizarse por diferentes técnicas de laboratorio, pudiendo ser la detección del virus, partículas vírales o a través de técnicas serológicas que determinan la respuesta inmune del huésped al virus (Edwards, 1990).

9.3.1 Métodos serológicos:

? **Inmunodifusión en gel de agar (IDGA):** El IDGA es una prueba rápida y de fácil implementación por la mayoría de los laboratorios, sin embargo al no entregar resultados cuantitativos es de baja sensibilidad en comparación a la Neutralización Viral y ELISA (Edwards, 1990).

? **Neutralización Viral (NV):** La neutralización viral se basa en la determinación de anticuerpos neutralizantes contra el virus que aparecen en el suero de los animales pos infección. Un título de anticuerpos séricos con un incremento mayor que 4 veces contra el virus indica infección aguda, o bien la aparición de anticuerpos contra VDVB en animales que anteriormente eran seronegativos (Bolin, 1990).

Esta técnica es realizada en cultivos celulares en placas de microtitulación en donde se puede leer fácilmente el crecimiento o neutralización del virus empleado en la técnica. Dos cepas vírales altamente citopáticas son utilizadas en esta prueba: "Oregon C24V" y "NADL". El título de anticuerpos en el suero puede determinarse como la recíproca de la dilución más alta de cada suero en la cual el virus es neutralizado en el 50% de los pocillos (Saliki y Dubovi, 2004; OIE, 1996).

? **Enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA):** Es una prueba sensible, rápida, confiable y económica para diagnóstico serológico de infección por VDVB. Está disponible un ELISA indirecto y de bloqueo además de un gran número de kits comerciales. Los resultados de esta prueba se encuentran bien correlacionados con neutralización viral (OIE, 1996).

? **Inmunofluorescencia indirecta (IFI):** Es una prueba simple, rápida y altamente sensible que detecta anticuerpos dirigidos contra el virus DVB, detecta los anticuerpos de grupo y los específicos (OIE, 1996).

9.3.2 Detección de virus o partículas vírales

? **Aislamiento viral (A.V):** Aislamiento de virus en cultivos celulares es una técnica diagnóstica muy usada y sensible. El virus puede ser aislado desde sangre, ya sea libre en suero, desde coagulo y con mayor sensibilidad desde leucocitos en sangre. A la necropsia puede aislarse de muchos órganos, principalmente órganos linfoides como timo, bazo, placas de peyer (Saliki y Dubovi, 2004)

Los animales P.I (persistentemente infectados) presentan altos títulos vírales en sangre y el virus puede ser aislado prácticamente desde todos los órganos. En los toros P.I el virus también puede ser aislado desde semen (OIE, 1996; Brownlie y col, 2000).

El aislamiento de virus desde una muestra de sangre de un animal vivo puede indicar infección aguda o infección persistente y la diferenciación se puede determinar por una segunda muestra tomada dentro de un periodo de 3 a 4 semanas posteriores a la primera, debido a que en animales con infección aguda los niveles de viremia son detectables por un breve periodo de 2 a 3 semanas (OIE, 1996).

En terneros con infección persistente los anticuerpos calostrales pueden interferir en el aislamiento viral por lo que es necesario tomar una nueva muestra una vez que los anticuerpos calostrales hayan descendido. Generalmente los animales P.I permanecen positivos al virus y anticuerpos negativo (OIE, 1996; Saliki y Dubovi, 2004).

? **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) para detección de antígeno:**

Para la detección de antígeno viral se han descrito muchos métodos de ELISA, la mayoría se basan en el principio de ELISA sándwich. Es el test indicado para detección de animales P.I y generalmente mide el antígeno en leucocitos de sangre periférica lisados (OIE, 1996; Saliki y Dubovi, 2004)

? **Polimerase chain reaction amplification (PCR):** PCR detecta y amplifica las

secuencias genéticas que son únicas en el organismo de interés. La exactitud de PCR depende de la habilidad de los primers para envolver específicamente al material genético, lo que le permite una alta sensibilidad epidemiológica (Bolin y Grooms, 2004). Durante los últimos 10 años PCR se ha transformado en una metodología de diagnóstico de rutina para BVDV. PCR puede detectar animales persistentemente infectados, animales con infección aguda y animales vacunados con una vacuna de virus vivo modificado (Saliki y Dubovi, 2004).

? **Inmunohistoquímica:** 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 histológicas. La presencia del antígeno del VDVB en queratinocitos de la epidermis y células epiteliales de folículos pilosos de bovinos persistentemente infectados clínicamente sanos, ha originado el desarrollo de la técnica de inmunohistoquímica en biopsias de piel para el diagnóstico de estos

animales, también es posible utilizar nódulos linfáticos, cerebro, abomaso, glándula tiroideas. Ésta técnica en comparación con el aislamiento viral, ha demostrado ser eficaz, rápida, económica, sencilla. Además es una técnica en la cual no interfieren los anticuerpos maternos, por lo tanto se puede realizar en neonatos (OIE, 1996; Grooms y col, 2002; Njaa y col, 2000)

10. CONTROL EN EL REBAÑO

Para establecer un programa de control es fundamental entender la enfermedad y conocer sus factores de riesgo. Este programa debe estar claramente definido y debe apuntar a obtener un rebaño saludable y a la vez aumentar la prolificidad de este, además de disminuir las pérdidas económicas asociadas al virus. Por lo tanto es importante tener una historia del rebaño de por lo menos 2 años de antigüedad que considere al menos los siguientes puntos (Brownlie y col, 2000):

- ? Historia clínica del rebaño.
- ? Rebaño abierto v/s rebaño cerrado (contacto con otras vacas en ferias, exposiciones, toro compartido o alquilado).
- ? Registro del rebaño: edad, raza, fertilidad, producción de leche, monta natural o inseminación artificial.
- ? Resultado de exámenes postmortem.
- ? Resultado de muestreos de leche a partir del estanco de almacenamiento para evaluar nivel de anticuerpos contra VDVB.
- ? Resultado test serológico para VDVB.

Es importante conocer claramente cual es el posible origen del virus, por ejemplo:

- ? Animales persistentemente infectados que ingresan al rebaño.
- ? Vaquilla y/o vaca portando un feto persistentemente infectado.
- ? Animal infectado agudamente que ingresa al rebaño o que ha sido regresado desde la feria.
- ? Otros rumiantes (ovejas, ciervos, cabras).
- ? Material infectado de uso común como mangas, agujas.
- ? Toro infectado persistentemente o semen para inseminación artificial contaminado.

Considerando los puntos antes mencionados se puede llevar un control de la enfermedad dentro del rebaño, identificar animales seropositivos y persistentemente infectados (Duffel, 1985; Brownlie y col, 2000; Sandvik, 2004).

