

**ANTECEDENTES, GENERALIDADES Y ACTUALIZACION EN ASPECTOS DE  
PATOGENESIS, DIAGNOSTICO Y CONTROL DE LA DIARREA VIRAL BOVINA  
(DVB) Y RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA (IBR)**

**PAULA JULIANA MARTINEZ CARLIER  
IARA MELISSA RIVEIRA SANTOS**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar el título de**

**MICROBIOLOGA AGRICOLA Y VETERINARIA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGIA AGRICOLA Y VETERINARIA  
Bogotá D.C  
Julio del 2008**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

## TABLA DE CONTENIDO

|                                                    | <b>Pág.</b> |
|----------------------------------------------------|-------------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                             | <b>1</b>    |
| <b>2. JUSTIFICACIÓN</b>                            | <b>3</b>    |
| <b>3. OBJETIVOS</b>                                | <b>4</b>    |
| <b>3.1 Objetivo General</b>                        | <b>4</b>    |
| <b>3.2 Objetivos Específicos</b>                   | <b>4</b>    |
| <b>4. DIARREA VIRAL BOVINA (DVB)</b>               | <b>5</b>    |
| <b>4.1 Historia</b>                                | <b>5</b>    |
| <b>4.2 Agente Etiológico</b>                       | <b>6</b>    |
| <b>4.2.1 Taxonomía y Estructura</b>                | <b>6</b>    |
| <b>4.2.2 Variabilidad</b>                          | <b>7</b>    |
| <b>4.2.3 Clasificación</b>                         | <b>8</b>    |
| <b>4.3 Epidemiología</b>                           | <b>11</b>   |
| <b>4.4 Transmisión de la enfermedad</b>            | <b>12</b>   |
| <b>4.4.1 Transmisión horizontal</b>                | <b>12</b>   |
| <b>4.4.2 Transmisión vertical</b>                  | <b>12</b>   |
| <b>4.4.3 Transmisión entre hatos</b>               | <b>14</b>   |
| <b>4.4.4 Transmisión dentro del hato</b>           | <b>14</b>   |
| <b>4.5 Patogénesis</b>                             | <b>15</b>   |
| <b>4.5.1 Efectos del virus sobre la fertilidad</b> | <b>19</b>   |
| <b>4.5.2 Patogénesis de la infección aguda</b>     | <b>20</b>   |
| <b>4.5.3 Malformaciones</b>                        | <b>20</b>   |

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.6 Signos y patología</b>                                              | <b>21</b> |
| 4.6.1 Diarrea Viral Bovina Aguda                                           | 22        |
| 4.6.2 Enfermedad de las Mucosas (EM)                                       | 27        |
| <b>4.7 Animales Persistentemente Infectados (PI)</b>                       | <b>28</b> |
| 4.7.1 Infección persistente                                                | 29        |
| <b>4.8 Diagnóstico</b>                                                     | <b>30</b> |
| 4.8.1 Diagnostico clínico                                                  | 30        |
| 4.8.2 Serología                                                            | 30        |
| 4.8.3 Detección de virus o partículas virales                              | 32        |
| <b>4.9 Prevención, control y erradicación</b>                              | <b>37</b> |
| 4.9.1 Factores a considerar en un programa de erradicación<br>para el vDVB | 37        |
| 4.9.2 Erradicación sin vacunación                                          | 38        |
| 4.9.3 Erradicación con vacunación                                          | 39        |
| <b>4.10 Control de la enfermedad</b>                                       | <b>40</b> |
| 4.10.1 Control en el hato                                                  | 40        |
| <b>4.11 Vacunas</b>                                                        | <b>41</b> |
| 4.11.1 Vacunas tradicionales inactivadas                                   | 42        |
| 4.11.2 Vacunas a virus vivo modificadas                                    | 43        |
| 4.11.3 Vacunas recombinantes                                               | 44        |
| <b>4.12 Situación mundial de la Diarrea Viral Bovina</b>                   | <b>46</b> |
| 4.12.1 DVB en Colombia                                                     | 46        |
| 4.12.2 DVB en el mundo                                                     | 48        |
| <b>5. RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA (IBR)</b>                           | <b>54</b> |
| 5.1 Historia                                                               | 54        |
| 5.2 Agente Etiológico                                                      | 57        |
| 5.2 .1 Taxonomía y estructura                                              | 57        |
| 5.2.2 clasificación                                                        | 58        |

|                                               |           |
|-----------------------------------------------|-----------|
| <b>5.2.3 Características biológicas</b>       | <b>59</b> |
| <b>5.2.4 Genoma</b>                           | <b>59</b> |
| <b>5.2.5 Glicoproteínas (GP)</b>              | <b>60</b> |
| <b>5.2.6 Tiamidina Kinasa (TK)</b>            | <b>60</b> |
| <b>5.3 Transmisión de la enfermedad</b>       | <b>61</b> |
| <b>5.3.1 Entrada y diseminación</b>           | <b>61</b> |
| <b>5.3.2 Latencia</b>                         | <b>62</b> |
| <b>5.4 Epidemiología</b>                      | <b>64</b> |
| <b>5.5 Patogénesis</b>                        | <b>64</b> |
| <b>5.5.1 Respuesta inmune inespecífica</b>    | <b>66</b> |
| <b>5.5.2 Respuesta inmune específica</b>      | <b>68</b> |
| <b>5.6 Signos y patología</b>                 | <b>69</b> |
| <b>5.6.1 Forma respiratoria</b>               | <b>69</b> |
| <b>5.6.2 Forma abortigénica</b>               | <b>70</b> |
| <b>5.6.4 Forma ocular</b>                     | <b>72</b> |
| <b>5.6.5 Forma nerviosa</b>                   | <b>72</b> |
| <b>5.5.6 Forma Digestiva</b>                  | <b>72</b> |
| <b>5.7 Población hospedadora</b>              | <b>73</b> |
| <b>5.8 Diagnóstico</b>                        | <b>73</b> |
| <b>5.9 Prevención, control y erradicación</b> | <b>74</b> |
| <b>5.9.1 Tratamiento antiviral</b>            | <b>76</b> |
| <b>5.9.2 Vacunación</b>                       | <b>78</b> |
| <b>5.9.3 Inmunidad de hato</b>                | <b>80</b> |
| <b>5.9.4 Manejo Sanitario</b>                 | <b>83</b> |
| <b>5.9.5 Programa de vacunación</b>           | <b>85</b> |
| <b>5.10 Situación mundial del vIBR</b>        | <b>85</b> |
| <b>5.10.1 IBR en Colombia</b>                 | <b>87</b> |
| <b>5.10.2 IBR en el mundo</b>                 | <b>87</b> |

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| <b>6. CONCLUSIONES</b> | <b>90</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFIA</b> | <b>92</b> |

## RESUMEN

Las enfermedades virales producidas por los virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB) y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) que afectan al ganado bovino causan grandes pérdidas económicas a los ganaderos, representan un grave problema a nivel mundial tanto en ganado de carne como en ganado lechero afectándolo de diversas formas, de acuerdo a la edad del animal, estado nutricional, estado inmunológico y momento de la gestación en el que se produce la infección.

El virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB), está clasificado como *pestivirus* de la familia *Flaviviridae*; tiene un genoma ARN, de banda simple y polaridad positiva; clasificado en 2 biotipos (citopático y no citopático) y en 2 genotipos (I y II). Dependiendo de las cepas infectantes se presenta un cuadro clínico particular variando en severidad desde una forma subclínica, pasando por la forma clínica e incluso produciendo la fatal enfermedad de las mucosas (EM). La Rinotraqueitis infecciosa Bovina (IBR) es una enfermedad causada por el Herpes Virus Bovino 1 (HVB-1), miembro de la subfamilia *Alphaherpesvirinae*; lo mismo que otros miembros de esta subfamilia, este virus establece un estado de latencia después de la infección en neuronas ganglionares y puede ser reactivado y excretado luego de circunstancias que conllevan a situaciones de estrés como el transporte, el parto, y tratamientos con glucocorticoides.

## 1. INTRODUCCION

Las enfermedades virales producidas por los virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB) y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) que afectan al ganado bovino causan grandes pérdidas económicas a los ganaderos, representan un grave problema a nivel mundial tanto en ganado de carne, como en ganado lechero, afectándolo de diversas formas, de acuerdo a la edad del animal, estado nutricional, estado inmunológico y momento de la gestación en el que se produce la infección.

Estos virus, dependiendo del estado inmunitario, manejo del hato estado de nutrición del animal entre otros, pueden producir: abortos, muerte embrionaria y neonatal, pérdida de peso y disminución en la producción láctea; siendo estas algunas de las consecuencias debido a los cuadros infecciosos de origen viral.

La DVB, esta clasificado como *pestivirus* de la familia *Flaviviridae*; tiene un genoma ARN, de banda simple y polaridad positiva; este virus ha sido clasificado en 2 biotipos (citopático y no citopático) según su comportamiento en cultivo de células y en 2 genotipos (I y II) basados en su secuencia genética. Dependiendo de las cepas infectantes se presenta un cuadro clínico particular variando en severidad desde una forma subclínica, pasando por la forma clínica e incluso produciendo la fatal enfermedad de las mucosas o causando efectos deletéreos sobre el feto.

La Rinotraqueitis infecciosa Bovina (IBR) es una enfermedad causada por Herpes Virus Bovino 1 (HVB-1), miembro de la subfamilia *Alphaherpesvirinae*; lo mismo que otros miembros de esta subfamilia, este virus establece un estado de latencia después de la infección en neuronas ganglionares y puede ser reactivado y excretado luego de circunstancias que conllevan a situaciones de estrés como el transporte, el parto, y tratamientos con glucocorticoides.

En esta revisión, se pretende dar a conocer los aspectos básicos acerca de los antecedentes, las generalidades, y actualización en aspectos de: patogénesis,

diagnóstico y control de la Diarrea Viral Bovina (DVB) y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) a nivel mundial, haciendo énfasis en Colombia.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Las enfermedades respiratorias, entéricas y reproductivas constituyen las principales patologías que limitan los procesos productivos y reproductivos de los bovinos. Entre los agentes virales que tienen especial implicación en la ocurrencia de dichas patologías se encuentran el de la Diarrea Viral Bovina (DVB) y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), que causan grandes pérdidas económicas en los hatos ganaderos colombianos. Es importante reconocer los últimos avances científicos acerca de estas enfermedades, para poder hacer un diagnóstico y control más rápido y definitivo; y así, evitar que se sigan diseminando, y a su vez difundir más información que favorezca a los ganaderos y a las entidades interesadas en controlar y erradicar estas enfermedades en Colombia.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General.**

A partir de esta investigación bibliográfica se busca evaluar todos los aspectos generales, patogénesis, de diagnóstico y control de la Diarrea Viral Bovina (DVB) y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), enfatizándose en los procesos de infección, en la sintomatología y control de estas enfermedades virales.

#### **3.2 Objetivos específicos.**

- ∂ Revisar aspectos básicos sobre DVB e IBR con respecto a los agentes etiológicos, transmisión y patogénesis.
- ∂ Identificar las diferentes manifestaciones clínicas que se presentan en animales infectados con estas enfermedades.
- ∂ Revisar las diferentes técnicas de diagnóstico que son utilizadas para identificar la DVB e IBR.
- ∂ Evaluar qué avances importantes se han logrado, con respecto al control de estas enfermedades que afectan la reproducción de los bovinos, en Colombia y en el resto del mundo

## **4. DIARREA VIRAL BOVINA (DVB)**

### **4.1 Historia**

Esta enfermedad está distribuida mundialmente y la infección tiende a ser endémica en las poblaciones bovinas; en la mayoría de los países alcanza niveles de 0.5 a 2 % en bovinos persistentemente infectados (PI) y 60 a 80% de bovinos seropositivos (Lértora, 2003)

Esta enfermedad fue diagnosticada por primera vez en 1946, como Diarrea Viral Bovina en los Estados Unidos de América. En este mismo año Olafson la describió como una enfermedad transmisible del ganado, caracterizada por fiebre, diarrea, anorexia y tos, la cual correspondía a la forma epidémica de la enfermedad como infección postnatal del vDVB en hatos susceptibles, presentándose además, diarrea intensa de corta duración, leucopenia, descenso temporal en la producción de leche y abortos (Cotrino a, 2003)

Ramsay y Chivers en 1953, describieron una enfermedad esporádica con diarrea intensa y profusa, emaciación, lesiones ulcerativas del tracto gastrointestinal y con una mortalidad del 100%, lo cual denominaron Enfermedad de las Mucosas (EM). Posteriormente, se dedujo que la DVB y la EM eran dos entidades de diferente presentación ocasionadas por el mismo virus (Citado por Parra, 1994).

