

Actualización en diarrea viral bovina, herramientas diagnósticas y estrategias de prevención

Andrea Pecora y María Sol Pérez Aguirreburualde



INTA || Ediciones

Colección
RECURSOS

Actualización en diarrea viral bovina, herramientas diagnósticas y estrategias de prevención

Andrea Pecora y María Sol Pérez Aguirreburualde

Agradecimientos

*Agradecemos las valiosas contribuciones de
María José Dus Santos, Darío Malacari y Viviana Parreño.*

2017



Ministerio de Agroindustria
Presidencia de la Nación

Actualización en diarrea viral bovina, herramientas diagnósticas y estrategias de prevención

Andrea Pecora y María Sol Pérez Aguirreburualde

Pecora, Andrea

Actualización en diarrea viral bovina, herramientas diagnósticas y estrategias de prevención / Andrea Pecora ; María Sol Pérez Aguirreburualde. - 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Ediciones INTA, 2017.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-521-853-6

1. Ganado Bovino. 2. Enfermedades. I. Pérez Aguirreburualde, María Sol II. Título
CDD 636.2



Dirección Nacional Asistente de Sistemas de Información, Comunicación y Calidad
Gerencia de Comunicación e Imagen Institucional
Comunicación Visual

Diseño: DG. *Liliana Estela Ponti*

No se permite la reproducción total o parcial de este libro, ni su almacenamiento en un sistema informático, ni su transmisión en cualquier formato o por cualquier medio, electrónico, mecánico, fotocopia u otros métodos, sin el permiso previo del editor.

Índice

Introducción	4
Capítulo 1. Manifestaciones clínicas	5
Capítulo 2. Situación en Argentina	8
Capítulo 3. Impacto económico	11
Capítulo 4. Diagnóstico	14
Capítulo 5. Vacunas	18
Capítulo 6. Detección y eliminación de animales PI	21
Capítulo 7. En qué situaciones sospechar, factores asociados al VDVB y riesgos a la vista	23
Conclusiones	24
Bibliografía	24

Introducción

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es uno de los agentes involucrados en los complejos respiratorio y reproductivo bovino y ocasiona importantes pérdidas económicas a nivel mundial. El VDVB pertenece al género Pestivirus, dentro de la familia Flaviviridae y se clasifica en dos genotipos denominados VDVB-1 y VDVB-2, según su secuencia génica. Dentro del VDVB-1 se han descrito 15 subgenotipos diferentes (a-p) (Nagai et al., 2008; Yilmaz et al., 2012) y dentro del VDVB-2 hay 3 subgenotipos (a-c) (Flores et al., 2002).

El VDVB es endémico en casi todo el mundo, prevaleciendo diferentes genotipos según las distintas regiones geográficas (Yeşilbağ, 2017).. Recientemente, una nueva variante, denominada VDVB-3 o “Virus HoBi-like”, ha sido aislada en países como Brasil, Italia, Tailandia e India, entre otros (Pecora et al., 2016); este patógeno no ha sido aislado en Argentina hasta el momento. Sin embargo, a partir de muestras bubalinas del noreste argentino se ha encontrado evidencia serológica de la circulación de esta variante viral (Pecora et al., 2016).

Manifestaciones clínicas

Cuando los animales se infectan, los signos generados por el VDVB pueden ser muy variables, pudiéndose observar cuadros respiratorios o gastrointestinales de gravedad variable, o inclusive pueden pasar desapercibidos (asintomáticos) (Ridpath, 2005). Por un lado, una particularidad importante de destacar del VDVB es que inmunosuprime al animal infectado, por lo cual este será más susceptible a contraer infecciones secundarias. Por este motivo, ha sido reportado que algunas enfermedades ven incrementada su frecuencia en los rodeos en los que está presente el VDVB, algunos ejemplos son: Rotavirus, Coronavirus, *Salmonella*, *Pasteurella*, Herpesvirus Bovino, etc.

Por otro lado, existen algunas cepas de alta patogenicidad pertenecientes al genotipo 2 del VDVB, que pueden producir infecciones agudas graves, con altas tasas de mortalidad, caracterizadas por signos tales como: hipertermia elevada, diarrea profusa, alta incidencia de abortos, reducciones significativas en la producción de leche y cuadros de muerte súbita. Existe también otro cuadro grave de enfermedad asociado este genotipo del VDVB, denominado Síndrome Hemorrágico, que se caracteriza por la presencia de hemorragias en múltiples órganos, diarrea sanguinolenta, epistaxis, anemia, leucopenia y trombocitopenia y alta tasas de mortalidad.

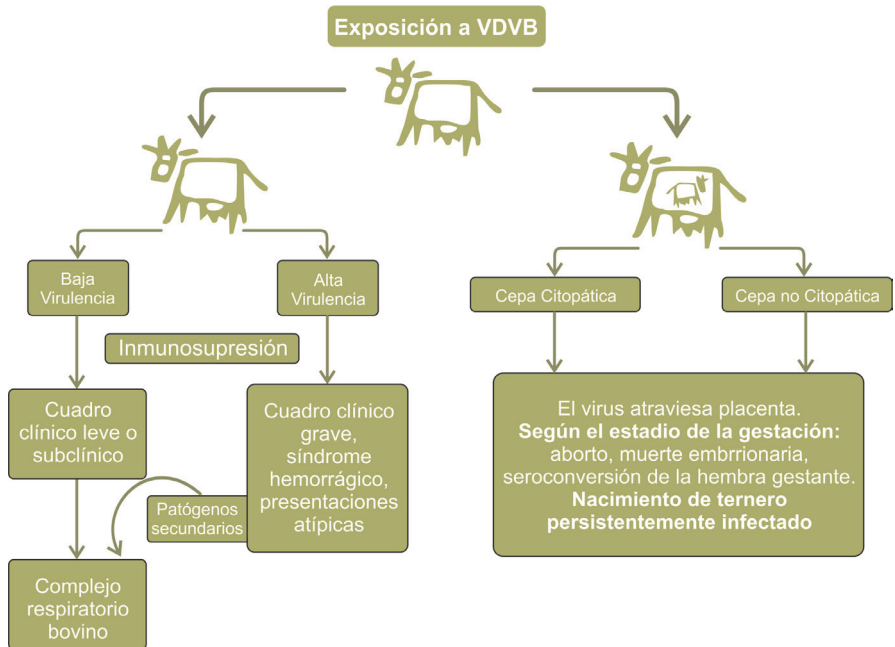
Aun existiendo estos casos de mayor gravedad clínica, la mayoría de las presentaciones del VDVB a nivel de los rodeos es de alta morbilidad y baja mortalidad. En la literatura se ha destacado su participación junto con otros agentes infecciosos en dos entidades sindrómicas muy estudiadas, el complejo respiratorio bovino y el complejo reproductivo bovino.