11. ERRADICACION

11.1 Factores a considerar en un programa de erradicación para el virus de diarrea viral bovina.

? **Dinámica poblacional:** antes de comenzar un programa de control de diarrea viral bovina en una región dada, es importante conocer algunos aspectos de la población bovina como el tamaño promedio de los rebaños, cual es el tipo de

producción predominante (leche, carne u otros), densidad poblacional. Es importante la dinámica básica de la población, conocer el origen de las hembras de reemplazo, las rutinas de cuarentena, el tipo de pastoreo, frecuencia de contacto entre los rebaños, participación de animales en exhibiciones (Sandvik, 2004).

? **Monitoreo de la prevalencia:** es importante para identificar rebaños susceptibles y rebaños infectados. Es importante dar a conocer datos serológicos, incidencia de enfermedad de las mucosas y resultados de investigaciones diagnósticas en rebaños sospechosos. En rebaños lecheros no vacunados contra diarrea viral bovina se puede utilizar un ELISA Indirecto para detección de anticuerpos desde una muestra de leche del estanque de almacenamiento de la leche. En rebaños de carne la utilización de un test comercial es la forma principal de monitoreo serológico (Sandvik, 2004).

? **Test de diagnóstico:** deben ser sensibles y específicos, fácil de usar y a un costo aceptable. Se han desarrollado en forma comercial ELISA indirecto, ELISA directo para detección de VDVB. En cultivo celular es importante evitar la contaminación a partir de los componentes del medio de crecimiento de las células a través de inmunofluorescencia indirecta. PCR es un test con una alta sensibilidad para la detección de VDVB. Para monitorear terneros la inmunohistoquímica en biopsias de piel es una buena alternativa

Los test de diagnóstico para Diarrea Viral Bovina pueden ser divididos por su capacidad para detectar animales con infección aguda o aquellos con infección persistente (Sandvik, 2004).

? **Educación:** es importante dentro de un programa de control de una enfermedad, educar a los propietarios y trabajadores con aspectos básicos de la enfermedad como signos clínicos, epidemiología, manejo del rebaño con énfasis en como evitar los posibles orígenes de infección.

? **Bioseguridad:** los rebaños libres de VDVB son más susceptibles a una reinfección, si estos rebaños vacunan contra el virus el riesgo se reduce, pero se ha demostrado que los fetos no son totalmente protegidos por la vacunación. Un origen común de reinfección es el ingreso de un animal proveniente de un rebaño vecino infectado, contacto directo o indirecto con otros rumiantes infectados, ingreso de una hembra preñada al rebaño. Cada vez que ingrese un animal con un estado infeccioso desconocido para VDVB debe guardar cuarentena, hasta que se verifique su condición de libre de VDVB.

Otras rutas de reinfección son los fomites (ropa del veterinario contaminada, botas, mangas, agujas, etc.) y productos biológicos como semen, embriones, calostro, vacunas, y otras drogas de uso veterinario las cuales deben ser verificadas como libres de VDVB antes de ser usadas (Sandvik, 2004; Brock, 2004).

? **Logística:** Basado en los datos recogidos sobre prevalencia, dinámica de movimientos, es posible predecir un modelo epidemiológico de expansión de VDVB, por lo que se debe dar prioridad los rebaños que están en mayor riesgo (Sandvik, 2004).

? **Legislación:** se debe regular el movimiento de animales posiblemente viremicos, persistentemente infectados, que son los principales diseminadores del virus (Sandvik, 2004).

11.2 Estrategias de erradicación

Las estrategias de erradicación dependen de la seroprevalencia, densidad y prácticas de manejo de la población, además del uso de vacuna:

? *Erradicación sin vacunación:* Se utiliza en regiones donde la densidad poblacional es baja, no se emplean vacunas, este sistema se basa en 1) identificación de los rebaños con infección activa; 2) eliminación de los animales persistentemente infectados del rebaño; 3) medidas de bioseguridad o mantener rebaños cerrados para evitar la infección de rebaños libres. La desventaja de este sistema es que estos rebaños son altamente susceptibles a la enfermedad y vulnerable a grandes pérdidas económicas por la reentrada del VDVB (Brownlie y col, 2000).

? *Erradicación con vacunación,* en poblaciones bovinas con alta prevalencia de la enfermedad, donde no es posible mantener un rebaño cerrado o con estrictas medidas de bioseguridad, las estrategias de control deben incluir: 1) identificación de rebaños con infección activa; 2) eliminación de animales persistentemente infectados y 3) programa de vacunación en vacas y vaquillas. La vacunación por sí

sola no elimina el virus del rebaño y su finalidad es proveer protección contra infecciones trasplacentarias que dan origen a terneros P.I. (Brownlie y col, 2000).

El desarrollo de vacunas que proveen protección contra la infección transplacental, representa el mayor desarrollo en el control de este patógeno en bovinos.

? *Vacuna de virus muerto*, se aplica antes del primer servicio para proteger a la hembra durante la cubierta y el primer tercio de gestación que son los periodos de mayor riesgo. La mayor ventaja de estas vacunas es su seguridad, pero inducen una débil respuesta de los anticuerpos neutralizantes y por un corto periodo de tiempo (Kelling, 2004).

? *Vacuna de virus vivo modificado*, su uso en vacas preñadas esta contraindicado por la habilidad que poseen para cruzar la placenta, provocando infección fetal (Duffel, 1985; Brownlie y col, 2000). También se recomienda no utilizar esta vacuna en animales bajo condiciones de estrés por la posible supresión de los mecanismos de defensa del huésped.

11.3 Programa de erradicación y control de BVD en los países Nórdicos (Suecia, Noruega, Dinamarca, Finlandia) (Sandvik, 2004; Brock, 2004)

A pesar de las diferencias nacionales en la estructura de la población, los elementos básicos de los programas de control y erradicación de BVD en los países Nórdicos son similares:

? *El primer paso consiste en un screening de todos los rebaños bovinos, con el objetivo de identificar rebaños libres de DVB y maximizar las medidas para que aquellos que lo sean continúen así. Se toman muestras de leche a partir del estanque de almacenamiento o de suero de un número limitado de animales que representen todos los grupos epidemiológicos del rebaño, para chequear la presencia de anticuerpos contra VDVB, utilizando un ELISA indirecto que indica el nivel de exposición del rebaño. En aquellos rebaños con altos niveles de anticuerpos, se toman muestras de vacas primiparas y de terneros, si estos resultan con anticuerpos se considera al rebaño infectado y se prohíbe el movimiento de animales.*

Las pruebas de laboratorio que se utilizan para declarar un rebaño libre son, un ELISA indirecto para detectar anticuerpos, si los resultados son negativos o presentan bajos niveles de anticuerpos se utiliza un ELISA directo para detectar VDVB.

Para evitar la interferencia de los anticuerpos maternos, los terneros nacidos de hembras positivas son chequeados después de los 3 meses de edad.

Para mantener la condición de rebaño libre se restringió el movimiento de animales, y estos son muestreados 2 veces al año con un intervalo de 4 meses, ambos test deben ser negativos.