El estudio de la enfermedad perdió interés en los años 70 y 80, y a partir de los años 80, se descubrió la amplia gama de presentación de la enfermedad, su importancia como entidad inmunosupresora y sus efectos en la producción y la reproducción. Actualmente la DVB es considerada mundialmente como una de las principales enfermedades de importancia económica (Parra, 1994).

La presencia del vDVB en Colombia data de 1975, año en el cual un lote de novillas Holstein, importadas de Holanda, desarrolló un cuadro clínico de EM, diagnóstico que fue confirmado por el gobierno Holandés (Borda, 1975). Posteriormente Griffiths y col., en 1982 realizaron un muestreo serológico en bovinos de leche, encontrando en nueve sub regiones naturales de Colombia, una tasa de reactores del 47% para animales y

del 82% para predios. En 1987, Gallego y col., demostraron la presencia DVB en la Sabana de Bogotá, asociado con cuadros clínicos tales como abortos y retardos del crecimiento.

En 1989, Otte y col., establecieron en la Costa Atlántica una frecuencia de reactores de 5.7% en animales y del 46% en predios.

En 1990, Mogollón y col., describieron por primera vez en el país un caso de EM, con aislamientos de dos biotipos del virus: NCP y CP (no citopático y citopático respectivamente).

En 1996 se demostró en Colombia por primera vez la presencia de animales inmunotolerantes, persistentemente infectados (PI) por DVB (Rondón, 2006).

## **4.2 Agente etiológico.**

**4.2.1 Taxonomía y estructura:** El vDVB pertenece al género *pestivirus* de la familia *Flaviviridae* (Los *pestivirus* han sido reclasificados de la familia *Togaviridae* a la familia *Flaviviridae* por la quinta reunión del comité internacional de taxonomía viral). Dentro de este mismo género se encuentra el virus de la enfermedad de las fronteras de ovinos y la peste porcina clásica (PPC) los cuales son antigénicamente y genéticamente relacionados (Lértora, 2003, Rondón, 2006)

Los *pestivirus* pueden cruzar la barrera placentaria de hospederos diferentes, invadir el feto y generar una infección persistente que continua durante la vida postnatal, clínicamente inaparente, excretando el virus e infectando a otras especies (Álvarez y col., 2002). La DVB también infecta ganado de pezuña hendida como cerdos y ovejas (Jubb y col., 1993).

Estos son virus envueltos, esféricos y miden entre 40 a 60 nm de diámetro, se componen de una cadena simple de ARN, de polaridad positiva, compactado por una cápside proteica y rodeado por una membrana fosfolipídica; y nucleocápside no helicoidal, de simetría icosaédrica (Diderholm y col, 1996. Parra., 1994). El ácido nucléico es infeccioso en ausencia de las proteínas del virión, ya que el RNA viral es a la vez RNA mensajero; (Parra, 1994); En 1988 Collett encontró que el RNA tiene un solo OFR (open reading frame o marco abierto de lectura), y que la secuencia de nucleótidos codifica para 3988 aminoácidos, lo cual representa 449 Kda de proteína viral. El genoma posee proteínas estructurales y no estructurales; las proteínas estructurales son p20, p14 (C), gp48 (EO), gp25 (E1). En estudios realizados por Renard en 1987, con la cepa Osloss, produjo un DNA complementario (cDNA) al RNA viral y expresado y caracterizado en *E. coli*, obtuvo una longitud de 12490 bases, confirmando que el RNA no es poliadenilado y que sus condiciones bioquímicas lo

sitúan mas cerca de la familia *Flaviviridae* que de la familia *Togaviridae*, (Citado por Barrieto 2004).

La glicoproteína estructural E2 es el mayor inductor de anticuerpos neutralizantes, los cuales confieren protección luego de la infección o vacunación, además la naturaleza altamente variable de su región inmunogénica sugiere que la proteína E2 es una fuente importante de variabilidad antigénica entre las diferentes cepas de vDVB (Brownlie y col, 2000, citado por Barrieto 2004).

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

En 1987 Donis y col., determinaron por radioinmunoprecipitación (RIP) de extractos celulares infectados con la cepa Singer que la presencia de oligosacáridos en las proteínas es indispensable para la replicación viral, para esto adicionaron Tunicamycina a las células después de infectarlas, obteniendo una dramática reducción en la producción de virus infeccioso. La tunicamycina bloquea la primera etapa en la vía de síntesis de los oligosacáridos que se ligan a la asparragina de las proteínas.

Las glicoproteínas no estructurales son NS2-3, NS2 y NS3. La glicoproteína NS3 está asociada con la actividad lítica 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)

**4.2.2 Variabilidad:** La principal característica de este virus es su variabilidad genética y antigénica. Los virus ARN se caracterizan por su plasticidad; esta se debe a la falta de una exonucleasa eficiente para corregir las bases mal incorporadas, ocasionando una sustitución de base de alta frecuencia (1 error por cada 10.000 nucleótidos polimerizados). El vDVB usa esta estrategia para sobrevivir, originando cepas mutantes que escapan a la respuesta inmunológica de su hospedador. El cruce de especies crea otra oportunidad para la diversidad antigénica o evolución (Lértora, 2003).

Otra posible causa para la variabilidad es la oportunidad para la mutación que ofrecen los prolongados períodos de replicación en animales persistentemente infectados (PI). Sin embargo, esta última posibilidad no parece suceder con el vDVB. En 1992, Bolin y Ridpath demostraron que nuevas variantes antigénicas se originan durante el pasaje del virus en bovinos susceptibles que desarrollan una infección aguda. Esto sugiere que, mientras los animales PI son más importantes como reservorios, los animales con infección aguda pueden ser más importantes para la generación de nuevas variantes antigénicas (Paton y col., 1994, Lambeth y col., 2007).

**4.2.3 Clasificación:** La clasificación del vDVB es difícil, debido a su variabilidad genética y antigénica y a su estrecha relación con otros miembros del género *pestivirus*, virus causante de la peste porcina clásica (PPC) y virus de la enfermedad de la frontera de los ovinos (Borda 1975, Bolin y Gooms 2004).