El complejo respiratorio bovino es descrito como una de las enfermedades más costosas para la industria ganadera a nivel mundial. Se describe como una entidad multifactorial en la cual los virus (Herpesvirus Bovino 1, Parainfluenza Bovina 3, Virus Sincicial Respiratorio Bovino o VDVB) actúan como los agentes infecciosos primarios, generando lesiones de la mucosa y comprometiendo la integridad del tracto respiratorio, ocasionando a continuación una inmunosupresión y por lo tanto predisponiendo la colonización de las mucosas por bacterias que actúan como invasores secundarios agudizando la severidad del cuadro clínico (Grissett et al., 2015). Las bacterias específicas que agravan el cuadro son: *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis*, *Pastuerella multocida*, *Histophilus somni* y *Tuerperella pyogenes*. Esta enfermedad se evidencia sobre todo en sistemas intensivos como los sistema de crianza artificial de terneros y los feedlot.

Pero sin lugar a dudas, el mayor impacto del VDVB en un rodeo se debe a su rol dentro del complejo reproductivo bovino, afectando los parámetros reproductivos de este. El tipo de consecuencia está determinado principalmente por la edad gestacional del feto en el momento de producirse la infección con el VDVB, pudiendo generar muerte embrionaria en etapas tempranas, observándose como repeticiones de celo, así como también abortos a lo largo de toda la gestación. La infección durante la gestación también puede desencadenar malformaciones congénitas, que se presentan en distintos tipos y grados, entre las que se describen más frecuentemente la hipoplasia o degeneración cerebelar, microencefalia, deformidades esqueléticas, retraso general del crecimiento, demielinización espinal, entre otras (Ridpath, 2005).

Una característica fundamental del VDVB es la capacidad de generar animales persistentemente infectados (PI). Estos animales se generan cuando las hembras preñadas se infectan con el VDVB entre los días 30 y 150 de gestación. Estos terneros nacen inmunotolerantes al VDVB, sin signología aparente, pudiendo pasar inadvertidos a simple vista, pero en realidad estarán excretando el virus permanentemente a través de todos los fluidos corporales (orina, mucosidades, saliva, leche, semen y materia fecal). Si bien la literatura reporta que el 80 % de los animales PI no supera los dos años de vida, considerando que está reportado que estos animales eliminan entre 1 y 10 millones de partículas virales infecciosas por mililitro de fluido corporal por día, y sabiendo que se estima que solo se requieren 10 partículas para infectar a otro animal, es indiscutible la eficacia de estos animales en perpetuar la infección en los rodeos.

Asociada a estos animales, existe otra presentación clínica denominada enfermedad de las mucosas. Esta ocurre cuando en un ternero PI el VDVB que tiene en su cuerpo sufre mutaciones específicas o cuando este animal se sobreinfecta con otra cepa de VDVB. Esta enfermedad cursa con hemorragias y culmina con la muerte del animal a las pocas semanas de contraerla. Las vacunas no son útiles sobre los animales PI y no existe tratamiento para la enfermedad de las mucosas (Bolin, 1995; Lindberg, 2003).



■ **Figura 1**

Consecuencias de la exposición al VDVB en bovinos en general (izquierda) y en hembras gestantes (derecha).

Capítulo 2

Situación en Argentina

En Argentina, relevamientos serológicos realizados en distintas regiones, arrojaron valores de seroprevalencia individual que van desde el 32 % al 100 % (tabla 1).

Robles, 2008 (3)	2004	Neuquén	74,6 % #	---
Pérez Aguirreburualde, 2014 (4)	2012	Chubut	77,89-81,76 %	92,51- 100 %
Pérez Aguirreburualde, 2016 (5)	2015	Cuenca del Salado, Buenos Aires	61,9-67,3 %	70,3-85 %
Pecora, 2017 (6)	2015	Noreste Argentino	32 % #	---

Tabla 1

Estudios de seroprevalencia realizados para VDVB en Argentina. # IC no informado.

A su vez, en nuestro país se ha reportado la presencia de VDVB de genotipos 1a, 1b y 2. En los últimos estudios filogenéticos realizados se observó el siguiente orden de frecuencia de los genotipos: 1.º VDVB-1b, 2.º VDVB-1a, 3.º VDVB-2 (Pecora et al., 2014; Pecora et al., 2017), tanto en un estudio de caracterización de 30 aislamientos obtenidos a partir de casos clínicos en bovinos de la Pampa húmeda como en otro estudio de caracterización de 50 cepas de VDVB a partir de lotes de suero fetal bovino (figuras 3a y b).

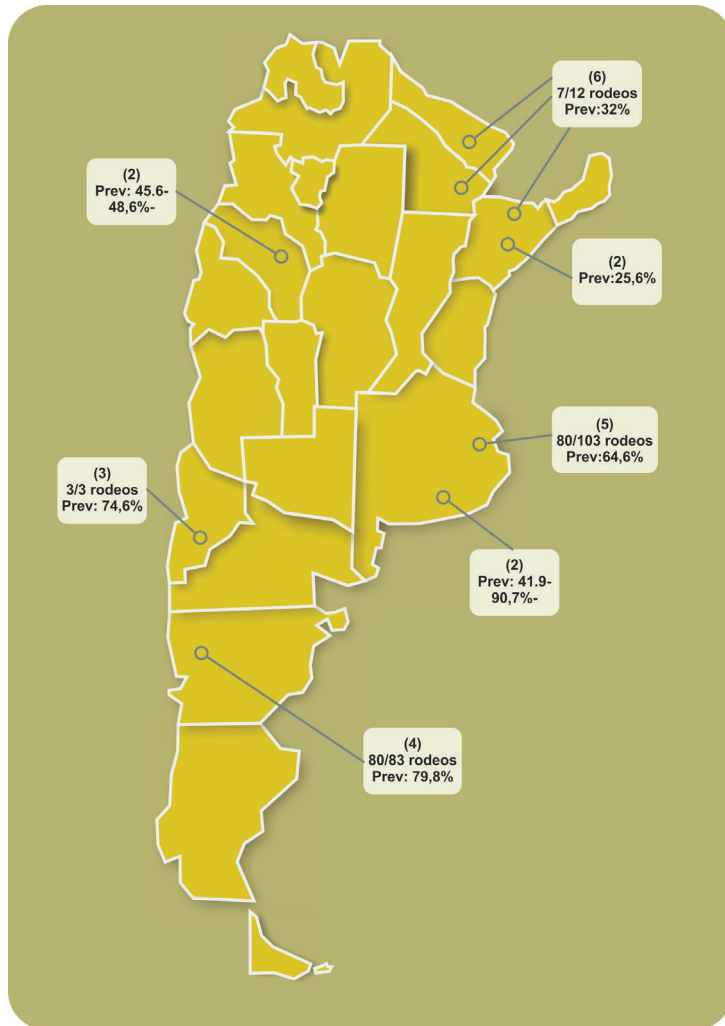


Figura 2

Media de prevalencias individuales de VDVB en rodeos bovinos de la Argentina 2001-2017. #: Rango de media de prevalencias según rango etario, Cat. A-C (Odeon et al., 2001). ##: Rodeos bubalinos. Los números entre paréntesis corresponden a los reportes citados en la tabla 1.