? *El segundo paso es identificar rebaños con una infección activa entre aquellos positivos a DVB, por ejemplo aquellos que poseen uno o más animales persistentemente infectados.*

? *El tercer paso tiene por objetivo identificar todos los individuos persistentemente infectados en rebaños con infección activa. Esto involucra un muestreo inicial de todas las vacas en el rebaño, seguido del análisis de todos los terneros nacidos a partir de hembras con anticuerpos positivos a VDVB.*

En Suecia el programa fue iniciado en Septiembre de 1993 como un esquema voluntario organizado por los dueños con supervisión externa de veterinarios. El esquema fue diseñado para cubrir las necesidades de ambos rebaños bovinos, de leche y carne, los cuales son aproximadamente 15.000, con un tamaño promedio de 28 a 10 vacas, respectivamente.

A comienzos del año 2002 todos los rebaños de carne y leche están bajo un programa de control para DVB, el porcentaje de rebaños de carne y leche que han sido certificados como libres de DVB llega a un 93% para los de carne y un 88% para los de leche.

En Noruega este programa fue desarrollado entre la industria bovina, el Instituto Nacional de Veterinaria y las autoridades de salud animal. El objetivo inicial fue minimizar la expansión de DVB y a largo plazo la erradicación de la infección. Al inicio del programa la población bovina de Noruega consistía en 350.000 bovinos agrupados en 27.500 rebaños, con un 95% de ellos dedicados a la producción de leche. DVB se transformó en una enfermedad de notificación obligatoria para el Servicio de Salud Animal.

En Noviembre del año 2003 solo 4 rebaños permanecen con restricción de movimiento de sus animales.

La fase final del programa de erradicación incluye reforzar la legislación vigente, evitar el movimiento de animales desde los lugares de infección, mantener los rebaños declarados libres y tratar de limpiar los rebaños positivos.

Dinamarca posee aproximadamente 620.000 bovinos de leche y 130.000 bovinos de carne, agrupados en 9.000 y 13.000 rebaños respectivamente. A comienzos del año 1994 se creó el programa de control y erradicación para BVD, el cual comenzó en forma voluntaria, pero desde 1996 se prohibió el transporte animal potencialmente viremico. En el año 1999, el 9% de los rebaños lecheros y el 5% de los rebaños de carne poseían animales P.I. A fines del año 2003 existen aproximadamente 400 rebaños infectados con restricción de movimiento de sus animales.

En Finlandia Diarrea viral bovina fue confirmada en el año 1987, con una prevalencia a nivel de rebaño de 0.8%. En el año 1993, se miden los anticuerpos de todos los rebaños lecheros y de carne, y desde 1994 se lleva a cabo un programa

de control y erradicación en forma voluntaria. Este fue planificado y organizado por la industria lechera en cooperación con el Laboratorio Nacional de Veterinaria y Alimentación. El tamaño y estructura de la población bovina es similar a la de Noruega, con una gran cantidad de rebaños lecheros (aproximadamente 34.000), pero de tamaño pequeño.

Es importante considerar que estos programas de control y erradicación en los países Nórdicos son realizados sin vacunación contra DVB.

12. SITUACIÓN MUNDIAL DE DVB

El Virus de Diarrea Viril Bovina ha emergido como uno de los agentes infecciosos más importante en los bovinos. La naturaleza insidiosa del VDVB ha llevado a pérdidas económicas substanciales a la industria lechera y de carne (Duffel and Harkness, 1985), ya que la infección por VDVB se encuentra ampliamente diseminada a través del mundo.

Aunque la prevalencia de la infección varía entre los diferentes 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 % está persistentemente infectado (Houe, 1999; Pérez, 1995).

13. SITUACIÓN EN CHILE

DVB/EM se diagnosticó en nuestro país en 1986, por medio de hallazgos anatomopatológicos en terneros de la X Región (Fiedler y col, 1986), lo que fue confirmado por técnicas de Inmunofluorescencia directa (IFD), seroneutralización (SN) y aislamiento viral en cultivo celular. Posteriormente el agente se ha aislado repetidamente, como por ejemplo en fetos abortados en la Región Metropolitana (Reinhardt y col, 2001).

En Chile, estudios de seroprevalencia indican porcentajes que varían de 77.8% para la IX Región a 69.2% en la X Región (Reinhardt y col, 1990), y en la Región Metropolitana se informa de prevalencias de 59.7% para el ganado de leche (Celedón y col, 1996), y de 86% para el ganado de carne (Palacios, 1996) lo cual se debe al tipo de explotación más extensiva y donde existe una gran movilidad de animales entre los predios.

14. HIPÓTESIS

- ✍ El Virus de Diarrea Viral Bovina está presente en diferentes categorías de animales, de los rebaños de influencia de la Escuela de Medicina Veterinaria.

15. OBJETIVOS

15.1 OBJETIVO GENERAL:

- ✍ Establecer proporción de anticuerpos neutralizantes en suero de animales de rebaños infectados con Virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB).

15.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- ✍ Detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el Virus de Diarrea Viral Bovina en sueros bovinos por medio de la Técnica de Seroneutralización.
- ✍ Caracterizar la presencia de anticuerpos neutralizantes por categorías en los rebaños infectados con el Virus de Diarrea Viral Bovina.
- ✍ Evaluar la ocurrencia de infección conjunta entre Neospora caninum y el Virus de Diarrea Viral Bovina.

16. MATERIAL Y MÉTODO

16.1 MATERIALES:

Para este estudio se utilizó suero de bovinos pertenecientes a 4 establecimientos lecheros de la IX Región.

El predio N°1 está ubicado al suroeste de la ciudad de Temuco en la comuna de Freire.

El establecimiento N°2 está ubicado al noroeste de la ciudad de Temuco, en comuna de Traiguén. Ambos predios presentaban antecedentes de animales positivos a *Neospora caninum* a través de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFA)

Los establecimientos N°3 y 4 están ubicados en las cercanías de la localidad de Loncoche.

Los 4 predios fueron seleccionados por sospecha de infección por Virus de Diarrea Viral Bovina de los Médicos Veterinarios que atienden estos predios, ya que presentan abortos y nacimiento de terneros débiles. En estos predios no se realiza vacunación contra el Virus de Diarrea Viral bovina.

Tabla N°1. Cantidad de animales por categoría para cada predio.

	Predio N°1	Predio N°2	Predio N°3	Predio N°4
Terneros	45	102	22	4
Vaquillas de primer parto	66	0	31	8
Vacas de 2 partos o más	29	32	84	21
Total	140	134	137	33

16.2 Calculo tamaño de muestra:

Inicialmente se tomo un número mínimo de 47 muestras por predio para tener un 95% de certeza de incluir al menos un positivo en la muestra si existen anticuerpos en el 5% de los animales. Si se encontraban animales con anticuerpos al Virus de Diarrea Viral Bovina se analizaba el total del rebaño.

