

REVISION BIBLIOGRAFICA

9.1. CARACTERISTICAS DEL VIRUS

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB), agente causal de la DVB, es miembro del genero Pestivirus, perteneciente a la familia Flaviviridae. (Donis, 1995; Vanroose et al, 1998; Njaa et al, 2000). El VDVB es relacionado antigénicamente con el virus del cólera porcino (VCP) y el virus de la enfermedad de la frontera (VEF) que afecta al porcino y ovino respectivamente (Paton, 1995; Murphy et al, 1995; Vega et al, 2000). El VDVB es uno de los principales causantes de las fallas reproductivas y un componente del complejo respiratorio bovino; siendo por tanto, responsable de grandes pérdidas económicas en la ganadería lechera mundial (Baker, 1987; Obando, 1999)

2.1.1. Morfología.

El VDVB es de forma esférica de 40 – 60 nanómetros (nm) de diámetro, constituido por una cápside icosaédrica de 25 a 37 nm. de diámetro, de naturaleza proteica y una envoltura externa. (Kobrak y Weber, 1997; San Juan et al, 1999).

2.1.2. Proteínas.

La información genética del virus de la DVB, esta contenida en una molécula de ARN de simple cadena de polaridad positiva, el genoma esta constituido de 12.0 a 12.5 kilobases (Paton, 1995; Potgieter, 1995; Neill y

Ridpath, 2001). El primer evento de la biosíntesis del virus es la traducción del código genético en una poliproteína que es cortada durante y post traducción de la misma para dar lugar a las diferentes proteínas estructurales y no estructurales del virus (Neill y Ridpath, 2001). Las proteínas estructurales son codificadas por el primer tercio cerca al 5', y las proteínas no estructurales son codificadas por los dos tercios posteriores del 3', con excepción de la proteína P²⁰/N^{pro} la cual es codificada por el primer tercio del genoma viral. (Neill y Ridpath, 2001; Potgieter, 1995).

Entre las principales proteínas estructurales y no estructurales que constituyen la partícula viral se tiene:

- ◆ p20/N^{pro} , responsable de la proteólisis de la poliproteína producto de la traducción del genoma.
- ◆ E0/gp48, es una glicoproteína asociada a la envoltura viral, responsable en parte de la inducción de los anticuerpos neutralizantes (Paton, 1995), y cumple una función de una ARNasa y es secretada al espacio extracelular por exocitosis durante la replicación viral.
- ◆ P14/C, es la proteína mas abundante y constituye la cápside viral y antígeno del grupo viral. Su función es empaquetar el ARN genómico y proporcionar las interacciones necesarias para la formación de la envoltura del virión.
- ◆ E2/gp53, es la glicoproteína mas importante del virión y antígeno del serotipo. Esta glicoproteína contiene los epítopos que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes luego de una infección o

vacunación. Contiene una región hipervariable y altamente mutable. Es el sitio donde ocurren las mutaciones y cambios antigénicos que dan lugar a la aparición de cepas variantes del VDVB (Paton, 1995; Donis, 1995; Van Oirschot et al, 1998; Brusckhe et al, 1997).

- ◆ P125/ NS23. Es una proteína no estructural indispensable para la multiplicación del virus; es la mas conservada en todos los pestivirus. Los animales infectados o vacunados con virus modificado desarrolla una fuerte respuesta humoral contra esta proteína responsable de las reacciones cruzadas con los VCP y VEF (Potgieter, 1995).
- ◆ P80/NS3, esta proteína surge a partir de la p125 determina el fenotipo del VDVB, tiene actividad de licasa en el extremo de carbono terminal y de proteasa en el extremo amino terminal. Esta presente únicamente en el biotipo citopatogénico del virus (Paton, 1995)

2.1.3. Biotipos.

El VDVB, presenta dos biotipos diferenciados por sus efectos en cultivo celular: biotipo citopatogénico (CP) y biotipo no citopatogénico (NCP) (Vanroose et al, 1998; Paton, 1995), el biotipo citopatogénico, causa vacuolización y muerte celular in vitro. Ambos biotipos producen la misma enfermedad con toda la gama del síndrome de la DVB (Vanroose et al, 1998).