A su vez, en nuestro país se ha reportado la presencia de VDVB de genotipos 1a, 1b y 2. En los últimos estudios filogenéticos realizados se observó el siguiente orden de frecuencia de los genotipos: 1.° VDVB-1b, 2.° VDVB-1a, 3.° VDVB-2 (Pecora et al., 2014; Pecora et al., 2017), tanto en un estudio de caracterización de 30 aislamientos obtenidos a partir de casos clínicos en bovinos de la Pampa húmeda como en otro estudio de caracterización de 50 cepas de VDVB a partir de lotes de suero fetal bovino (figuras 3a y b).

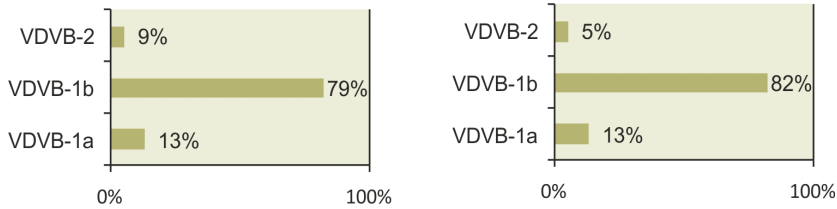


Figura 3

a) Genotipificación de aislamientos de VDV-B (n=30) aislados en la región de la Pampa húmeda a partir de los laboratorios de diagnóstico AZUL e INTA Balcarce, Argentina, en 2014 (Pecora et al., 2014). b) Genotipificación de aislamientos de VDV-B (n=50) provenientes de lotes de suero fetal bovino de Buenos Aires (Pecora et al., 2017).

Además de ser el que más circula en Argentina, una característica importante del subgenotipo 1b del VDV-B es que es altamente heterogéneo desde el punto de vista antigénico. Esto significa que las cepas que agrupan en este subgenotipo no siempre cruzan antigénicamente¹ entre ellas. Lo contrario ocurre entre las variantes VDV-B-1a y VDV-B-2, que parecen ser más homogéneas “intragrupo”.

¹ Un animal expuesto a una cepa de VDV-B desarrolla anticuerpos específicos para esa variante viral, que pueden ser insuficientes para proteger al animal si este se expone a otra cepa diferente desde el punto de vista antigénico.

Impacto económico

En el contexto del VDVB, muchos criterios deben ser tenidos en cuenta a la hora de evaluar el impacto de la infección en un rodeo. La existencia de animales infectados puede ser un buen índice para determinar la ocurrencia de la enfermedad en la población; aun así, el amplio espectro de manifestaciones clínicas debe ser considerado a la hora de estimar el real impacto económico.

Las estimaciones de las pérdidas que provoca la infección por el VDVB sobre la industria ganadera varían significativamente según distintos autores, y en la mayoría de los casos, los cálculos solo incluyen pérdidas directas, por lo que deben ser consideradas estimaciones de carácter conservador.

Según el tipo de establecimiento, el VDVB impacta de distintas maneras en los rodeos:

► **Tambo:** el VDVB reduce todos los índices reproductivos, pero en este caso el eje del problema no es el aborto en sí, sino la disminución de la producción futura de leche. Para el año 2013, se calculaba una pérdida de $\$156 \pm 51,49$ por vaca lechera en su ciclo anual reproductivo (Sabatini et al., 2013).

► **Feedlot:** en estos establecimientos, dado la corta duración del ciclo productivo, el mayor impacto se describe en la disminución de ganancia de peso de los animales que cursan con la infección clínica o subclínica. Se calcula una pérdida promedio de 140 g/día/animal, considerando una ganancia promedio de 1200 g/día/animal (Cámara Argentina de Feedlot, 2016). El ingreso de animales de diferentes orígenes al feedlot, el estrés asociado a un cambio de dieta abrupto y el hacinamiento, entre otras variables de manejo, generan un escenario ideal para la diseminación del VDVB. Los animales que se infectan con VDVB y que sufren la inmunosupresión concomitante, presentan un mayor riesgo de desarrollar infecciones por patógenos bacterianos de las vías respiratorias, mencionadas en el capítulo 1. De este modo, el complejo respiratorio bovino se presenta clínicamente, lo cual suele requerir tratamiento con antimicrobianos, sumándose el costo de estos a las pérdidas económicas.

En este tipo de establecimientos en particular, se ha comprobado que las pérdidas generadas por el VDVB disminuyen dramáticamente cuando los animales que ingresan han sido vacunados previamente a ser transportados al establecimiento (se recomienda vacunar tres semanas previas al transporte), esta práctica promueve que

los bovinos monten una respuesta inmune eficiente antes de ser expuestos al virus (Ridpath, 2005). Desafortunadamente la práctica habitual en una gran cantidad de establecimientos de nuestro medio, contrariamente a esta recomendación, opta por inmunizar a los animales cuando llegan al feedlot, reduciendo notoriamente la utilidad de la vacunación contra el VDVB.

► **Cría:** el VDVB impacta fundamentalmente en los parámetros reproductivos del rodeo y generando una disminución en la ganancia de peso de los animales enfermos. En el caso de establecimientos que realicen reposición con la compra de animales, los animales que ingresan al establecimiento deberían ser controlados para VDVB para descartar que sean PI, siendo recomendable que permanezcan apartados del resto del rodeo (cuarentena) hasta obtener los resultados confirmatorios de laboratorio.

► **Establecimientos de reproductores:** el semen es una fuente de contaminación con VDVB, por ese motivo los toros deben ser indefectiblemente controlados. En el sistema reproductivo de los toros, el VDVB puede generar una infección transitoria o quedar alojado en los testículos de manera persistente, diseminando el virus a través de semen de forma intermitente o durante toda su vida (figura 4). En los establecimientos de reproductores, las pérdidas económicas asociadas al VDVB también están dadas por los problemas gestacionales causados por el virus. Pero, fundamentalmente, el impacto está dado por las restricciones al comercio del semen ya que tanto la normativa internacional como regional requieren la ausencia de VDVB o de su material genético en las partidas de semen para exportación (Resolución Mercosur 32/14).