Según sus efectos en cultivos celulares y por el reordenamiento genómico del gen no estructural, los *pestivirus* se dividen en biotipos citopáticos (CP) y los no citopáticos (NCP). Los virus citopáticos ocasionan vacuolización del citoplasma mediante un mecanismo apoptótico y muerte celular, además se caracteriza por la expresión separada de las proteínas NS2 y NS3 (Donis y col, a,b 1987), los virus no citopáticos no ocasionan cambios o lesiones visibles en el cultivo celular, es decir que no causa ningún efecto en la monocapa celular que infecta y donde se multiplica adecuadamente, es decir que la célula infectada parece normal, pero no indica carencia de virulencia o patogenicidad en su huésped usual (bovinos); este biotipo es el más común en la naturaleza y se expresa NS2-3 como proteína fusionada (Bolin y col, 2004), esto no implica que los biotipos NCP sean no patogénicos. El biotipo CP se aísla únicamente de animales con enfermedad de las mucosas (EM) y se origina por mutación a partir del biotipo NCP, ya sea por depleción de fragmentos del genoma viral, inserción de fragmentos de ARN celular y reordenamiento del ARN viral. Los virus NCP presentan afinidad por células linfocitarias mientras que los virus CP infectan de manera predominante las células epiteliales (Bolin y col, 1991, Bolin y col, 1992, Bolin y col, 2004)

El biotipo NCP aparece ampliamente distribuido como contaminante de importantes reactivos biológicos, sueros de origen bovino y cultivos celulares.

Hay considerables variaciones en la virulencia de las distintas cepas aisladas de vDVB, las infecciones pueden ser inaparentes o tener un desenlace fatal. Sin embargo, no se han identificado marcadores de virulencia que permitan un sistema de clasificación de las cepas de campo con base en su patogenicidad (Bolin y col, 2004)

Los dos biotipos son igualmente sensibles a temperatura y pH; son rápidamente inactivados por calor y desecación, luz UV, detergentes y solventes orgánicos (Reza, 2005).

Chu (1984) con la cepa citopática NADL cultivada en células de médula ósea fetal bovina, clarificada por centrifugación y concentrada con Polietilenglicol (PEG: peso molecular de 5700 a 6000) y posteriormente centrifugada a 90000 x g en Tartrato de Potasio, con tinción negativa, observó un tamaño promedio para las partículas virales en todas las etapas necesarias para ensamblar el virus dentro de las células, lo cual con el manipuleo necesario para poder obtener una cantidad apreciable de virus, explica la gran variabilidad en el tamaño y forma de los viriones, ya que se encontró

que la cubierta no es rígida siendo responsable de la fragilidad y pleomorfismo de los viriones (Citado por Arango 1994).

Ohmann en 1982 empleó un método diferente a Chu al efectuar lecturas del virus en microscopio electrónico, en tejidos de animales que presentaron EM, observando aislamiento de cepas NCP comparados con la cepa Danesa CP UG – 59 propagada en riñón fetal bovino y testículo fetal bovino, encontrando un tamaño de 45 a 55 nm (aislamiento de células no citopáticos) en tejidos y de 40 – 60 nm en cultivos celulares primarios (aislamiento de células citopático) (Citado por Arango 1994).

Purchio en 1984 inicialmente determinó que el genoma viral de una cepa citopática constaba de 8.2 Kb y que este no era poliadenilado (PolyA) en su porción terminal 3, característica que no era compatible con la biología molecular de un *Togavirus*, familia en la cual estaba clasificado antes de 1991 el género *pestivirus*. 8 (Citado por Arango 1994).

Collett en 1988 determinó la secuencia de nucleótidos del biotipo citopático de la cepa NALD, encontrando una secuencia de 12537 nucleótidos, con un peso molecular de  $4.3 \times 10^6$  Daltons y una composición básica de 32.2% de Adenina, 25.7% de Guanina, 22.1% de Uracilo y 20% de Citocina.

El biotipo CP se titula en sustratos celulares ya sea empleando la técnica de recuento de unidades formadoras de placa (UFP) o por cálculos de la Dosis infecciosa tejido celular 50% (DITC<sub>50</sub>) por recuento de efecto citopático en diferentes diluciones en base 10 con un número adecuado de repeticiones (7-10) por dilución siguiendo el método propuesto por Reed and Munch o Spearman y Karber (Carnero., 1982). La titulación del biotipo NCP ofrece dificultades ya que no presenta UFP o ECP, por tanto se emplea el método de la dilución limitante, que consiste en hacer diluciones seriadas en base 10 y posteriormente visualizar el virus por pruebas indirectas como IF, IFI o inmunoperoxidasa y calcular el título en DITC<sub>50</sub>., siendo en este caso aconsejable emplear 30 o 36 repeticiones por dilución con el fin de evitar un excesivo error a partir de muy pocas observaciones, ya que con los método indirectos de lectura pueden observarse muchas células infectadas cuando se emplean pocas repeticiones.(Carnero, 1982)

Según Parra, 1999, hay una diferencia entre cepas y aislamientos para biotipos, en razón de que las cepas son consideradas aquellos aislamientos sometidos durante mucho tiempo a pasajes en diferentes sistemas celulares y/o en animales experimentales, mientras los aislamientos son considerados aún de campo que no han sufrido en forma continua este proceso. Las cepas mas empleadas en los estudios de biología molecular y utilizadas por muchos laboratorios como antígenos de referencia en pruebas de seroneutralización son las cepas CP NADL, Oregon C24,

Singer, Osloss, UG-59, Nose, y Tokachi; dentro de las cepas NCP se destacan la cepa New York 1, Drapper, Indiana-46 y la Japonesa 12 (Nakamura y col, 2001).

Sobre la base de su secuencia genética el vDVB se puede dividir en 2 genotipos: tipo I y tipo II, aunque en forma adicional, existe una amplia diversidad antigénica entre el vDVB, sin llegar a categorías de serotipos (Obando y col., 2005). 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 PI; este se multiplica en una amplia variedad de cultivos primarios de fetos bovinos, tales como riñón, cornete nasal, piel, testículos y pulmón, así como en líneas celulares estables como la Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), por lo que puede ser utilizado con fines diagnósticos (Obando y col., 2005). El vDVB tipo II es asociado principalmente con enfermedad respiratoria severa 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 (Barrieto 2004).