Tabla N°2. Total de animales analizados por la Técnica de Seroneutralización para cada predio.

	Predio N°1	Predio N°2	Predio N°3	Predio N°4
Terneros	45	20	23	4
Vaquillas 1º parto	66	29	16	8
Vacas 2 partos o más	29	17	12	21
Total sueros analizados	140	66	51	33

16.3 MÉTODO

Los animales fueron muestreados por categorías de terneros, vaquillas de primer parto y vacas de 2 partos o más.

Se utilizó sangre entera sin anticoagulante obtenida mediante venopunción de la vena coccígea, de la cual se obtuvo suero, el que posteriormente fue inactivado a 56°C por 30 minutos y mantenido a -20°C hasta el momento de su uso.

16.3.1 CULTIVO DE CÉLULAS: A través de una ventana en el tórax del feto se extraen trozos de pulmón fetal (Bovine Lung Cell). Los trozos obtenidos asépticamente se maceran cuidadosamente extrayendo todo el tejido fibroso, se lavan tres veces con una solución de Fosfato buferado salino (PBS) adicionado de antibióticos (200UI/ml Penicilina, 200ug/ml Kanamicina, 200 ug/ml Estreptomicina), hasta que el líquido de lavado salga traslucido. Una vez terminado el proceso de lavado, se retienen los trozos de tejido y se suspenden en una solución de PBS-tripsina al 10%, y se incuban a 37°C en agitación por 30 minutos. Transcurrido este tiempo de incubación se recupera el sobrenadante y se agrega suero equino para detener la acción enzimática. El sobrenadante se centrifuga a 1000g por 10 minutos aproximadamente, luego se determina la concentración celular por conteo en hemocitometro y se suspenderán en medio de crecimiento (MEM 10% suero equino adicionado con 100 µg/ml estreptomicina, 100 µg/ml kanamicina y 100 UI/ml penicilina) a razón de 10⁶ células por ml en flask de cultivo y se incubará a 37°C con 5% CO₂ y humedad relativa saturada (Freshney, 1983). Se realizaron tres pasajes del cultivo celular, y un control de ausencia de cepas no citopáticas (ncp) de BVDV por la técnica de inmunofluorescencia.

16.3.2 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA: para la prueba de inmunofluorescencia indirecta se hizo crecer células en laminillas de vidrio colocando aproximadamente 2×10^5 células /ml, las cuales fueron encubadas a 37°C hasta lograr la confluencia celular sobre la laminilla. Posteriormente las células fueron fijadas con acetona/metanol (3:1) por un periodo de 30 minutos.

Se les aplico 30 ul de Anticuerpos Monoclonales contra VDVB tipo I y tipo II (Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios, Departamento de Agricultura, Ames, Iowa, Estados Unidos) y se encubaron junto a un control positivo y negativo (VMRD, Pullman, Washington, Estados Unidos) a 37°C por 45 minutos en cámara húmeda, posteriormente se lavaron (Bufer de enjuague para FA pH: 9.0; VMRD) por 10 minutos, posteriormente se encubaron con un conjugado anti-IgG 1 e IgG 2 Bovina (VMRD) y se encubo a 37°C por 45 minutos en cámara húmeda, se lavo en bufer de enjuague por 10 minutos y posteriormente se les agrego conjugado fluoresceinado (VMRD) y nuevamente se encubaron a 37°C por 45 minutos en cámara húmeda. Nuevamente se lavo en bufer de enjuague por 10 minutos, luego se le agrego medio de montaje (VMRD) y se cubrió con un cubreobjeto para ser leído en Microscopio de Epifluorescencia (NIKON, lampara de Mercurio Modelo HB 10101 AF)

16.3.3 SERONEUTRALIZACIÓN VIRAL : La prueba de SN, dilución punto final seroneutralizante, se realizo diluyendo los sueros problema en logaritmo de base 2, en medio mínimo esencial en sales de Earle (MEM-E), en volúmenes de 50 ul y se enfrentaron a 100 dosis infectantes cultivo de tejido 50% (TCID₅₀) de la cepa viral SINGER del virus DVB. Luego de una incubación por 60 minutos a temperatura ambiente, se adicionó 100 ul de una suspensión con células embrionarias de pulmón bovino de tercer pasaje a una concentración de 3×10^5 cel/ml, en MEM-E más 10 % de suero fetal equino irradiado. Finalmente las microplacas se incubaron en estufa de cultivo con cámara húmeda a 37° C y adicionada de un 5% de CO₂ por 5 días, para luego proceder a su lectura mediante observación microscópica (Reinhardt y col, 2001; OIE, 1996).

El titulo neutralizante se determinó como el valor reciproco de la dilución del suero que protege al 50% de la población celular expuesta a 100 TCID₅₀/ 50 ul de virus. Para la interpretación de la prueba de SN se observo la presencia de efecto citopático (ecp) en los diferentes pocillos de cada microplaca. Toda muestra que presento a lo menos un pocillo sin ecp se considero positiva y él título neutralizante de cada suero se determino como la reciproca de la dilución de suero más alta que inhibió el ecp viral. Fue considerado negativo aquella muestra que presento ecp a la dilución mas baja de suero (1/10)(OIE, 1996).

16.3.4 ANÁLISIS DE DATOS:

La proporción de anticuerpos neutralizantes fue calculada como porcentaje. La prueba de Chi cuadrado (χ^2) fue utilizada para comparar las proporciones de anticuerpos entre los predios y las diferentes categorías.

Los resultados fueron analizados en el programa Prism 3.0

17. RESULTADOS

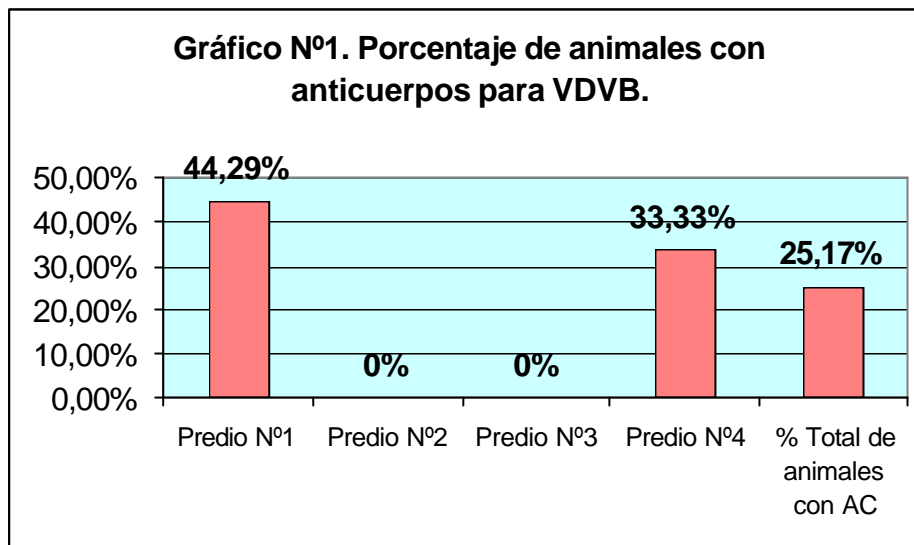
En los predios N°2 y N°3 no se encontraron animales con anticuerpos neutralizantes al Virus de Diarrea Viral Bovina.