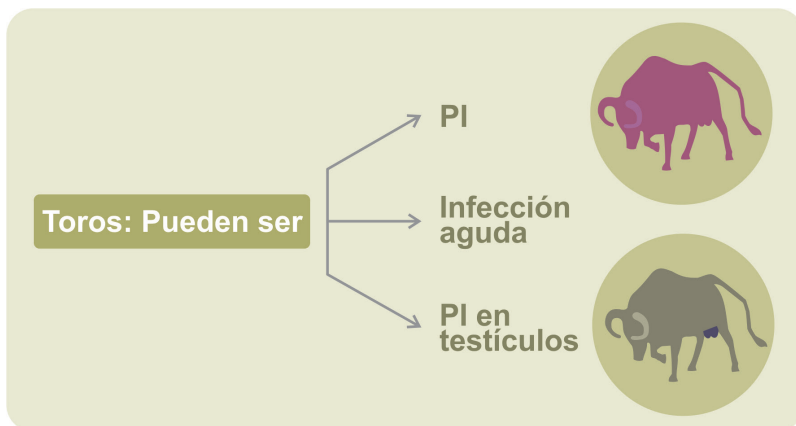


Figura 4
Posibilidades de infección por VDVB en toros.

El indiscutible y comprobado impacto económico de la DVB en los distintos tipos de establecimientos ha llevado a varias regiones del mundo a iniciar planes de erradicación, que en algunos casos han funcionado y en otros están aún en desarrollo (tabla 2). Estos planes, en algunos casos voluntarios y en otros obligatorios, se han basado y se basan en la eliminación de los animales PI, acompañado o no de vacunación según el caso (Sandvik, 2004; Szabára et al., 2015).

País	Inicio del plan	Estatus actual	Reintroducciones
Finlandia	1994 (voluntario)	Erradicado	No reportado
Noruega	1993 (voluntario)	Erradicado	No reportado
	2001 (obligatorio)		
Suecia	1993 (voluntario)	Erradicado	3 brotes: 2010-2011
	2002 (obligatorio)		
Dinamarca	1994 (voluntario)	Erradicado	2 brotes: 2013
	1996 (voluntario*)		
Austria	1997 (voluntario)	Erradicado	#
	2004 (obligatorio)		
Suiza	2008 (obligatorio)	Erradicado	Brote: 2014
Alemania	2011 (obligatorio)	-	#
Escocia e Irlanda	2011-2012 (voluntario)	-	#
	2012-2013 (obligatorio)		
Francia	(Voluntario)	-	#
Holanda	(Voluntario)	-	#
Bélgica	2012 (voluntario)	-	#
	2015 (obligatorio)		

Tabla 2

Ejemplo de planes de erradicación en distintos países. Tabla adaptada de: Sandvik et al., 2004; Stahl et al., 2012. #: Información no disponible. *: con restricción de movimientos. Para todos los países que lograron el estatus de erradicación, la DVB se convirtió en una enfermedad de reporte obligatorio.

Capítulo 4

Diagnóstico

El uso de las técnicas diagnósticas para VDVB requiere de un conocimiento y comprensión de la patogenia de la enfermedad. De lo contrario, la interpretación correcta de los resultados es difícil. Es importante tener una buena comprensión del VDVB o trabajar con un veterinario que entienda las complejidades del virus, y de ese modo decidir los ensayos que se deban realizar.

Por un lado, los diagnósticos de VDVB se realizan por dos razones. La primera razón es para identificar si el virus es la causa o parte de un problema clínico que ha sido identificado. Se dispone de una variedad de ensayos para identificar al virus en sangre o hisopados tomados de animales enfermos o muestras de tejido tomadas en necropsia (tabla 3). Por otro lado, la detección de una respuesta inmune contra el VDVB (títulos de anticuerpos) puede ser útil en situaciones en las que se dispone de información previa sobre el estado inmunitario de un animal (tabla 5).

El segundo uso de los ensayos de diagnóstico de VDVB –y el más importante en un programa de control del virus– es para la identificación de bovinos PI. Mediante la identificación y eliminación de los animales PI, el riesgo de transmisión del VDVB dentro y entre los establecimientos se reduce significativamente. Los animales PI pueden ser identificados mediante la detección de virus en muestras de sangre o de tejido.

Técnicas diagnósticas disponibles:

► Para determinar la presencia del VDVB (detección de animales PI o infección aguda) (tabla 3) se cuenta con las siguientes metodologías:

- Aislamiento Viral,
- Detección del antígeno viral,
- Detección del genoma viral.

- **Aislamiento Viral.** Esta técnica permite detectar virus infeccioso en muestras clínicas.

Para realizar el aislamiento viral, se requiere mano de obra calificada para trabajar con células, equipamiento y disponibilidad de cultivos celulares. El procedimiento lleva como mínimo tres semanas de trabajo debido a la necesidad de realizar múltiples pasajes en líneas celulares susceptibles al VDVB. A través de estos pasajes celulares se logra aumentar la concentración del virus y el último paso implica el

revelado a través de la detección del antígeno viral en las células infectadas con anticuerpos policlonales o monoclonales marcados con fluorocromos (inmunofluorescencia) o bien detectar el genoma viral por RT-PCR (reacción de transcriptasa reversa seguido de reacción en cadena de la polimerasa).

Para realizar el aislamiento viral, se puede partir de diversas muestras como hisopados nasales u oculares, sangre entera (fresca sin congelar), suero, plasma semen, órganos obtenidos de necropsias: preferentemente aquellos que tengan alta concentración de células linfocíticas: placas de Peyer, ileon, bazo, timo (fetos), pulmón e hígado (Grooms, 2012).

- **Detección del antígeno viral:** ELISA de antígeno. Estos análisis se basan en la detección de proteínas conservadas del virus (Erns o NS3/p80). Existen kits comerciales importados que utilizan muestras de suero, sangre entera o leucocitos y en los cuales se siembran en placas las muestras individuales de cada animal que se quiera evaluar. El procedimiento lleva 2 o 3 horas. Una variante de esta técnica es el *Ear-notch* (kit importado). Se extraen muestras del tejido de 1x2 cm del margen inferior de la oreja con un dispositivo de corte y se almacena congelado o en formalina al 10 %. Luego las muestras son procesadas por ELISA.