El biotipo citopatogénico surge a partir del biotipo no citopatogénico del VDVB, esta diferenciación se da por el procesamiento de la proteína NS23 o p125 presente en el biotipo NCP; el biotipo CP posee además de la proteína p125, la proteína p80, la cual le confiere el fenotipo citopatogénico al virus. Análisis de secuenciación del genoma muestran que el biotipo CP, puede ser generado por una división

proteolítica de un alterado NS23 (Collect et al, 1988), duplicación genética de NS3 (Meyers et al, 1992), delección genética de la NS2 (Tautz et al, 1994), o simple punto de mutación (Kummerer y Meyers, 2000; Vilcek et al, 2000). En algunos casos incluyen reacomodo genético o recombinaciones con secuencias de ARN celular (Meyers et al, 1992). La mayoría de estos cambios genéticos ocurren en dos posiciones llamadas A y B del genoma (Meyers et al, 1998), la posición A está localizado en la secuencia de ARN que codifica el aminoácido 1535, y la posición B se localiza en la secuencia que codifica el aminoácido 1589 de la proteína viral ambos dentro de la región NS2/3 (Neill y Ridpath, 2001). Reciente información en los eventos de recombinación en el virus citopatogénico de genotipo VDVBII muestran que la mayoría de eventos ocurren primariamente con una transcripción celular simple, y esta recombinación ocurre en la posición A. (Neill y Ridpath, 2001).

El origen del virus CP, a partir del virus NCP del VDVB, explica el gran nivel de similitud antigénica encontrado entre estos dos biotipos del VDVB (CP/NCP); además, del origen espontaneo de la enfermedad de las mucosas ante la presencia de ambos biotipos en el mismo animal (Paton, 1995). El biotipo NCP del VDVB, es aislado comúnmente de animales con infección aguda y están presentes invariablemente en animales persistentemente infectados (PI) (Paton, 1995).

2.1.4. Genotipos.

A través de estudios de secuenciamiento genético el VDVB ha sido subdividido en dos genotipos, el tipo I y II (Pellerin et al, 1994; Ridpath et al, 2000). Las diferencias entre el genoma de ambos genotipos se encuentran en tres zonas hipervariables; dos de las cuales se encuentran

en la gp53/E2 (Kobrak y Weber,1997). En últimos estudios realizados, analizando la región 5' del genoma por RT-PCR, dentro del genotipo I se han diferenciado tres subgenotipos distintos denominados Ia, Ib y Ic (San Juan et al, 1999)

El genotipo I incluye las cepas de laboratorio y las vacunales: NADL, SINGER, NY-1, C virus, TGAN y Osloss.

El genotipo II esta compuesta por las nuevas cepas asociadas con una alta mortalidad, trombocitopenia y hemorragias en USA y Canadá; cepas aisladas de animales con infección persistente nacidas de vacas vacunadas y cepas aisladas de suero fetal como: NY-93, 890, AZSPLN, MS-1, SY-89 y V/FLL (Ridpath et al, 2000).

2.1.5. Replicación viral.

El VDVB, presenta un especial tropismo por células mitóticamente activas como: linfocitos, fagocitos mononucleares y células epiteliales (Njaa et al, 2000; Polak y Zmujdzinski, 1999; Potgieter, 1995). La replicación comienza con la adhesión y penetración en la célula hospedadora, parece ser que el receptor específico del VDVB es una proteína de superficie de 50kD de las células, por mediación de la E2, el virus ingresa al citoplasma mediante endocitosis mediada y libera su genoma en el citosol, y luego el ARN viral es traducida en el ribosoma en una poliproteína, la misma que es cortada por enzimas de origen viral en polipéptidos que constituyen las proteínas estructurales y no estructurales, y el ensamblaje tiene lugar tanto en el aparato de golgi como en el retículo endoplásmico donde los viriones adquieren su envoltura lipídica. Cada célula infectada libera de 100 a 1000 viriones que alcanzan el medio extracelular mediante exocitosis. (Xue et al, 1997; San

Juan, 1999).y al cabo de 3 horas postinfección pueden detectarse polipéptidos víricos en las células infectadas alcanzando un máximo a las 12 a 14 horas postinfección..

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Las primeras enfermedades producidas por pestivirus, fueron identificadas como enfermedad de las mucosas y diarrea viral bovina (DVB), ambas causadas por el VDVB; el cual también pueden causar enfermedad en otros rumiantes y en cerdos. El VDVB tiene una distribución mundial y es responsable de un síndrome que va desde muy benignos a severos, e incluyen la potenciación de otras infecciones, fallas reproductivas (Polak y Zmudzinski, 1999), defectos congénitos, animales PI, infecciones agudas, y una generalmente fatal enfermedad de las mucosas (Njaa et al, 2000; Paton, 1995; Baker, 1987).