La diversidad antigénica del vDVB es bien reconocida. Esta diversidad puede contribuir a la falla de vacunación, se ha demostrado que la habilidad de vacunas que contenían la cepa Singer 1 de vDVB, concedían protección cruzada contra infecciones de vDVB tipo 2, pero recientes brotes han sugerido que el vDVB tipo 2 han continuado evolucionando, las vacunas que solo contienen el antígeno del vDVB tipo 1, o una variable antigénica similar al tipo 2, no podrán proveer protección óptima contra la enfermedad (Reza, 2005).

Ningún biotipo o genotipo tienen consistencia relacionado a su virulencia. En general, los *pestivirus* tienen muy limitada habilidad para mantener su infectividad fuera del huésped (Nakamura, 2001). El vDVB pierde rápidamente su infectividad al contacto con solventes orgánicos y pH ambientales de 5.7 a 9.3. Su sensibilidad aumenta en variaciones de temperatura y pH entre 4 y 37 grados (Reza, 2005)

### **4.3 Epidemiología**

Según Parra 1999, la distribución de los anticuerpos en los distintos grupos etareos en hatos con animales PI y sin animales PI, determina que existan 5 fases en el ciclo de infección:

- Fase A: Hatos con infección aguda sin animales PI, solo un pequeño porcentaje del hato será seropositivo.

- Fase B: Hatos infectados con animales PI menores de 3-4 meses de edad, la mayoría de los animales están bajo una infección aguda., a una velocidad variable dependiendo del sistema de producción (Leche, Carne o doble propósito)
- Fase C: Hatos infectados con animales PI mayores de 3-4 meses de edad, usualmente más del 90% del hato es seropositivo.
- Fase D: Hatos previamente infectados donde los animales PI han sido removidos recientemente, los animales jóvenes serán seronegativos cuando pierdan sus anticuerpos calostrales a los 6-8 meses de edad, mientras que los animales adultos permanecen seropositivos.
- Fase E: Hatos previamente infectados, donde los animales PI han sido removido hace varios años, todos los animales jóvenes serán seronegativos (excepto algunos terneros con anticuerpos calostrales). Eventualmente el hato se volverá seronegativo.

#### **4.4 Transmisión de la enfermedad**

**4.4.1 Transmisión horizontal:** El virus se disemina horizontalmente por contacto directo, a través de las descargas oculonasales, la saliva, el semen, las secreciones uterinas, los fluidos placentarios, las heces, la orina y la leche (Fray y col., 1998, Flint y col., 2000, Swasdipan y col., 2002). El contacto directo con animales PI especialmente nariz-nariz, es el mecanismo mas eficiente de transmisión en condiciones naturales (Houe, 1995). El contacto directo con animales que sufren una infección aguda también puede transmitir el virus. El semen crudo o criopreservado de toros PI o con infección aguda es una importante vía de transmisión horizontal (Houe, 1999).

También es posible la transmisión por transferencia embrionaria. La mayoría de las células del tracto reproductivo de la hembra son permisibles al virus; además, los cultivos celulares y el suero fetal bovino utilizados en la transferencia embrionaria pueden estar contaminados (Costable y col, 1993).

Debido a la alta distribución que hay entre hatos de ganado y de la asociación que existe entre el virus y los fluidos del animal, el vDVB representa un problema potencial en la inseminación artificial o reproducción asistida. El semen contaminado de toros infectados o toros PI pueden transmitir esta enfermedad a vacas inseminadas artificialmente, también es posible que el semen de toros que presenten infecciones testiculares persistentes pueda infectar a la vaca (Gard y col., 2007)

Adicionalmente, fluidos, gametos y otras células derivadas de algún animal enfermo representa grandes fuentes de contaminación cuando estos “materiales de origen animal” son usados en la producción y trasferencia de embriones (Gard y col., 2007)

**4.4.2 Transmisión vertical:** En hembras preñadas, el biotipo NCP se puede diseminar verticalmente a través de la placenta; si el feto es infectado por este biotipo antes de adquirir competencia inmunológica (antes del día 125 de gestación aproximadamente), desarrollará una infección persistente (IP); estos terneros pueden actuar como fuente de infección. Pese a la elevada tasa de mortalidad de los PI en su primer año de vida, muchos alcanzan la madurez sexual y se reproducen (Los toros PI, infectan a las hembras durante la monta directa y la inseminación artificial). Hembras PI siempre dan terneros PI. La transmisión vertical siempre ocurre luego de la transferencia embrionaria si el receptor es PI, o la vaca donante es PI y no se realiza el correcto lavado del embrión (Houe, 1995, Houe, 1999; Lértora, 2003; Rondón, 2006).

Según Costable y col, 1993, 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: En animales gestantes que no han tenido previo contacto con el virus y que en condiciones naturales se infectan por vía respiratoria y/o oral, después de un período de incubación de 5 – 7 días presentan un leve incremento de la temperatura que pasa desapercibido y una profunda leucopenia de corta duración, con una viremia que puede persistir hasta por 15 días, es esta fase el virus atraviesa la placenta e infecta todos los tejidos fetales. Antes del día 60 de gestación, puede causar reabsorción fetal, muerte embrionaria y aborto, lo cual se observa cuando la vaca regresa rápidamente al celo (Costable, 1993). La muerte embrionaria temprana puede sobrevenir, presentándose en el primero de los casos un período entre estros normal y en el segundo un incremento de este intervalo. La muerte fetal puede sobrevenir en cualquier período originando abortos o momificación cuando el feto muerto es retenido (Bewoo y col, 2007)
- 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, clínicamente normal pero portador del virus a lo largo de su vida, estableciéndose una infección persistente o generando un animal PI inmunotolerante a la cepa infectante cuando alcanza su desarrollo inmune. Estos animales multiplican y excretan el virus durante el resto de su vida intrauterina y extrauterina y carecen de anticuerpos circulantes detectables a la cepa resistente (Brownlie y col, 1989). En fetos inmunotolerantes, el virus ocasiona interferencia en el crecimiento, diferenciación y maduración de sus

tejidos, situación que no es causada por insuficiencia placentaria si no debido a su sistemática multiplicación en los tejidos causando un retardo en el crecimiento intra y extrauterino. Estos animales pueden ser más pequeños de talla y peso y su curva de crecimiento es sensiblemente menor que la de los animales sanos y además pueden llegar a desarrollar la Enfermedad de las Mucosas. Los animales PI son el principal reservorio del vDVB (Bewoo y col, 2007)

- Cuando la infección ocurre entre los días 100 a 150 de gestación: Puede provocar el nacimiento de terneros débiles con alteraciones congénitas, hipoplasia cerebelar, lesiones oculares como degeneración de retina e hipoplasia, neuritis del nervio óptico y atrofia de la retina (Bewoo y col, 2007)
- 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 (Bewoo y col, 2007)

**4.4.3 Transmisión entre hatos:** La principal forma de introducir el virus a un hato susceptible es a través de la adquisición de bovinos PI o de hembras que transportan fetos PI. Otras vías de introducción son: el uso de vacunas vivas, semen contaminado, cohabitación con bovinos, transferencia embrionaria y el contacto con bovinos con infección aguda (Houe, 1995, Houe 1999).