- **Detección de genoma viral:** RT-PCR y RT-PCR en tiempo real. Estas técnicas detectan material genético del VDVB. El procedimiento abarca una extracción de ARN viral a partir de la muestra seguida por una reacción de retrotranscripción, y finalmente, la PCR propiamente dicha. Por un lado, en el caso de la PCR convencional, el resultado se obtiene mediante la corrida de un gel de agarosa para visualizar una banda específica. Todo el proceso requiere aproximadamente 1-2 días de trabajo, dependiendo del laboratorio de diagnóstico. Por un lado, en el caso de la PCR en tiempo real, el resultado se obtiene directamente a través del software asociado al equipo utilizado. Se puede trabajar con muestras de suero, sangre entera o leucocitos. Algunas variantes de la PCR en tiempo real permiten realizar pooles de hasta 50 sueros por determinación, lo que reduce significativamente el costo de la técnica. En el mercado hay kits comerciales, pero también algunos laboratorios de diagnóstico veterinario realizan la técnica estandarizada por ellos mismos y validada con cepas aisladas en nuestro país. Cuando se decide trabajar con pooles de muestras, si hay algún resultado positivo, es necesario abrir los pooles volver a analizar cada muestra individual para encontrar al animal que está cursando una infección aguda o al PI.

Técnica	Qué detecta o cuantifica	Ventajas	Desventajas
Aislamiento Viral	VDVB infeccioso	-Muy sensible -Es el único método para "aislar" una cepa	-Alto costo -Lleva mucho tiempo el procesamiento
ELISA para antígeno	Proteínas específicas delVDVB	-Fácil de realizar -Rápido -No requiere aparatología sofisticada	-No se pueden <i>pool</i> ear muestras - Alto costo - Importación
RT-PCR	ARN del VDVB	-Rápido	- Alto costo
RT-PCR en tiempo real	ARN del VDVB	-Rápido -Sensible -Permite <i>pool</i> ear muestras	-Costo más bajo si se <i>pool</i> ean muestras -Aparatología costosa

Tabla 3

Técnicas diagnósticas para detectar al VDVB, a su antígeno o a su material genético.

► Para determinar niveles de anticuerpos contra VDVB (generados por vacunación o exposición al virus) (tabla 4):

- **ELISA de anticuerpos.** Existen diversos ELISAs comerciales para la detección de anticuerpos dirigidos contra el virus completo o contra proteínas del VDVB, como Erns o NS3 (p80), que son conservadas, por lo cual detectan anticuerpos contra cualquier variedad de VDVB. Estas técnicas utilizan suero o plasma y el resultado se puede obtener en unas pocas horas (tabla 5).

- **Neutralización viral.** Esta técnica es considerada el método *Gold Standard* para determinar niveles de anticuerpos neutralizantes contra VDVB en muestras de suero o plasma. Requiere mano de obra calificada para trabajar con células, equipamiento y disponibilidad de cultivos celulares. La técnica lleva 3 días aproximadamente y el resultado obtenido es dependiente de la cepa de VDVB utilizada en el ensayo. Es decir, un título de anticuerpos neutralizantes obtenido por neutralización con una cepa de subgenotipo 1a no es "absoluto" dado que no será el mismo para diferentes cepas de otra variante viral, como VDVB-2b o 2, ya que los subgenotipos y genotipos... ya que los subgenotipos y genotipos de VDVB no cruzan siempre entre ellos. Por eso, el análisis de anticuerpos neutralizantes contra un solo tipo de VDVB conduce en muchos casos a la subestimación de la circulación de la enfermedad o a informar resultados falsos negativos.

Algunos laboratorios presentan los resultados como títulos de anticuerpos neutralizantes, que son el logaritmo base 10 de la inversa de la máxima dilución en la cual el suero mostró neutralización contra el VDVB. Con la metodología de titulación de

punto final, utilizada frecuentemente para informar resultados de neutralización viral, el valor 0,30 (logaritmo de la inversa de la dilución 1/2 de suero o muestra analizada) significa que el animal no posee anticuerpos neutralizantes contra la cepa de VDVB

Dilución del suero	Título (Log10)
<8	0,3
8	0,9
16	1,2
32	1,5
64	1,8
128	2,1
256	2,4
512	2,7
1024	3

Tabla 4

Diluciones seriadas en base 2 de sueros evaluados por neutralización viral y sus correspondientes títulos según el método de punto final. Los títulos varían en función de la cantidad de réplicas que se siembre de cada muestra. El manual de la OIE recomienda llevar a cabo el ensayo utilizando entre 2 y 4 réplicas por muestra (Vallat, 2008).

utilizada en el ensayo, o sea, es seronegativo. Los valores de anticuerpos neutralizantes más altos, generalmente obtenidos en animales infectados o vacunados con formulaciones de óptima calidad, corresponden a un título neutralizante de 3, que es el logaritmo en base 10 de la inversa de la dilución de 1/1024. Otros laboratorios de diagnóstico optan por informar los valores serológicos directamente como la dilución final del suero en la cual el animal posee anticuerpos neutralizantes (tabla 4).

Técnica diagnóstica	Qué detecta o cuantifica	Ventajas	Desventajas
ELISA Comercial basado en el virus completo	Todos los anticuerpos neutralizantes o no) contra todas las proteínas virales.	-Simple -Económico	-Menor sensibilidad
ELISA basado en la proteína NS3 o Erns	Anticuerpos contra una proteína conservada del virus	-Simple -Económico -Detecta todas las variantes virales	-Alta sensibilidad y especificidad
Neutralización viral	Mide los anticuerpos neutralizantes contra el virus	-Muy Sensible - <i>Gold Standard</i>	- Genotipo-específico - Sensibilidad Cepa-dependiente

Tabla 5

Técnicas diagnósticas para detectar serología contra VDVB.

Capítulo 5

Vacunas

La vacuna para el control del VDVB es una herramienta ampliamente utilizada en muchas regiones del mundo, de la que hay múltiples presentaciones disponibles. Las primeras vacunas contra el VDVB en la Argentina fueron ingresadas a mediados de la década de los ochenta. Actualmente, las vacunas utilizadas en nuestro país contra el VDVB son de elaboración nacional y por regulatoria todas son a virus muerto, es decir, químicamente inactivadas.

Los dos objetivos primordiales para la utilización de vacunas contra la DVB son:

- Generar una cobertura inmunitaria poblacional que limite el impacto de la diseminación de la infección por VDVB en el rodeo y que reduzca la severidad de los signos clínicos.
- Impedir la transmisión vertical del VDVB, evitando así la generación de animales PI.

En forma genérica, a las vacunas contra el VDVB se las clasifica de acuerdo a su eficacia en lograr los dos objetivos mencionados: el primero, lograr establecer una respuesta inmune suficiente para evitar o reducir significativamente la signología de la infección aguda, y por ende la concomitante pérdida productiva. El segundo es el objetivo de máxima, pero a su vez el que exige mucho más de la respuesta evocada por la vacuna; este debe generar una respuesta inmune lo suficientemente sólida para evitar la transmisión vertical del virus en una hembra gestante, evitando cualquier tipo de consecuencia reproductiva como así también la generación de un animal PI. Es importante destacar que en muchos países, como por ejemplo Estados Unidos, por normativa de la autoridad sanitaria oficial, las etiquetas de las vacunas deben detallar el objetivo para el cual dicha vacuna fue testeada y validada.