2.2.1. Fuente de la infección.

Los animales PI, juegan un rol importante como la fuente principal de diseminación del VDVB, y por ende de la infección (Njaa et al, 2000; Polak y Zmudzinski, 1999). Los animales PI eliminan grandes cantidades de virus durante toda su vida a través de secreciones y excreciones tales como descarga nasal, saliva, semen, orina, heces, lagrimas y leche (Brock et al, 1991; Houe, 1995; Sandvik, 1999); siendo la prevalencia de los animales PI es de 0.5 – 2.0% (Polak y Zmudzinski, 1999; Houe, 1995).

Los animales con infección aguda, representan también una fuente importante de diseminación viral durante la infección, el virus es usualmente excretado a partir del día 4 al día 10; aunque el virus puede ser excretado durante un periodo mayor (Brownlie et al, 1991). Si bien, los

animales con infección aguda también eliminan virus por secreciones y excreciones, la cantidad del virus es mucho menor en relación a los animales PI. (Houe, 1995; Kirkland et al, 1992).

El virus también ha sido aislado de otros rumiantes incluyendo ovinos, caprinos, y algunos de vida silvestre o en cautiverio; siendo estas especies, consideradas fuente potencial de transmisión del virus (Houe, 1995).

2.2.2. Métodos de transmisión.

Los métodos de transmisión pueden ser vertical y horizontal; siendo la transmisión vertical la que se da de una generación a la siguiente, pudiéndose esta aplicarse para los animales PI. Sin embargo, en muchos casos, la transmisión vertical es precedida por una transmisión horizontal a la madre, y durante esta infección aguda de la madre atraviesa la placenta e infecta al feto (Houe, 1995).

2.2.2.1. Transmisión vertical.

La transmisión vertical ocurre de una generación a otra. Se incluye la transmisión al feto a través del semen infectado de toros con infección aguda o persistentemente infectados (PI). Las hembras seronegativas pueden ser inseminadas con semen infectado pudiendo infectarse, sin embargo, la producción de fetos PI raramente ocurre por esta ruta; en caso de ocurrir la producción de una cría PI, entonces es una transmisión vertical, aunque como ya se menciono va precedida de una transmisión horizontal.

A pesar de la alta mortalidad entre los terneros PI (Houe,1993), algunos pueden llegar a adultos y reproducirse, entonces los terneros de madres PI son también PI, por lo tanto, se forman líneas familiares de animales PI y puede ocurrir en varias generaciones (Houe, 1991). Además, puede ocurrir transmisión vertical después de la transferencia de embriones, si la receptora es PI, si la hembra donante es PI. El VDVB esta presente en niveles altos en el medio uterino, por ello antes se puede dar una transmisión horizontal de madre a madre a través de los procedimientos del lavado (Houe,1995).

2.2.2.2. Transmisión horizontal.

La transmisión horizontal puede ser directa o indirecta. La transmisión directa, ocurre por contacto entre animales susceptibles y animales persistentemente infectados (PI), siendo esta la vía mas importante de transmisión de la infección; presumiblemente, la mas eficiente es el contacto de nariz a nariz (Travén et al, 1991), existe además la posibilidad de transmisión por el aire siendo a poca distancia, aunque esto no esta probado experimentalmente.

Al igual que en la transmisión vertical, la principal fuente de infección son los animales PI, aunque también esta probado la capacidad de transmitir el VDVB a partir de animales con infección aguda.

El semen es una fuente importante de transmisión horizontal para las vacas, esto está asociado con la eliminación del virus a través de este medio.

2.2.3. Epidemiología de los animales persistentemente infectados o portadores del VDVB.

Los pestivirus son considerados como uno de los agentes virales mas exitosos de la naturaleza por su habilidad de difundirse, causar enfermedad y aun persistir dentro de una población sin ser descubierto (Sandvick, 1999). En este sentido el virus es mantenido en la naturaleza principalmente a través de animales persistentemente infectados, es decir, un animal que fue infectado en algún momento antes de los 120 – 125 días de su desarrollo fetal, cuando su sistema inmune no es capaz de reconocer al virus como invasor convirtiéndose en inmunotolerante al virus infectante y PI por toda su vida (Brownlie et al, 1998). La inmunotolerancia es a la cepa viral especifica, es decir, estos animales no desarrollan anticuerpos neutralizantes contra el VDVB presente en el animal, sin embargo, son inmunocompetentes a otras cepas diferentes del VDVB u otros agentes infecciosos. En estos animales el virus persiste en todos los tejidos, especialmente en las células del sistema inmune y tejidos inmunológicamente privilegiados como el sistema nervioso central (Sandvick, 1999).