**4.4.4 Transmisión dentro del hato:** La tasa de transmisión dentro del hato depende de la forma de introducción del virus al mismo. Cuando un animal PI es introducido a un hato, la transmisión a animales susceptibles ocurre rápidamente en la mayoría de los animales del hato; por el contrario, cuando la infección se inicia con un bovino con infección aguda o por alguna otra vía que inicie una infección aguda, la transmisión es de corta duración y solo incluye un pequeño porcentaje del hato antes de que la transmisión cese. El sistema de producción y la virulencia de las cepas también participan en la tasa de transmisión; la diseminación es más eficiente en sistemas de producción que permiten un estrecho contacto entre animales infectados con cepas virulentas (Houe, 1995, Houe, 1999; Lértora, 2003)

#### **4.5 Patogénesis**

La DVB es responsable de originar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones como resultado de la interacción de factores tales como: cepa y biotipo viral, edad, estado inmune del hospedador, respuesta inmune inducida, factores estresantes y otros patógenos concurrentes (Bielefeldt, 1995).

El virus penetra por vía oro-nasal (esta es la ruta principal de infección post natal), se replica en las mucosas de las cavidades oral y nasal y luego se desarrolla viremia y se disemina a través del organismo (Baule y col., 2001). Después del contacto con membranas mucosas de la boca o nariz, ocurre una diseminación sistémica a la cual puede ser como virus libre en suero o bien virus asociado a células, principalmente linfocitos y monocitos. El animal enferma luego de la infección debido a que el virus de la DVB daña el tejido epitelial linfoide: la replicación ocurre en células epiteliales, ya que este virus posee afinidad por el tejido linfoide siendo posible detectarlo en células de timo, linfonódulos, placa de Peyer, tonsilas y bazo (Ames, 1986).

El virus presenta tropismo por células mitóticamente activas como: linfocitos, fagocitos mononucleares y células epiteliales. El biotipo CP se replica en la mucosa nasal en títulos más altos que el biotipo NCP, resultando en una eficiente diseminación en animales susceptibles (Buttke y col, 1999, Cotrino b1997). La replicación comienza con la adhesión a la membrana plasmática y penetración en la célula, parece que el receptor específico es una proteína de 50kd, por mediación de la proteína de envoltura. Además, ocurre fusión de la envoltura con la membrana endosomal (dependiente de pH) y el virus ingresa al citoplasma mediante endocitosis mediada por receptor y libera su genoma en el citosol. La diseminación ocurre a través del virus libre en el suero o leucocitos infectados con el virus. Particularmente linfocitos, monocitos, linfoblastos circulantes y células precursoras de macrófagos (Buttke y col 1999, Givens y col, 2007).

La forma aguda se presenta en animales seronegativos, en especial en animales entre 6 y 24 meses de edad y es causada, en su mayoría, por virus NCP. Puede afectar el sistema respiratorio y digestivo, como resultado de la difusión activa del virus. La infección secundaria o mixta con otros patógenos es de presentación común. Se ha demostrado que el subtipo Id (DVB genotipo I subtipo d) induce enfermedad respiratoria primaria; se le ha atribuido un efecto sinérgico con el virus sincitial respiratorio bovino (Buttke y col 1999, Givens y col, 2007).

Gran parte de la patogenicidad de la DVB puede corresponder al proceso descrito en el año 1991 para la enfermedad de las fronteras en los ovinos (Sawyer y col., 1991), este autor describe una afección en la glándula tiroidea fetal que resulta en niveles hormonales bajos triyodotironina ( $T_3$ ) y tiroxina ( $T_4$ ); dicha deficiencia afecta, adversamente, la concentración de 2', 3'- nucleótido cíclico- 3'- fosfodiesterasa, una enzima esencial para la mielinización normal; igualmente, la alteración tiroidea afecta el desarrollo esquelético.

Un aspecto importante de la infección con vDVB es la aparente afinidad del virus por el sistema inmune y la inmunosupresión es una de sus principales características; la

DVB parece inducir respuestas mediadas por células T y B; existiendo una distinción entre respuestas humorales y mediadas por células, lo que sugiere la existencia de subpoblaciones de linfocitos T ayudadores Th1 y Th2 en la regulación de las respuestas inmunes específicas dirigidas contra la DVB (Lambot y col., 1998). Esto puede deberse a la afección de la función de células presentadoras de antígeno (APC: antigen presenting cells), llevando a una reducción en la habilidad para estimular respuestas de las células T (Lambot y col., 1998., Bolin y col 1991).

Estudios in vitro con vDVB, han demostrado que la infección de monocitos o macrófagos causa la síntesis de citoquinas que pueden ser responsables de la reducida habilidad para estimular respuestas de células T de antígenos específicos y mitógenos; por tanto es posible que la inmunotolerancia a la DVB sea una consecuencia de la infección de las células APC (Rondón 2006).

Bolin y col 1995 y Glew y col 2001 demostraron que el biotipo NCP induce en animales, experimentalmente, una respuesta primaria de anticuerpos significativamente más rápida y superior que su biotipo homólogo CP, indicando que esta es dependiente del biotipo de la cepa comprometida.

Diderholm y col 1996 especularon que el biotipo puede jugar un papel importante en la distribución del virus en los tejidos durante el curso de la infección y su tropismo es dependiente del biotipo, sugiriendo que el biotipo CP está restringido al tejido linfoide asociado al intestino, mientras el NCP se distribuye en el tracto respiratorio, células sanguíneas y órganos asociados con el tejido hematopoyético y que tales diferencias se limitan a mecanismos regulatorios similares a los ejercidos por las células Th1 y Th2.(Rondón 2006).