Comúnmente, las vacunas comercializadas en Argentina que contienen el VDVB en su formulación pertenecen al conjunto de “vacunas combinadas” las cuales son polivalentes e incluyen otros patógenos virales y bacterianos asociados a los complejos respiratorio y reproductivo del bovino. En el mercado hay más de una veintena de formulaciones registradas que contienen VDVB (Registro de Biológicos, SENASA). La mayoría de las formulaciones está constituida por cepas de referencia de VDVB del subgenotipo 1a y en algunos casos incluyen VDVB de genotipo 2. A su vez, estas vacunas pueden ser formulaciones acuosas u oleosas. El tipo de adyuvante no afecta *per se* la eficacia de la formulación.

Llamativamente, el subgenotipo 1b del VDVb, que se ha comprobado es el de mayor circulación, por ahora, en Argentina, no está incluido en las formulaciones comerciales nacionales (figura 5). Este punto es de gran importancia, ya que las diferencias antigénicas entre las distintas variantes del VDVb pueden ser causantes de falla vacunal (Littledike et al., 1993).

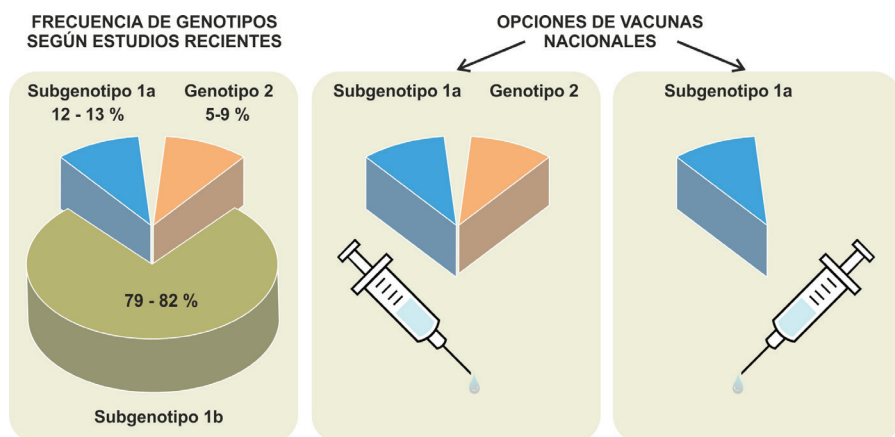


Figura 5 Frecuencias de genotipos de VDVb obtenidos en estudios realizados (ver tabla 1a y b) y genotipos representados en las vacunas nacionales.

Evaluación de eficacia vacunal

En Argentina, las vacunas que se comercializan, al momento de ser registradas deben presentar pruebas de inmunogenicidad. En los últimos años se han logrado importantes avances en el control de dichas formulaciones ya que en diciembre de 2012 el SENASA elaboró la resolución 598/2012 que regula, entre otras cosas, la evaluación de potencia de las vacunas virales no vesiculares para bovinos. Esta resolución determina que las series vacunales deberán someterse a un control de inmunogenicidad en el Modelo Cobayo INTA, modelo desarrollado y validado estadísticamente por investigadores de INTA frente a la especie de destino. Brevemente, para evaluar la calidad inmunogénica de las vacunas, por tratarse de formulaciones a virus inactivado o a subunidades, se inmunizan a los cobayos con dos dosis de vacuna correspondiente a 1/5 de las dosis bovina, con un intervalo de 21 días y luego se evalúa el título de anticuerpos neutralizantes en suero a los 30 días posprimera dosis. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que vacunas que inducen títulos de anticuerpos neutralizantes promedios iguales o mayores a 1,37 en cobayos se asocian con títulos de anticuerpos de 1,54 o mayor en bovinos y se clasificarían como de calidad satisfactoria a la luz de su relación con el grado de protección frente al desafío viral en el modelo ternero privado de calostro (Malacari, 2014; Pecora, 2014). De esta manera, se garantiza a los pro-

ductores contar en el mercado con vacunas que inducen una apropiada respuesta de anticuerpos neutralizantes al aplicarla en bovinos (Parreño et al., 2016).

El punto de corte de la validación realizada establece que un grupo de bovinos vacunados con una vacuna de calidad satisfactoria debe desarrollar un título de anticuerpos neutralizantes promedio no menor de 1,54, medido por seroneutralización, que equivale a una dilución del suero bovino de 1/32 luego de la vacunación y del refuerzo. Se espera que en los próximos años, el control sea punitivo y las vacunas que no cumplan con este requisito deban ser mejoradas para poder comercializarse.

Más allá del logro del Modelo Cobayo en el área de control de las vacunas virales bovinas, que es un herramienta rápida y económica para evaluar la calidad de las series de vacunas, hasta el día de hoy en Argentina no se evalúa a las formulaciones en cuanto a su capacidad de reducir la signología clínica de la enfermedad, lo cual solo puede realizarse mediante pruebas de desafío viral en la especie de destino. Estas pruebas son muy complejas y costosas y resultan poco prácticas para analizar a todas las formulaciones comerciales. No obstante, el INTA ha desarrollado un modelo de desafío de terneros privados de calostros con las cepas prevalentes a campo, que podría ser una herramienta adecuada para el control de registro de las vacunas que contienen VDVB en su formulación (Malacari et al., 2016).

Como se mencionó anteriormente, con la vacunación se intenta aumentar la inmunidad poblacional de los rodeos, y de esta manera trabajar en la extinción de la diseminación del agente en la población. Por esto es crítico lograr la mayor cobertura vacunal posible para que la estrategia sea eficaz. En nuestro país la vacunación contra el VDVB no es obligatoria ni tampoco existe un plan oficial voluntario de control. Basándose en la relación entre las dosis vacunales producidas año tras año contra el VDVB y el stock ganadero nacional, es evidente que los bovinos no estarían recibiendo una inmunización recomendada y efectiva.

De todos modos, el control del VDVB no se puede lograr por medio de la vacunación solamente, independientemente de la calidad de las vacunas, básicamente porque no elimina a los animales portadores del virus (PI). Por ello, al momento de utilizarlas, hay que tener en cuenta el rol relativo de las vacunas en el control del VDVB y la importancia crítica de iniciar un saneamiento racional de animales PI en los rodeos.

Detección y eliminación de animales PI

La detección y eliminación de los animales PI es fundamental para el control del VDVB. Las técnicas que pueden emplearse para ello fueron mencionadas en el capítulo 4 y utilizan como muestras: sangre, suero, semen, hisopados nasales u oculares o tejido de oreja.