El animal PI es considerado el reservorio o portador mas importante del VDVB ya que elimina continuamente grandes cantidades del virus en sus secreciones y excreciones y son incapaces de responder formando anticuerpos o inmunidad mediada por células, por ser animales inmunotolerantes y probablemente también por el continuo daño funcional de las células del sistema inmune. Los animales inmunocompetentes infectados agudamente, también eliminan el virus por varios días o semanas pero, la cantidad de virus que eliminan es menor y finalmente el virus puede ser removido eficientemente del animal por los anticuerpos neutralizantes con la subsiguiente recuperación del animal (Houe, 1999).

La persistencia viral es común en los pestivirus y otros como el virus de coriomeningitis linfocítica del ratón, un arenavirus, es el

resultado de la interacción dinámica entre factores del animal y del virus a través de mecanismos como: infecciones transplacentarias, establecimiento de la inmunotolerancia, replicación en células del sistema inmune, existencia de cepas no citolíticas, inducción de bajos niveles de anticuerpos o anticuerpos de baja afinidad, persistencia viral en los sitios poco accesibles al sistema inmune y variación antigénica e interesantemente, los pestivirus, hacen uso de todos estos mecanismos.

2.2.4. Prevalencia de la diarrea viral bovina.

Estudios realizados en diferentes países demuestran que la prevalencia del VDVB, se encuentra dentro del 40 – 90% (Niskanen et al, 1991; Houe, 1995; Kirkland, 1994). En el Perú, Contreras, 1999, determino una prevalencia de 72.4% de la DVB, en un estudio realizado en el valle del Mantaro.

En un estudio de 1593 bovinos de un total de 133 hatos en Inglaterra y Gales, se mostró que el 62.5% de animales presentaron anticuerpos neutralizantes contra el VDVB, la prevalencia entre regiones varían entre 43% y 79%. Otros estudios de UK mostró 1.8% de animales virémicos de entre 3151 animales y a la prevalencia de un total de 18759 muestras fue 64.9%.(Houe et al, 1995).

En Dinamarca con muestreo al azar, de un total de 1332 muestras colectadas en dos camales, se obtuvo 78% de animales positivos a anticuerpos y 0.9% de los animales fueron positivos al virus de la DVB. Así mismo en un total de 2750 muestras en 19 hatos lecheros, se obtuvieron 37 (1.4%) de animales virémicos; 28 (1.1%) animales PI y 64% fueron anticuerpo positivos (Houe, 1991).

En Suecia evaluaron un total de 711 vaquillonas seleccionadas para inseminación artificial (IA), mostrando 1.7% animales virémicos; 1.3% animales PI y 41% de animales positivos a anticuerpos.

En los Estados Unidos de América se evaluaron 3157 animales de 66 hatos, aproximadamente el 50% de los hatos tenían historia de infección por VDVB, mostrando 1.7% de animales PI, y 89% de animales positivos a anticuerpos. (Houe, 1995)

2.3. PATOGÉNESIS.

La transmisión horizontal del virus es en forma directa, por inhalación de saliva infectada, descarga ocular nasal, vaginal, orina, heces. La transmisión, también puede ocurrir a través de semen de toros infectados en forma aguda o toros PI (Vanroose et al, 1998; Baker, 1995). La transmisión vertical ocurre en cualquier etapa de la gestación; además la transmisión también es posible vía agujas hipodérmicas (Baker, 1987; Bitsch y Ronsholt, 1995).

Las primeras poblaciones celulares que soportan la replicación viral son las células epiteliales de la cavidad bucal, tonsilas y del tracto digestivo, células linfoides, como consecuencia el animal puede presentar múltiples expresiones clínicas como:

2.3.1. Infección subclínica.

El 70 a 90% del ganado adulto susceptible puede presentar la DVB subclínico. El periodo de incubación es de 5 a 7 días aproximadamente luego de lo cual se presenta una ligera fiebre y leucopenia, que usualmente no es notado por el veterinario o ganadero siendo esto seguido por una producción de anticuerpos neutralizantes (Baker, 1987). En general es raro que el VDVB cause enfermedad en animales

inmunocompetentes; sin embargo, debido a su rol inmunosupresor el VDVB puede potenciar o favorecer el desarrollo de infecciones secundarias, sobre todo aquellas de tipo respiratorio como el complejo respiratorio bovino (Obando, 1999).