En estudios acerca de la depleción linfocítica específica causada por la DVB, se pudo constatar un papel importante de las células T CD4<sup>+</sup> pero no de células T CD8<sup>+</sup>, lo cual indica una actividad citotóxica restringida del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC: Major Histocompatibility Complex) clase II de las células T. Se ha sugerido que las células T CD4<sup>+</sup> juegan un papel decisivo en el establecimiento de la memoria inmune al vDVB (Adler y col 1996).

En algunos trabajos hechos por Diderholm y col 2001; se ha podido establecer que monocitos ex vivo de animales PI fueron capaces de estimular las células T CD4<sup>+</sup> de memoria permanentes, esto implica que las APC pueden tomar antígeno de la DVB exógeno, procesarlo vía endosomal y presentar los péptidos resultantes en asociación con moléculas MHC clase II. Los monocitos de animales PI fueron capaces de estimular respuestas de las células T CD8<sup>+</sup> restringida a MHC clase I en células T CD8<sup>+</sup> aisladas de ganado inmune a DVB, lo que sugiere que las células APC de animales PI, no están comprometidas en la habilidad para estimular una respuesta

inmunitaria de células T restringida a MHC clase I y que la DVB no ejerce un efecto supresor sobre la vía endógena de procesamiento del antígeno (Citado por Rondón 2006).

Igualmente, se ha destacado la depleción de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> in vivo. De manera similar, se ha observado que anticuerpos pasivos pueden proteger contra infección transitoria y aguda con DVB, indicando que las células T CD4<sup>+</sup>, son el principal componente de la recuperación e inmunidad de animales a DVB (Scheweizer, Peterhans, 2001).

El componente CD4<sup>+</sup> de la respuesta celular al virus se caracteriza por altos niveles de IL-4 (IL: interleuquina), factor de crecimiento de células B, y niveles relativamente bajos de IL-2 e interferón gamma (IFN-g); mientras el componente CD8<sup>+</sup> es más variable y posee niveles más altos de IL-2 e IFN-g pero no de IL-4; soportando que las células CD8<sup>+</sup> son capaces de actuar como efectores contra células infectadas con el virus mientras las células CD4<sup>+</sup> pueden proveer ayuda para la producción de anticuerpos neutralizantes capaces de limitar la diseminación del virus (Jaime y Ramírez., 1996).

El potencial inmunogénico de las proteínas vírales (glicoproteínas) aún no ha sido dilucidado. La inmunización con virus vivos o inactivados desencadena la producción de anticuerpos contra numerosas proteínas vírales y se han relacionado algunas proteínas, E2 y NS3, como inmunodominantes (Adler y col., 2001).

Las diferencias en el modo de interacción de los biotipos de vDVB con las células del hospedero, independiente del tropismo tisular, son el origen de la variación en la frecuencia de células que respondan específicamente a la proteína NS3, esto asociado a que los mecanismos de defensa son efectivos contra el biotipo CP y no contra NCP (Lambot y col., 1998., Gard y col., 2007). Las otras glicoproteínas, E1 y ERNS, no desencadenan la producción de anticuerpos que neutralicen eficientemente el virus.

En la apoptosis, el IFN y las citoquinas son importantes mecanismos de defensa que actúan a nivel de células hospederas como mecanismos antivirales humorales. Por lo tanto es predecible que el virus desarrolle mecanismos de evasión o inhibición de los procesos desencadenados a nivel celular previniendo la apoptosis ó subvirtiendo las respuestas al IFN (Gard y col., 2007). Estas estrategias incluyen modulación de las vías de Bcl-2/Bax, interferencia de caspasas, o inhibición de la vía PKR/ARNasa L (Rondón 2006).

Existe una relación entre el IFN y la apoptosis, pues se ha documentado que el IFNa/b (IFN tipo I), específicamente, ha mostrado ser mediador esencial o un potenciador de la muerte celular apoptótica en células infectadas por virus. La secreción de IFNa/b en

estudios in vitro fue inducida por la cepa CP pero no por la cepa NCP y en este último inhibió la inducción endógena de IFN tipo I por otros virus (Gard y col, 2007)

En células cultivadas e infectadas con la cepa NCP, se incrementó la replicación de otros virus. En el caso de la enfermedad de Newcastle, un *Paramixovirus* el cual induce IFN y es sensible a este, el incremento ha sido asociado con una reducción en los títulos de IFN inducidos en cultivos co-infectados con virus NCP; un resultado similar fue descrito para el virus de la PPC (Adler y col 1996). La DVB ha sido reportado como modulador de las funciones celulares del sistema inmune in vitro, con un incremento en la producción de óxido nítrico de macrófagos infectados, disminuyendo la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) en macrófagos estimulados con lipopolisacárido (LPS), reducción en la expresión de FC (fracción cristalizable) y receptor C3 del complemento, y la actividad fagocítica de macrófagos alveolares (Adler y col 1996). Otros factores inmunosupresores incluyen quimiotaxis reducida, liberación de un inhibidor de la actividad de la IL-1, disminución de la secreción de inmunoglobulinas, supresión de las respuestas proliferativas de células mononucleares bovinas frente a sustancias blastogénicas y alteración de la función neutrofílica disminuyendo su capacidad de degranulación y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, además de disminución de la iodación en polimorfonucleares y disminución en el nivel de proteínas séricas (Schweizer y Peterhans, 2001, Lambot y col., 1998). Infecta preferentemente linfocitos T CD8<sup>+</sup> e interfiere en sus funciones citotóxicas e inmunoreguladoras. La subregulación de la producción de TNF $\alpha$  podría ser causada por diversos mecanismos incluyendo una alteración en la cinética de producción de ARNm y su estabilidad (Bolin y col., 1994). La cepa NCP induce estrés oxidativo en los estados tempranos de infección celular, el cual se ha sido sugerido como un mediador de la apoptosis. Tal proceso de estrés puede estar ayudado por la inhibición de la síntesis protéica, observada durante infecciones con virus NCP. También se ha demostrado los efectos in vitro de la DVB en células bovinas (aumento en la síntesis óxido nítrico, con el biotipo NCP, más no con el biotipo CP, después del tratamiento con lipopolisacárido o *Salmonella dublín*). La actividad inhibidora de IL-1 inducida por lipopolisacárido fue incrementada para ambos biotipos. Contrario a esto, la síntesis de TNF $\alpha$ , quimiotaxis inducida por citoquinas así como la actividad procoagulante inducida por *Salmonella dublin* fue disminuida para ambos biotipos. La síntesis de IFN tipo I y de prostaglandina E2 solo estuvo presente en células infectadas con biotipo CP (Diderholm y col., 2001., citado por Rondón 2006).