Luego de la primera toma de muestra, el resultado puede ser positivo y no tratarse de un animal PI, sino ser una infección aguda producida recientemente. Por lo que se recomienda realizar otra determinación a las 3 o 4 semanas posteriores para poder confirmar o descartar la infección persistente. Si la segunda determinación de un animal también es positiva, significa que es PI (tabla 6).

Lo contrario ocurre para la detección de anticuerpos en los animales no PI: luego de 3 o 4 semanas posinfección o posvacunación los animales seronegativos seroconvierten alcanzando altos niveles de anticuerpos. Los títulos alcanzados por los animales que sufrieron infecciones agudas suelen ser más elevados que los títulos alcanzados luego de las vacunaciones. Esta situación no se replica en los animales PI, ya que por lo general estos son seronegativos durante toda su vida. Por último, las madres gestantes de terneros PI presentan títulos muy elevados de anticuerpos. Dos puntos importantes para tener en cuenta para la detección y eliminación de PI son:

- Cualquiera sea la técnica elegida para la búsqueda de animales PI, es fundamental apartar a los animales que sean positivos en las dos determinaciones realizadas, distanciadas de 3 o 4 semanas entre sí.
- Prestar atención a los terneros de menos de 6 meses: estos animales pueden presentar anticuerpos calostrales que enmascaran al antígeno de VDVB, por lo cual podría obtenerse un falso negativo si se utiliza la técnica de ELISA. Este inconveniente se evita si se trabaja con técnicas moleculares como PCR o PCR en tiempo real.

PRIMERA DETERMINACIÓN	SEGUNDA DETERMINACIÓN	INTERPRETACIÓN
+	+	ANIMAL PI – ¡¡¡APARTARLO!!!
+	-	INFECCIÓN AGUDA (NO PI)
-	+	INFECCIÓN AGUDA (NO PI)
-	-	ANIMAL NO INFECTADO

Tabla 6

Posibilidades de resultados de las técnicas para la detección de antígeno o ARN del VDVB.

En qué situaciones sospechar de VDVB: factores asociados y riesgos a la vista

Se aconseja sospechar de diarrea viral bovina cuando se observan abortos, muerte embrionaria, cuadros gastrointestinales con o sin hemorragias o cuadros respiratorios incluyendo neumonía.

Cuando ingresa hacienda a cualquier tipo de establecimiento bovino es un momento en el que puede introducirse el VDVB, por lo cual hay que chequear a los animales que ingresan.

Asimismo, hay que prestar especial atención a la convivencia de los bovinos con otras especies animales, como ovejas, cabras, ciervos, búfalos, cerdos, etc., que pueden ser reservorios de VDVB en particular y de otros pestivirus.

Durante el manejo de tecnologías reproductivas, no habría que desestimar la posibilidad de tener inconvenientes vinculados al VDVB. Este virus, al igual que los demás pestivirus, es un contaminante muy común de productos biológicos como suero fetal bovino no irradiado, utilizado comúnmente en técnicas de laboratorio y en la preparación de vacunas. Asimismo, el semen puede ser fuente de diseminación del VDVB, por lo cual habría que analizar este antes de la inseminación.

Conclusiones

La diarrea viral bovina muchas veces no es diagnosticada por los veterinarios y hay falta de concientización con respecto a sus implicancias económicas. Es indiscutible que la aplicación de vacunas no alcanza para solucionar el problema generado por el VDVb, pero muchas veces sigue siendo la única estrategia de control utilizada para minimizar su impacto productivo, aunque los veterinarios deberían pensar en incorporar nuevas estrategias, principalmente de diagnóstico, para el manejo integral de la infección en los rodeos.

Si bien llevar a cabo un plan de saneamiento a nivel rodeo requiere una alta inversión inicial, está ampliamente reportado que si se acompaña posteriormente dicha decisión con herramientas de bioseguridad en el establecimiento, el análisis costo-beneficio teniendo en cuenta las pérdidas asociadas al VDVb evitadas, es ampliamente favorable (Stahl, et al., 2012; Odeón et al., 2016; Weir et al., 2010).

Bibliografía

- BOLIN, S.R. 1995. The pathogenesis of mucosal disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 11 (3), 489–500.
- FLORES, E.F.; RIDPATH, J.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; GIL, L.H. 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates : evidence for a subgenotype within. *Virus Research*, 87, 51–60.
- GRISSETT, G.P.; WHITE, B.J.; LARSON, R.L. 2015. Structured Literature Review of Responses of Cattle to Viral and Bacterial Pathogens Causing Bovine Respiratory Disease Complex. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29 (3), 770–780.
- GROOMS, D.L. 2012. Diagnostic Testing and Strategies for BVDV. *Michigan Dairy Review*, 1–5.
- LINDBERG, A.L. 2003. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. *A review. Vet. Q*, 25 (1), 1–16.
- LITLEDIKE, E.T.; BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F.; LITLEDIKE, E.T.; BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. 1993. Consequences of Antigenic Diversity of Bovine Viral Diarrhea Virus. Universidad de Nebraska.
- MALACARI, D. 2014. Desarrollo de un modelo de infección para el Virus de la Diarrea Viral Bovina en terneros privados de calostro para su aplicación en la evaluación de vacunas y estudios inmunopatológicos. Tesis doctoral de la Universidad de Buenos Aires.
- MALACARI, D.; PECORA, A.; CAPOZZO, A.V.; ODEÓN, A.C. 2016. Guía para la crianza y mantenimiento de terneros privados de calostro para su utilización como modelo animal. INTA Ediciones, 53, 1689–1699.
- MERCOSUR. 2014. Requisitos zoonosarios de Mercosur para importar semen bovino y bubalino congelado.
- NAGAI, M.; HAYASHI, M.; ITOU, M.; FUKUTOMI, T.; AKASHI, H.; KIDA, H.; SAKODA, Y. 2008.

- Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes*, 36 (1), 135–9.
- ODEÓN, A.C.; SPÄTH, E.J.A.; PALOMA, E.J.; LEUNDA, M.R.; SAINZ, I.J.; FERNÁNDEZ, F.; FERNÁNDEZ SAINZ, I.J.; PÉREZ, S.E.; KAISER, G.G.; DRAGHI, M.G.; CETRA, B.M.; CANO, A. 2001. Seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina, Herpesvirus Bovino y Virus Sincicial Respiratorio en Argentina, *Preventive Veterinary Medicine*, 82 (4).
- ODEÓN, A.C.; GONZALEZ ALTAMIRANDA, E.; GOIZUETA, M.; VERNA, A.; LOUGE URIARTE, E.; SPETTER, M SPATH, E., CASTELLANO, A.; ODRIOZOLA, E.; CANTON, G.; FERNANDEZ, J.; FINELLI, J.; PEREYRA, S.; LEUNDA, M.R.; RECALT, V.; CAPOZZO, A.; MALACARI, D. 2016. Valorización económica de la implementación de una estrategia sanitaria de control del VDVB en un establecimiento de cría. Premio Biogénesis Bagó.
- PARREÑO, G.V. 2017. Guía de control de potencia de vacunas contra la Diarrea Viral Bovina CAMEVET y PROSAIA. Comunicación personal en CAPROVE, Buenos Aires.
- PECORA, A.; MALACARI, D.; RIDPATH, J.F.; PÉREZ AGUIRREBURUALDE, M.S.; COMBESIES, G.; ODEÓN, A.C. ROMERA, S.A.; GOLEMBIA, M. D.; WIGDOROVITZ, A. 2014. First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Res. in Vet. Science*, 96 (1), 204–212.
- PECORA, A. 2014. Desarrollo de una vacuna a subunidad contra el Virus de la Diarrea Viral Bovina tipo 1 y 2 basadas en la optimización de la presentación antigénica de la proteína E2. Tesis doctoral de la Universidad de Buenos Aires.
- PECORA, A.; PÉREZ AGUIRREBURUALDE, M. S.; MALACARI, D.; ZABAL, O.; BAUERMANN, F.V.; RIDPATH, J.F.; DUS SANTOS, M.J. 2016. Pestivirus emergentes HoBi : impacto en salud animal y su importancia como contaminante de insumos biotecnológicos. *RIA*, 42 (3), 252–257.
- PECORA, A.; PÉREZ AGUIRREBURUALDE, M.S.; MALACARI, D.; ZABAL, O.; SALA, J.M.; KONRAD, J.L.; CASPE, S.G.; BAUERMANN, F.V.; RIDPATH, J.F.; DUS SANTOS, M.J.D. 2017. Serologic evidence of HoBi-like virus circulation in Argentinean water buffalo. *JVDI*, 1–4.
- PECORA, A.; PÉREZ AGUIRREBURUALDE, M.S.; ZABAL, O.; DUS SANTOS, M.J. 2017. Detección de Pestivirus a partir de lotes de suero fetal bovino nacional. Congreso Internacional de la Sociedad Argentina de Virología.
- PÉREZ AGUIRREBURUALDE, M.S. 2014. Desarrollo y evaluación de herramientas biotecnológicas innovadoras para el control del virus de la Diarrea Viral Bovina en la provincia del Chubut. Tesis doctoral de la Universidad de Buenos Aires.
- PÉREZ AGUIRREBURUALDE, M.S.; PECORA, A.; FERELLA, A.; TASSARA, F.; TORRES, A.; SILVA, H.; DUS SANTOS, M.J.; LEÓN, E. 2016. Spatial distribution of antibodies against bovine viral diarrhoea virus in two regions of Argentina, *GEOMET*, Santiago de Chile.
- RIDPATH, J.F. 2005. *BVDV Diagnosis, Management, and Control*. Blackwell Publishing.
- ROBLES, C. 2008. Plan para la Prevención y Control de Enfermedades en Bovinos de Productores minifundistas comunitarios de la provincia de Neuquén, Argentina, INTA Ediciones.
- RWEYEMAMU, M.M.; FERNÁNDEZ, A.A.; ESPINOSA, A.M.; SCHUDEL, A.A.; LAGER, I.A.; MUELLER, S.B.K. 1990. Incidence, epidemiology and control of bovine virus diarrhoea virus in South America. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1, 207–21.
- SABATINI, D.; SANTÁNGELO, F.; PACÍFICO, C. 2013. Cuantifican pérdidas económicas por enfermedades reproductivas. En Seminario Sustentabilidad y modernización de la ganadería Argentina (Vol. GEA).
- SANDVIK, T. 2004. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 1, 151–169.

- STÄHL, K.; ALENIUS, S. 2012. BVDV control and eradication in Europe - an update. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 31–39.
- SZABÁRA, A.; OZSVARI, L. 2015. Economic impact, control and eradication of Bovine Viral Diarrhoea virus, Challenges for the Agricultural Sector in Central And Eastern Europe. *Agroinform Kiadó*, 1-16, 247-258.
- VALLAT, B. 2008 (A). Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*, OIE, pp. 34–35 chapter 1.1.4.
- WEIR, A.; HEUER, C.; MCDUGALL, S. 2010. the cost of transient BVD infection in new zealand dairy cows. *IVIS*, 84, 414).
- YEŞILBAĞ, K.; ALPAY, G.; BECHER, P. 2017. Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Viruses*, 9 (6), 128.
- YILMAZ, H.; ALTAN, E.; RIDPATH, J.F.; TURAN, N. 2012. Genetic diversity and frequency of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) detected in cattle in Turkey. *Comparative Immunology, Microbiolo*

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es un patógeno que genera cuadros respiratorios o gastroentéricos de alta morbilidad y baja mortalidad, impactando en la productividad de todos los tipos de explotaciones ganaderas. El VDVB se agrupa con otros agentes infecciosos en dos entidades sindrómicas muy estudiadas: el complejo respiratorio bovino y el complejo reproductivo bovino. La infección con VDVB durante la gestación puede desencadenar muerte embrionaria, malformaciones congénitas o el nacimiento de animales persistentemente infectados (PI). Si bien la mayoría de estos animales muere joven, ellos son los principales diseminadores de VDVB, perpetuando la infección en los rodeos.

En Argentina, se ha reportado la presencia de VDVB de genotipos 1a, 1b (el de mayor frecuencia) y 2. Asimismo, se han reportado estudios que indicaron valores de seroprevalencia que varían entre 37 y 90,7 %.

La vacuna para el control de la diarrea viral bovina es una herramienta ampliamente utilizada en muchas regiones del mundo para aumentar la inmunidad poblacional de los rodeos, y de esta manera reducir el impacto de las presentaciones clínicas de la enfermedad en la población. En nuestro país la vacunación contra el VDVB no es obligatoria ni tampoco existe un plan oficial voluntario de control.

En general, los diagnósticos de VDVB se realizan por dos razones: para identificar si el virus es la causa o parte de un problema clínico que ha sido identificado y para identificar bovinos PI. Mediante la identificación y eliminación de los animales PI, el riesgo de transmisión del VDVB dentro y entre los establecimientos se reduce significativamente.

Este breve manual está dirigido a veterinarios que enfrentan el desafío cotidiano de interpretar el comportamiento del VDVB en los rodeos, y poder tomar medidas criteriosas basadas en evidencia. Este no pretende reemplazar la literatura técnica especializada, sino que busca ser una breve actualización acerca de la situación del VDVB en Argentina, del impacto económico de la enfermedad en nuestros rodeos, y de las herramientas profilácticas y diagnósticas con las que contamos en la actualidad.



Ministerio de Agroindustria
Presidencia de la Nación