2.3.2. Infección aguda.

La infección aguda en animales seronegativos e inmunocompetentes, puede dar un rango muy amplio de signos clínicos, estando relacionados con factores como cepa del virus, edad del animal, inmunidad y estado fisiológico del animal y, la presencia de otros agentes patógenos. La mayoría de las infecciones agudas están causadas por el biotipo NCP, generalmente ocurre en animales entre 6 meses y 2 años de edad (Baker, 1995). El periodo de incubación es de 5 – 7 días; seguido de fiebre transitoria y viremia por encima de los 15 días.

Luego del ingreso del virus se replica en las células epiteliales de la mucosa oronasal y tonsilas, la progenie se disemina vía sanguínea y linfática, como virus libre o asociado a linfocitos y monocitos.

Además, clínicamente la enfermedad se caracteriza por: estomatitis erosiva aguda, gastroenteritis y diarrea, leve depresión, inapetencia, descarga oculonasal. Las infecciones agudas causan ovaritis y producen infertilidad temporal (Vanroose et al, 1998).

Los hatos susceptibles experimentan diarrea con alta morbilidad, pero con baja o nula mortalidad; la producción lechera también se ve afectada. Generalmente, los anticuerpos neutralizantes son detectados en suero 3 a 4 semanas post infección y persisten probablemente por años. (Baker, 1987; Brusckke et al, 1996; Vanroose et al, 1998).

2.3.3. Enfermedad de las mucosas.

La enfermedad de las mucosas, es usualmente de curso fatal y esta asociado con superinfección del animal PI con el biotipo NCP, por el biotipo CP del VDVB (Brownlie et al, 1998; Bolin et al, 1990; Paton, 1995), teniendo como condición, que el biotipo superinfectante CP debe ser antigénicamente homólogo al biotipo NCP presente en el animal. (Vanroose et al, 1998; Paton 1995). Estos animales desarrollan profusa diarrea, u una rápida pérdida de condición corporal, erosiones a nivel del tracto gastrointestinal, y muerte (Tautz et al, 1994; Bolin et al, 1995a).

2.3.4. Síndrome hemorrágico.

En USA y CANADA, se han reportado como severos, en estos casos se observa diarrea con sangre, epistaxis, congestión en conjuntiva y mucosas, hemorragias petequiales y equimóticas en mucosas, los animales muestran pirexia, leucopenia, linfopenia y neutropenia. Este síndrome ha sido asociado con infecciones por cepas NCP del genotipo II (Ridpath et al, 2000).

2.3.5. Complejo respiratorio.

La infección con VDVB en animales inmunocompetentes y seronegativos tiene poca importancia; pero si como un agente inmunosupresor. El VDVB potencia a otras infecciones virales y bacterianas como: Parainfluenza tipo 3, Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Coronavirus, Rotavirus, Pasteurella spp., Salmonella spp., Coccidia, etc; produciendo un cuadro de enfermedad respiratoria severa denominado

complejo respiratorio bovino, que es uno de los problemas causantes de grandes pérdidas económicas en el mundo. (Fulton et al, 2000)

2.3.6. Infección persistente.

La infección persistente con el VDVB en el ganado bovino resulta de infecciones en útero. (Fredriksen et al, 1999; Sandvik, 1999). Las hembras gestantes PI usualmente producen crías PI; teniendo estas las siguientes características: terneros anormales, nacimientos prematuros, retardo en el crecimiento, y dificultad para la lactación. (Bock et al, 1997). Algunos mueren dentro de los primeros 6 meses de vida, tal vez por el debilitamiento de la respuesta inmune contra la enfermedad. Sin embargo, algunos muestran salud y crecimiento normal. Los animales PI resultan en una inmunotolerancia a los antígenos del virus de la DVB, resultando de esto evidencias de la interacción sinérgica del VDVB con otros agentes patógenos.

2.3.7. Infección venérea.

Los toros infectados en forma aguda o PI, producen semen infectado con el VDVB, como consecuencia de la replicación del virus en la vesícula seminal y glándula prostática (Kirkland et al, 1997), el cual sirve como medio para la transmisión del virus a vacas susceptibles.