En los predios N°1 y N°4 si se encontraron animales con anticuerpos neutralizantes al Virus de Diarrea Viral Bovina.

Tabla N°3. Total de animales positivos y negativos al Test de Seroneutralización por Predio.

	Positivos SN	Negativos SN	Total sueros analizados
Predio N°1	62	78	140
Predio N°2	0	66	66
Predio N°3	0	51	51
Predio N°4	11	22	33
Total	73	217	290

De un total de 290 sueros procesados, 73 de ellos presentaron anticuerpos neutralizantes contra el Virus de diarrea Viral bovina, lo que equivale a un 25.17% del total de los animales analizados. En el predio N°1 el 44.29% de los animales resultó positivo, mientras que en el predio N°4 el 33.3% de los animales resultaron con anticuerpos neutralizantes al Virus de Diarrea Viral Bovina. Gráfico N°1



Ac: anticuerpos.

Al analizar por categoría (terneros, vaquillas de primer parto y vacas de 2 partos o más) se encontró que el mayor porcentaje de animales positivos está en la categoría de vaquillas de primer parto con un 37%, seguido de los terneros con 35.6% y luego las vacas de 2 partos o más con un 27.4%. Tabla N°4

Tabla N°4. Distribución de animales Positivos a SN por categorías.

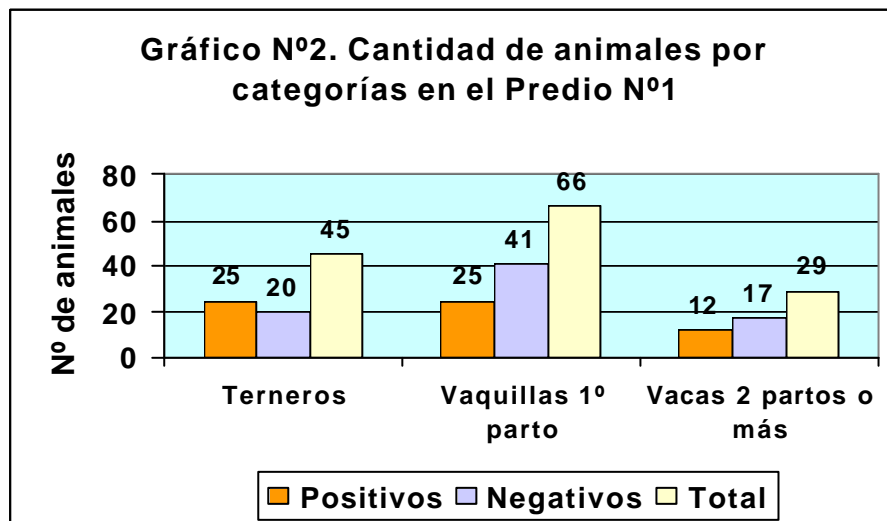
	Predio N°1	Predio N°4	Total animales positivos	%
Terneros	25	1	26	35,6
Vaquillas 1º parto	25	2	27	37,0
Vacas 2º parto y más	12	8	20	27,4
Total	62	11	73	100

Al comparar por categoría entre el Predio N°1 y el Predio N°4, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las categorías de terneros, vaquillas de primer parto y vacas de 2 partos o más en la presentación de anticuerpos neutralizantes contra VDVB.

En el predio N°1 de un total de 140 animales muestreados, se encontró 62 animales positivos VDVB, de los cuales 25 corresponden a la categoría de terneros, lo que equivale a un 40.3% de los animales positivos.

En la categoría de vaquillas de primer parto se encontraron 25 animales positivos, lo que corresponde al 40.3% de los animales positivos.

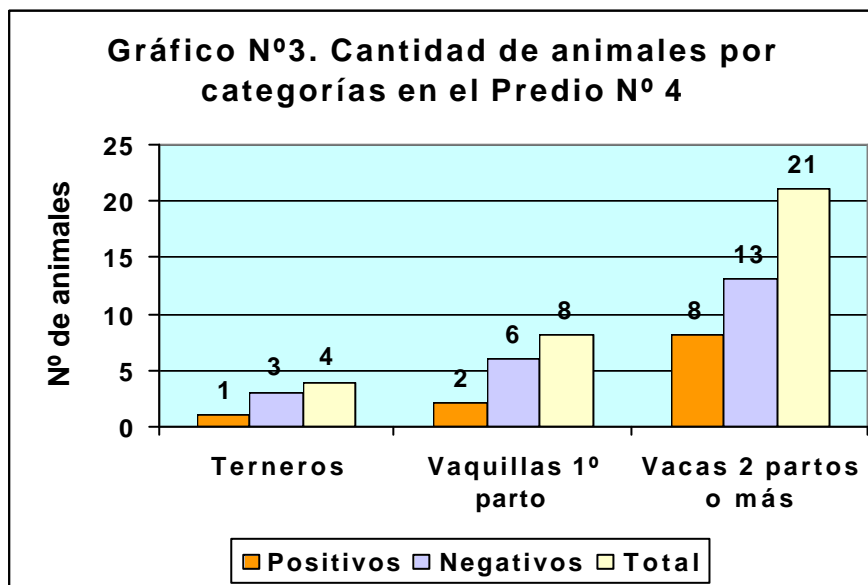
Para la categoría de vacas de 2 partos ó más, 12 animales poseen anticuerpos para el VDVB, lo que equivale a un 19.4% de los animales positivos. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las categorías para el predio N°1. Gráfico N°2.



En el predio N°4 de un total de 33 animales muestreados, 11 animales fueron positivos al VDVB lo que corresponde a un 33,3%, encontrándose 1 animal positivo en la categoría de terneros.