La calidad del semen infectado por el VDVB, es caracterizado por el decrecimiento de la motilidad, incremento del porcentaje de anomalías morfológicas de las células espermáticas. (Kirkland et al, 1994; Baker, 1987).

2.3.8. Virus de la diarrea viral bovina en terneros recién nacidos.

El VDVB, raramente causa enfermedad en animales menores de 6 meses de edad. Los terneros recién nacidos infectados con VDVB pueden padecer de severas enteritis que son ocasionalmente de curso fatal (Ames y Baker, 1990). Experimentalmente se ha demostrado que en terneros que tomaron tarde el calostro, la infección que resulto fue una enfermedad clínica benigna con rápido restablecimiento.

2.3.9. Infecciones en hembras gestantes.

La infección transplacentaria con VDVB es muy frecuente, ya que el virus cruza la placenta con casi 100% de eficiencia. El resultado de la infección en el feto dependerá principalmente del periodo de gestación cuando ocurra la infección, y del biotipo de la cepa infectante. Los efectos pueden ser: muerte embrionaria fetal, aborto o momificación, malformación congénita, nacimientos de terneros débiles, nacimientos de terneros PI y nacimiento de terneros sanos (Baker, 1995; Hoenning y Liess, 1995). Los terneros PI son el resultado de la infección del feto en un momento entre los 120 a 125 días de edad fetal con una cepa NCP. (Vanroose et al, 1998; Bock et al, 1997).

Los fetos bovinos son capaces de desarrollar una respuesta inmune contra el virus de la DVB a los 180 días de gestación; aunque, para algunos fetos ya es posible una respuesta con anticuerpos entre los 120 y 165 días de gestación. Dicha respuesta inmune en el feto se desarrolla luego de 20 a 30 días post infección. (Potgieter, 1995; Brusckhe et al, 1996).

2.4. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS.

La respuesta inmune es dirigida contra todas las proteínas estructurales o no estructurales del virus (Donis et al, 1995). El VDVB induce ambos tipos de respuesta, tanto de células B como de células T (Larsson y Fossum, 1992).

Estudios realizados, indican un mayor rol de las células CD4+, pero no de las células CD8+, lo cual indica actividad restringida de las células T citotóxicas (Howard et al, 1992; Rhodes et al, 1999). Sin embargo un estudio realizado in vitro describe una respuesta virus específico de las células T CD4+ y CD8+ en animales seropositivos, lo que al parecer refuerza el concepto de que la respuesta anti viral de las células T comprenden células CD8+, capaces de actuar como efectoras contra células infectadas, y las células CD4+, que pueden proporcionar ayuda para la producción de anticuerpos neutralizantes capaces de limitar la diseminación del virus (Rhodes et al, 1999).

La persistencia del VDVB en el ganado es una consecuencia específica de la inmunotolerancia de los linfocitos B y linfocitos T frente al antígeno del VDVB (Larsson y Fossum, 1992). Los anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes contra el VDVB están ausentes en esos animales PI; pero estos animales son inmunocompetentes a otros antígenos incluso a otras cepas del VDVB.

2.5. DIAGNOSTICO

No existen signos clínicos patognomónicos en una infección con el VDVB en el ganado. Por lo tanto, el diagnostico esta basado en las confirmaciones en laboratorio mediante el aislamiento del virus,

detección de antígenos virales o detección de ácido nucleico y detección de anticuerpos contra el virus.

Los animales PI pueden ser identificados por el uso combinado de pruebas serológicas y pruebas de identificación viral o en muestras de sangre.

2.5.1. Aislamiento viral en cultivo celular.

Es la prueba estándar y tiene alta especificidad, pero es costoso, muy laborioso, requiere muchos días obtener el resultado y es dependiente de cultivo de células. El aislamiento viral puede realizarse a través de muestra de secreciones y tejidos fetales o sangre entera (Sandvik, 1999). Es fundamental garantizar que las líneas celulares utilizadas, que pueden ser de riñón, pulmón o cornete nasal de feto bovino, sean libres del VDVB (Bolin et al, 1994); a su vez el suero fetal bovino utilizado debe ser libre no solo del VDVB, sino también de anticuerpos neutralizantes (Edwards, 1993).

2.5.2. Detección de antígenos virales.

2.5.2.1. Inmunofluorescencia.

Es una prueba inmunohistoquímica rápida para detectar antígeno viral en muestras de tejido fresco mediante el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales contra el VDVB marcados con fluorocromos.

2.5.2.2 Inmunoperoxidasa.

Es una prueba inmunohistoquímica rápida para detectar antígenos virales en muestras de tejido fresco o fijado en formalina. Esta prueba es similar a la IF, pero en este caso el anticuerpo monoclonal o policlonal

esta marcado a una enzima como la peroxidasa. Esta técnica no requiere de microscopio de fluorescencia.

2.5.2.3. ELISA de captura de antígenos.

ELISA de captura de antígenos, esta basada en la detección de antígenos a través de anticuerpos monoclonales (Mabs). Debido a que los Mabs utilizados reconocen la p125, debe ser capaz de detectar muchas si no todas, las cepas del VDVB. La rapidez y su independencia de cultivos celulares han hecho de esta prueba una herramienta muy útil para el examen de grandes cantidades de muestras en programas de control.

La prueba utiliza dos grupos de anticuerpos monoclonales, los cuales reconocen diferentes epítopes conservados en el polipéptido no estructural 125K/80K del virus, uno de ellos esta pegado a los hoyos de la microplaca, los cuales capturan al antígeno viral de las muestras, el antígeno capturado es detectado por el otro Mabs conjugado con una peroxidasa. La presencia de color seguida de la adición del sustrato de la enzima identifica muestras positivas (Sandvik,1999).

2.5.3. Detección de anticuerpos

Las pruebas de inmunoabsorcancia ligada a enzimas ELISA y virus neutralización, son las mas comúnmente usadas para la detección de anticuerpos contra el VDVB (Edwards, 1990; Paton et al, 1991; Kramps et al, 1999).

2.5.3.1. Virus neutralización.

La prueba es altamente específica para detectar el VDVB, aceptada mundialmente como referencial para anticuerpos contra el VDVB (Edwards, 1990); sin embargo, existen varias condiciones que pueden afectar el resultado de la prueba: el biotipo del virus, línea celular, y medio para el cultivo celular; además de la performance de la prueba (Fredriksen et al, 1999; Edwards, 1990 ; Brock, 1995).

El fundamento de la prueba radica en la capacidad de los anticuerpos para neutralizar la citopatogenicidad o la capacidad del virus de infectar a las células in vivo o in vitro (Rivera et al, 1993). Esta técnica es cualitativa y permite detectar y titular anticuerpos.

2.5.3.2 Inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA)

Los ELISAs pueden ser indirecta o de competición o de bloqueo utilizadas como pruebas tamiz en estudios epidemiológicos y en los programas de erradicación de enfermedades en grandes poblaciones. (Kramps et al, 1999). Estas pruebas son muy utilizadas debido a su independencia de cultivos celulares, pueden ser aplicados en muestras de leche, plasma y suero, es factible tener el resultado en pocas horas, y es posible su automatización (Niskanen et al, 1989; Sandvik, 1999)

2.5.4. Detección del ácido nucleico viral.

Los avances que se han producido en biología molecular, han contribuido al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico altamente sensibles. Técnicas de DNA recombinante se aplican para la detección

rápida de ácidos nucleicos víricos. La reacción en cadena por la polimerasa (PCR), es altamente sensible al virus de la diarrea viral bovina (VDVB) (Njaa et al, 2000), es un método usado para la amplificación selectiva in vitro de una región particular del genoma viral. Estas moléculas sintéticas pueden ser utilizadas como componente de un DNA recombinante o como sonda en un test de hibridación. El principio de esta técnica es que moléculas de ácido nucleico marcadas, conocidas como sondas, se unen específicamente a las secuencias complementaria del ácido nucleico que se investiga, en este caso el cDNA del VDVB. Debido a la complementariedad entre la sonda y el ácido nucleico vírico, esta unión es específica.

El diagnóstico por PCR del VDVB, se hace sobre órganos homogeneizados (enfermedad aguda) o suero (infección persistente). En el caso de la DVB, el RNA vírico debe ser purificado y transcrito a DNA complementario (cDNA), mediante una enzima transcriptasa reversa (Pellerin et al, 1994; Van Oirschot, 1999)

2.6. CONTROL Y PREVENCIÓN

El conocimiento detallado de la epidemiología de la DVB y del comportamiento de las pruebas diagnósticas en uso son esenciales para la identificación de animales virémicos (animales PI y animales con infección aguda), que son la fuente más importante de diseminación viral en hatos afectados (Sandvik, 1999).