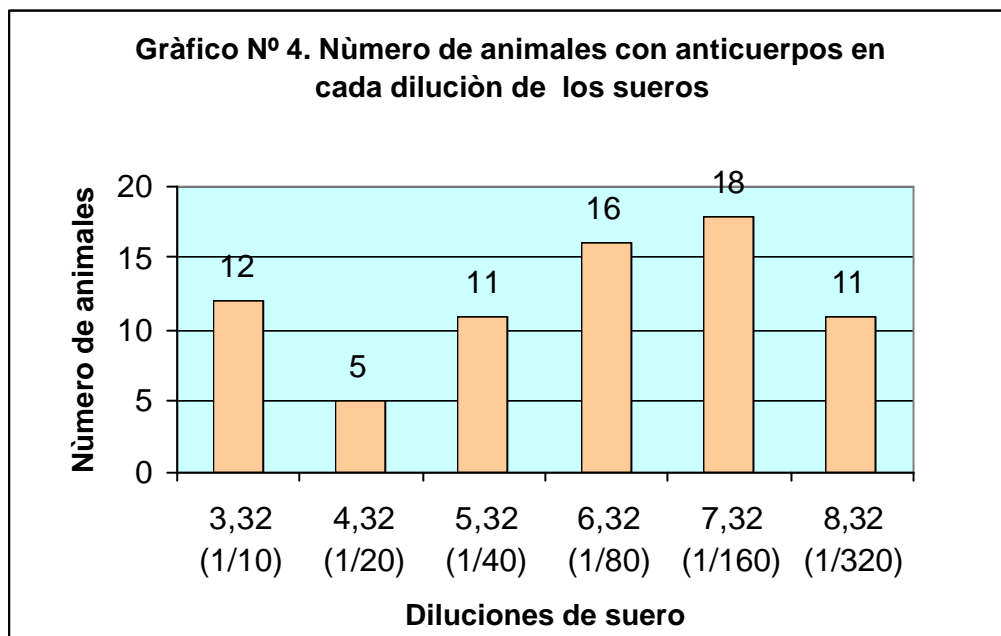
En la categoría de vaquillas de primer parto resultaron 2 animales positivos, lo que corresponde al 19.2% de los animales positivos.

En la categoría vacas de 2 partos ó más resultaron 8 animales positivos, lo que corresponde a un 72.7% de los animales positivos al VDVB. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre categorías en el predio N°4. Gráfico N°3



En cuanto a los anticuerpos neutralizantes se observó una mayor cantidad de animales con un título de anticuerpos de 1/160, lo cual corresponde a un 24.7% (18/73) del total de animales con anticuerpos neutralizantes, seguido de un título viral de 1/80 con 16/73 animales con anticuerpos lo que corresponde a un 21.9%.

La menor cantidad de animales (5/73) que presentó anticuerpos neutralizantes posee un título viral de 1/20, lo cual corresponde a un 6.8%. Gráfico N°4.

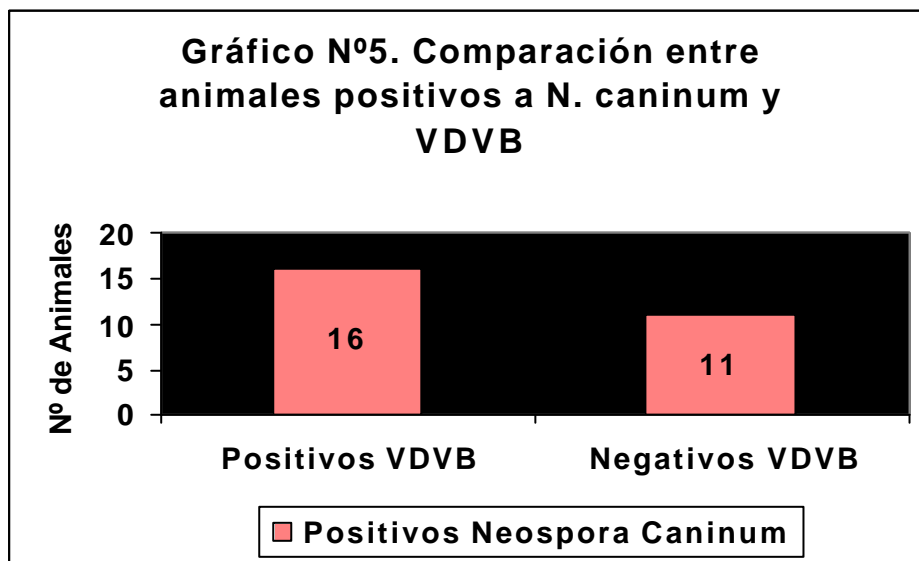


En el Predio N°1 además se analizó la relación animales positivos a *Neospora caninum* con la presentación de anticuerpos al Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB). De un total de 140 sueros analizados en el Predio N°1, 27 sueros son positivos a *N. Caninum*, de los cuales 16 resultaron con anticuerpos para el VDVB, lo que corresponde a un 59.3% (16/27). Tabla N°5.

Tabla N°5 Animales positivos a *N. Caninum* y a VDVB.

	Positivos a SN	Negativos a SN	total
Positivos a N. Caninum	16	11	27
Negativos a N. Caninum	46	67	113
Total	62	78	140

No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($\chi^2=2.334,1$; $p=0.1265$) en cuanto a animales positivos a *N. Caninum* y animales con anticuerpos para el Virus de Diarrea Viral bovina. Gráfico N°5.



18. DISCUSIÓN

En este estudio se utilizó la prueba diagnóstica de Seroneutralización, que es la prueba oficial en Chile para el diagnóstico de infección por el Virus de Diarrea Viral Bovina (Departamento de Protección Pecuaria, SAG).

La técnica de seroneutralización (SN), consiste en una prueba punto final seroneutralizante, que permite identificar y cuantificar la capacidad de los anticuerpos séricos para inhibir o neutralizar el efecto citopático de una cepa dada. Los anticuerpos neutralizantes son responsables del efecto protector del suero y están dirigidos contra determinantes antigenicos específicos de la superficie del virus (FAO, 1985). Se considera que esta técnica posee buena sensibilidad y especificidad (Reinhardt y col, 2001)

Los resultados de este estudio revelan que el 25.17% de los sueros analizados poseen anticuerpos para el Virus de Diarrea Viral Bovina. En el Predio N°1 esta proporción de anticuerpos alcanzó un 44,29% y en el Predio N°4 un 33.3%.

En la literatura se estima una prevalencia en el ganado lechero de 69.2% en la IX Región y de 77.8% para la X Región, con un 100% de los predios afectados (Reinhardt y col, 1990).

Esta proporción de animales positivos encontrada es alta, aunque menor a la señalada por Reinhardt y col 1990.

Una alta proporción de anticuerpos neutralizantes en rebaños abiertos, indica que dentro de ellos pueden existir animales persistentemente infectados, que son el principal reservorio para el virus, los que eliminan grandes cantidades de virus por sus excreciones y secreciones (Baker, 1990; Houe, 1999).

A nivel mundial el 60 a 80% de los animales presentan anticuerpos frente al virus y entre el 1 a 2 % esta persistentemente infectado (Houe, 1999).

Los animales persistentemente infectados permanecen no identificados en el rebaño por la falta de anticuerpos neutralizantes al Virus de Diarrea Viral Bovina en suero (Ames, 1986; Grooms y col, 2001).

La alta proporción de anticuerpos neutralizantes contra el VDVB encontrada en este estudio lleva a sospechar la presencia de animales persistentemente infectados, lo cual concuerda con un estudio realizado por Celedon y col 1998 en la Región Metropolitana, donde encontró predios con una prevalencia de 41% para VDVB y un 18% de animales persistentemente infectados.