Un programa de prevención, control o erradicación de una enfermedad puede adoptar distintas estrategias que van a variar de acuerdo a la situación inicial de la explotación, pero apoyadas en tres pilares fundamentales que son: las medidas de bioseguridad,

identificación y remoción de los animales PI y vacunación contra VDVB en el hato (Muñoz - Zanzi et al, 2000; Ames y Baker, 1990; Bitsch y Ronsholt, 1995).

- ◆ Bioseguridad, la implementación de medidas de bioseguridad están dirigidas a evitar el ingreso del VDVB, así como su difusión dentro del hato, a través del control estricto de todos los animales que se incorporan, los cuales deben ser seronegativos al virus antes y después de la cuarentena estricta, evitar el contacto directo o indirecto con otros hatos, evitar el servicio con semen sin certificación de ser libre de la enfermedad.
- ◆ Identificación y eliminación de animales PI, estrategia indispensable por la importancia epidemiológica de estos animales.
- ◆ Inmunización con vacunas de virus muerto o modificado, con el objetivo de prevenir la infección congénita, así como para evitar las infecciones postnatales (Van Oirschot et al, 1999).

2.6.1. Vacunas:

Una complicación para el desarrollo de las vacunas contra el VDVB es la diversidad antigénica. La tendencia es identificar la mayor cantidad de variantes antigénica e incluirlos en la vacuna. Las evaluaciones realizadas a las vacunas existentes dieron resultados muy variados, tanto para la infección postnatal como para la infección prenatal (Van Oirschot et al, 1999).

2.6.1.1. Vacuna a virus vivo modificado.

La vacuna a virus vivo modificado contra la DVB, esta asociada a una gran variedad de efectos adversos, tales como la inducción de la enfermedad de las mucosas (MD), infección fetal e inmunosupresión, pueden potenciar infecciones recurrentes, resultando en un incremento en la incidencia de enfermedades respiratorias (Potgieter, 1995; Van Oirschot et al, 1999).

Existen mas de 140 vacunas autorizadas en USA, todas satisfacen requerimientos como pureza, potencia, y seguridad; garantizando una respuesta inmune libres de agentes extraños. La vacuna a virus vivo modificado (MLV), usualmente contiene un solo biotipo de virus de la DVB citopatogénico. Los biotipos citopáticos usados usualmente son VDVB – NADL, VDVB- Singer, VDVB- C24V (Bolin, 1995b).

Las ventajas de uso de una vacuna a virus vivo modificado para controlar la DVB son:

- ◆ La MLV, estimula una rápida respuesta inmune y la protección se establece muy fácilmente dentro de 3 semanas post vacunación, ya se detecta anticuerpos en suero y neutraliza al VDVB.
- ◆ La duración de los anticuerpos en sueros post vacunación con MLV, es similar a la provocada por infección natural, permaneciendo en esto en altos niveles por mas de un año y persisten por varios años. Sin embargo en algunos animales los anticuerpos neutralizantes contra el VDVB desaparecen dentro de dos años post vacunación (Bolin, 1995)
- ◆ Son menos costosas.

Las desventajas asociadas a MLV, están asociadas al fracaso en la inmunización por:

- ◆ Falla en el almacenamiento o manipulación lo cual puede provocar una enfermedad postnatal producto de la reactivación de la virulencia del virus vacunal; además, existe el riesgo de contaminación de las líneas celulares y suero fetal bovino utilizados en la producción de las vacunas con VDVB nocitopatogénico.
- ◆ Estas fallas están asociadas con enfermedad de las mucosas y fracasos reproductivos asociados al virus vacunal. La enfermedad de las mucosas ocurre 1 a 4 semanas post vacunación (Bolin, 1995b). Por ello, la vacuna MLV no es recomendado para hembras preñadas.
- ◆ Pueden ocasionar aborto.
- ◆ La inmuno supresión y la recombinación genética son otros potenciales problemas asociados con MLV vacuna.

2.6.1.2. Vacuna Inactivada

Las ventajas del uso de este tipo de vacunas esta relacionada a las desventajas del uso de las vacunas MLV; sin embargo las desventajas de este tipo de vacuna inactivada esta relacionada con la necesidad de usar 2 dosis de vacuna y esto a su vez retrasa el tiempo necesario para que se establezca una inmunidad protectora. (Bolin, 1995). A su vez, la duración de inmunidad inducida es corta. (Van Oirschot, 1999).