La presencia de anticuerpos neutralizantes en ausencia de programas de vacunación en estos predios indica que la infección fue adquirida en forma natural.

Se puede establecer que la infección ocurre a muy temprana edad ya que existe un alto número de terneros y vaquillas de primer parto positivos.

Esto puede ser explicado por el sistema de producción, ya que los terneros son apartados de la madre y no adquieren la inmunidad adecuada, además se mantienen en lugares cerrados donde aumenta el contacto entre ellos y así aumenta el riesgo de contagiarse a partir de un individuo persistentemente infectado.

Por otra parte el incremento en la transmisión de VDVB en las vaquillas de reemplazo, coincide con la edad en la cual se remueven desde un lugar, disminuye la protección de los anticuerpos calostrales e incrementa su exposición a un gran número de vacas, algunas de las cuales poseen VDVB (Rush y col, 2001)

No obstante, a pesar de no haber manifestaciones clínicas en la mayoría de los rebaños del sur de Chile atribuibles al VDVB, no debe despreciarse la actividad inmunodepresora ocasionada por este virus, facilitando la invasión de otros patógenos. La inmunosupresión que resulta de una infección aguda juega un rol importante en provocar el complejo de enfermedades respiratorias bovinas y diarrea neonatal de los terneros (Kelling, 2004)

Las pérdidas económicas debido a la infección por VDVB varían dependiendo del estado inmune de la población y de la patogenicidad de la cepa viral infectante, se estima una incidencia anual de la infección de 34% (Houe, 1999)

En este estudio además no se encontró una relación entre *Neospora caninum* y VDVB, lo cual concuerda con lo señalado por Bartels y col 1999, Muñoz-Zanzi 2004; existen otros estudios como el de Björkman y col 2000, Antony y Williamson 2001, que sugieren que la infección por VDVB favorece el ingreso de otros patógenos a través de la barrera materno-fetal por la inmunosupresión que provoca el virus, y en el caso de *N. caninum* esta llevaría a una ruptura de los quistes en el tejido con la recrudescencia de la infección latente.

9. CONCLUSIONES

- ✍ La proporción de anticuerpos neutralizantes para el VDVB a nivel de predios de la IX región alcanzó un 50%, con un 25,17% de los animales positivos.
- ✍ La presencia de anticuerpos neutralizantes sin programas de vacunación en estos predios, indica que la infección es adquirida en forma natural.
- ✍ No se encontraron diferencias estadísticas significativas *entre los predios* para las 3 categorías en la proporción de anticuerpos neutralizantes para el Virus de Diarrea Viral Bovina.
- ✍ *Dentro de los predios* analizados no se encontraron diferencias estadísticas significativas para las tres categorías en la proporción de anticuerpos neutralizantes para el Virus de Diarrea Viral Bovina.
- ✍ No hubo diferencias estadísticas significativas en cuanto a animales positivos a *Neospora caninum* y animales con anticuerpos neutralizantes para el Virus de Diarrea Viral Bovina, por lo tanto en este estudio no se observó asociación entre estos dos agentes.

20. BIBLIOGRAFÍA

1. AMES, T. R. 1986. The causative agent of BVD: Its epidemiology and pathogenesis. *Vet. Med.* 81: 848-869.
2. ANTONY, A., N. B. WILLIAMSON. 2001. Recent advances in understanding the epidemiology of *Neospora caninum* in cattle. *N. Zeal. Vet. J* 49: 42-47.
3. BAKER, J. C. 1990. Clinical aspects of bovine virus diarrhoea virus infection. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9 (1): 25-41.
4. BARTELS, C. J., W. WOUDA, Y. H. SCHUKKEN. 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands. *Theriogenology* 52 (2): 247-257.
5. BJÖRKMAN, C., S. ALENIUS, U. EMANUELSSON, A. UGGLAS. 2000. *Neospora caninum* and Bovine Virus Diarrhoea Virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *The Veterinary Journal* 159: 201-206.
6. BLOOD, D. C., O. M RADOSTITS, C. C. GAY, K. W. HINCHCLIFF. 2002. *Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Vol. II Novena Edición.* Editorial Mc Graw-Hill Interamericana.
7. BOLIN, S. R. 1990. Bovine abortion caused by Bovine Viral Diarrhea virus. En *Laboratory Diagnosis of Livestock Abortion*, Ed Clyde A. Kirkbride. Iowa State University Press, Ames. 3rd edition, 121-128.
8. BOLIN, S. R., D. L. GROOMS. 2004. Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. *Vet. Clin. Food. Anim.* 20: 51-68.

9. BOLIN, S. R., A. W. McCLURKIN, R. C. CUTLIP, M. F. CORIA. 1985. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 46: 573-576.
10. BOLIN, S. R., J. F. RIDPATH. 1992. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *Am. J. Vet. Res.* 53: 2157-2163.
11. BROCK, K. V. 2004. Strategies for the control and prevention of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. Food. Anim.* 20: 171-180.
12. BROWNLIE, J. 1990. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9 (1): 43-59.
13. BROWNLIE, J., M. C. CLARKE, C. J. HOWARD. 1989. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Research in Veterinary Science* 46: 307-311.
14. BROWNLIE, J., M. C. CLARKE, C. J. HOWARD. 1984. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* 114: 535-536.
15. BROWNLIE, J., I. THOMPSON, A. CURWEN. 2000. Bovine virus diarrhoea virus – strategic decision for diagnosis and control. *In Practice vol. 22, 176-187.*
16. CELEDON, M. O., J. CARBONELL, L. IBARRA, J. PIZARRO. 1998. Detección de bovinos portadores e inmunotolerantes al virus de la diarrea viral bovina en predios lecheros de la Región Metropolitana de Chile. *Arch. Med. Vet.* v.30 n.1
17. CELEDON, M. O., L. PALACIOS, J. PIZARRO, L. IBARRA. 1997. Prevalencia de anticuerpos seroneutralizantes para el Virus de la Diarrea Viral Bovina en ganado de carne de la Región Metropolitana de Chile. *Av. Cs. Vet.* V. 12, n. 2.

18. CELEDON, M. O., L. ROCO, G. QUINTEROS, M. SANTIBAÑEZ, P. BERRIOS. 1997. Puesta en evidencia del virus diarrea viral bovina en bovinos clínicamente afectados. *Arch. Med. Vet.* v.29 n.2.
19. CELEDON, M. O., C. VARGAS, A. SALINAS, A. CASANAV, L. IBARRA, P. BERRÍOS. 1996. Prevalencia serológica para el virus de la diarrea viral bovina y de la rinotraqueítis infecciosa bovina en ganado lechero de la Región Metropolitana de Chile. *Av. Cs. Vet.* 11: 22-27.
20. CHARLESTON, B., M. D. FRAY, S. BAIGENT, B. V. CARR, W. I. MORRISON. 2002. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *Journal of General Virology* 82: 1893- 1897.
21. CORAPI, W. V., R. O. DONIS, E. J. DUBOVI. 1988. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea virus infections. *J. Virol.*, 62 : 2823-2827.
22. DEAN, H. J., B. D. HUNSAKER, O. D. BAILEY, T. WASMOEN. 2003. Prevention of persistent infection in calves by vaccination of dams with noncytopathic type-1 modified-live bovine viral diarrhea virus prior to breeding. *A. J. U. R.* 64 (5): 530-537.
23. DONIS, R. O, E. J. DUBOVI. 1987. Characterization of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells. *Journal of General Virology* 68: 1597-1605.
24. DUFFELL, S. J, J. W. HARKNESS. 1985. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec* 117, 240-245.
25. EDWARDS, S. 1990. The Diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9 (1): 115-130.

26. FAO, ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. 1985. Manual de técnicas de diagnóstico virológico.
27. FIEDLER, H., V. CUBILLOS, E. PAREDES, G. REINHARDT, S. RIEDEMANN, M. NIEDDA, M. AGUILAR. 1986. Enfermedad mucosa/diarrea viral bovina. Hallazgos anatómo-patológicos de los primeros casos en Chile. *Arch.Med.Vet.*, 18: 151-155.
28. FIELDS, B. N, D. M. KNIPE, P. M. HOWLEY, R. M. CHANOCK, J. L. MELNICK, T. P. MONATH, B. ROIZMAN, S. E. STRAUS. 1995. *Virology*. Third Edition, Vol. 1, Cap. 33: 1059-1073.
29. FRESHNEY, I. R. 1983. *Culture of cells, a manual of basic technique*. 11: 105-107.
30. FULTON, R. W., J. T. SALIKI, A. W. CONFER, L. J. BURGE, J. M. d" OFFAY, R. G. HELMAN, S. R. BOLIN, J. F. RIDPATH, M. E. PAYTON. 2000. Bovine viral diarrhoea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and type 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 33-38.
31. GOYAL, S. M., M. BOULJIHAD, S. HAUGERUD, J. F. RIDPATH. 2002. Isolation of bovine viral diarrhoea virus from an alpaca. *Journal vet. Diagn. Invest.* 14: 523-525.
32. GROOMS, D. L, L. KAISER, P. H. WALZ, J. C BAKER. 2001. Study of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus that lack detectable virus in serum. *J. A. V. M. A.* Vol. 219: 5.
33. GROOMS, D. L., E. D. KEILEN. 2002. Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, July 898-900.

34. HOUE, H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64: 89- 107.
35. JENSEN, R. 1968. Report of an adhez Committee on Technology for the Symposium on immunity to the bovine respiratory disease complex. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 152: 940-948.
36. JONES, L., L. WEBER. 2001. Aplication of single- strand conformation polymorphism to the study of bovine viral diarrhea isolates. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13: 50-56.
37. JONES, L., R. ZANDOMENI, L. WEBER. 2001. Genetic typing of bovine viral diarrhea virus isolates from Argentina. *Veterinary Microbiology* 81: 367- 375.
38. JUBB, K. V. F.; Kennedy, P. C., Palmer, N. 1994. Pathology of Domestic Animals. Academic Press Inc., New York, 1994, vol. 2.
39. KELLING, C. L. 2004. Evolution of bovine viral diarrhea virus vaccines. *Vet. Clin. Food Anim.* 20:115-129.
40. MEYER G., N. TAUTZ, E. J. DUBOVI, H. THIEL.1996. Origen and diversity of citopatogenic Pestivirus. International Symposium Bovine Viral Diarrhea Virus a 50 years Review, Cornell University, USA, pp. 24-34.
41. MUÑOZ-ZANZI, C. A., M. C. THURMOND, S. H. HIETALA. 2004. Effect of bovine viral diarrhea virus infection on fertility of dairy heifers. *Theriogenology* 61: 1085-1099.
42. NJAA, B. L., E. G. CLARK, E. JANZEN, J. A. ELLIS, D. M. HAINES. 2000. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 393-399

43. OIE. 1996. Bovine Viral Diarrhea. Capítulo X.5. Manual de Procedimientos: 651-659.
44. PALACIOS, L. R. 1996. Prevalencia serológica para el virus de la diarrea viral bovina en ganado de carne en predios de la Región Metropolitana. Memoria de título, Med. Vet. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
45. PATON, D. J. 1995. Pestivirus diversity. *J. Comp. Pathol.* 112: 215-236.
46. PEREZ, M. J., C. R. WILKS. 1995. Observations on BVD virus infection in New Zealand beef herds. *N. Zeal. Vet. J* 43: 85-86.
47. REINHARDT, G., L. CARRASCO, N. TADICH, S. RIEDEMANN.(2001). Comparación entre dos técnicas de diagnóstico para diarrea viral bovina (DVB) en 50 predios de la X Región, Chile. Seroneutralización y enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA-I)*. *Arch. Med. Vet.* v.33 n.2.
48. REINHARDT, G., S. RIEDEMANN, S. ERNST, M. AGUILAR, R. ENRIQUEZ, J. GALLARDO. 1990. Seroprevalencia of bovine viral diarrhea/ mucosal disease in southern Chile. *Prev. Vet. Med.* 10: 73-78.
49. RIDPATH, J. F.1996. Sequence diversity and genotyping. International Symposium Bovine Viral Diarrhea Virus a 50 years Review, Cornell University, USA, pp. 39-42.
50. RIDPATH, J., BOLIN, S. R., DUBOVI, E. J.1994. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology.* 205: 66-74
51. RÜMENAPF, T., G. UNGER, J. M. STRAUSS, H. THIEL. 1993. Processing of the Envelope Glycoproteins of Pestiviruses. *Journal of Virology* Vol. 67, nº 6, 3288-3294.

52. RUSH, D. M., C. THURMOND, C. A. MUÑOZ-ZANZI, S. HIETALA. 2001. Descriptive epidemiology of postnatal bovine viral diarrhoea virus infection in intensively managed dairy heifers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219(10):1426-1431.
53. SANDVIK, T. 2004. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. *Vet. Clin. Food. Anim* 20: 151-169.
54. THIEL, H. J., P. G. W. PLAGEMANN, V. MOENNIG. 1996. Pestivirus. "*Fields Virology*" (B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, editores) 3rd Ed. pp. 1059-1073. Lippincott- Raven Publishers. Philadelphia.
55. VILCEK, S., I. GREISER-WILKE, B. OBRITZHAUSE, A. DEUTZ, J. KÖFER. 2003. Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses the southeast of Austria (styria). *Veterinary Microbiology* 91: 285-291.
56. WALZ, P. H., T. G. BELL, J. L. WELLS, D. L. GROOMS, L. KAISER, R. K. MAES, J. C. BAKER. 2001. Relationship between degree of viremia and disease manifestations in calves with experimentally induced bovine viral diarrhoea virus infection. *Am. J. Vet. Res.* 62 (7): 1095-1103.