**4.5.1 Efectos del virus sobre la fertilidad:** Las vacas seronegativas que reciben semen de toros PI seroconvierten 2 semanas después de la inseminación o monta.

Los toros PI son generalmente infértiles o producen semen de calidad reducida. La eliminación del virus en el semen de toros con infección aguda se extiende más allá del período de viremia, como consecuencia de la replicación local en vesículas seminales y próstata (Ramírez y col., 1999).

La infección experimental de novillas produce oovaritis prolongada, lo que conlleva a una disfunción ovárica (Ramírez y col., 1999). Para lo que la alteración del medio ambiente uterino durante la fecundación o un efecto directo sobre los gametos se proponen como respuestas (Welsh., 1995). Por otra parte, también se ha comunicado que la infección con vDVB incrementa significativamente el intervalo entre ciclos ovulatorios y la progesterona postovulatoria, también se ha indicado que el elevado nivel de cortisol puede suprimir la liberación de hormona luteinizante y, alternativamente, la afección de los folículos preovulatorios puede resultar en reducida esteroidogénesis (Rondón., 2006).

El embrión bovino es susceptible a infección con DVB dentro de las 2 semanas de incubación (emergencia desde la zona pelúcida), la ausencia de infección viral del oocito bovino ha sido atribuida a una barrera física a la entrada viral presentada por la zona pelúcida, sin embargo, esta no garantiza que los oocitos se encuentren libres de vDVB y se han propuesto a su vez dos rutas de acceso al oocito: la DVB puede ganar acceso directo dentro del útero, pues allí el oocito es metabólicamente activo y no ha completado la deposición glicoproteica requerida para formar la zona pelúcida. La segunda ruta es a través de las células del cumulus, susceptibles a infección. En ese mismo sentido se destaca la presencia de poros en la zona pelúcida de tamaño suficiente para permitir el paso de virus tales como el vDVB (45-55nm) y el herpesvirus bovino tipo-1 (180-200nm), demostrándose que en todos los estados de desarrollo embrionario más del 96% de los poros poseen el tamaño necesario para la entrada viral. Probablemente comienza a ser susceptible a la infección después de la implantación a los días 19-20 post-concepción y/o al desarrollo de cotiledones fetales alrededor del día 30 post-concepción (Arbeláez y col., 2002; Ramírez y col., 1999).

**4.5.2 Patogénesis de la infección aguda:** La forma aguda se presenta en animales seronegativos, en especial animales entre 6 y 24 meses de edad y es causada, en su mayoría, por el biotipo NCP. Puede afectar el sistema respiratorio y digestivo, resultado de la difusión activa del virus. La infección secundaria o mixta con otros patógenos es de presentación común. Se ha demostrado que el subtipo Id (DVB genotipo I subtipo d) induce enfermedad respiratoria primaria. Se le ha atribuido un efecto sinérgico con el virus sincitial respiratorio bovino (Góngora y col, 1995; Lértora 2002).

**4.5.3 Malformaciones:** DVB es capaz de cruzar la placenta así como la barrera hematoencefálica fetal, produciendo diversas lesiones en el sistema nervioso central (principalmente cerebelo); la severidad en las lesiones se incrementa con la edad del feto al momento de la infección. También se ha reportado deformación esquelética (miembros posteriores, frontales doblados, braquignatismo mandibular, alopecia y anomalías en cabeza y mandíbula). Góngora y col, 1995; Lértora 2002).

#### **4.6 Signos y Patología**

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 esta enfermedad va desde las formas más comunes que son la forma de presentación subclínicas o leves, con mediana severidad; 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 orales, además hay leucopenia, linfopenia y neutropenia, lo que potencia la acción de otros microorganismos patógenos bacterianos y vírales, sin embargo el virus también es responsable de la EM, la cuál afecta a bovinos entre los 6 meses a los 2 años de edad y se caracteriza por la presentación de severos signos clínicos, baja morbilidad y mortalidad hasta del 100% (Young y col, 2006)

La forma subclínica es de alta morbilidad pero con una baja mortalidad. La mayoría de los signos clínicos de una infección por DVB suelen atribuirse a otros agentes. Los síntomas pueden ser moderados o severos y se pueden manifestar con: abortos, muerte embrionaria temprana o nacimientos prematuros, problemas reproductivos, anorexia y depresión; diarrea acuosa profusa, neumonía, descarga nasal, salivación excesiva con úlceras en la mucosa oral (Baker, 1995). 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 (Fray y col., 1998)

Las infecciones del virus presentan diversas formas, siendo en bovinos susceptibles inmunocompetentes, sub-clínicas o inaparentes en el 70-90% de los casos. En el 10-30% restante se manifiesta en forma clínica moderada. A pesar de que la mayoría de las infecciones son sub-clínicas o moderadas, el virus facilita que se instauren cuadros severos de enfermedad al potenciar la acción de otros virus o bacterias, que coinfectan al animal (Baule y col., 2001; Elvander y col., 1998).

Las lesiones y la presentación clínica, dependen del estado inmune del animal, de la edad, de la presencia de otros agentes estresantes, estado de preñez y tiempo de gestación; la infección de las vacas, ocasionada por la monta natural, o por la inseminación artificial con semen contaminado, disminuye la eficiencia reproductiva al causar infertilidad temporal (Fray y col., 1998)

Uno de los aspectos de importancia económica en la enfermedad, es la producción de los problemas reproductivos, los que generalmente se ven reflejados en la muerte embrionaria y en el aborto; otros se manifiestan al nacimiento del animal como los PI capaces de generar la enfermedad de las mucosas (EM) la cual se caracteriza por su alta mortalidad y/o morbilidad y los animales PI infectados; la presentación de defectos congénitos, los diferentes cuadros clínicos están asociados con el momento de la gestación en la cual se produce la infección (Al-Masri y col., 1997, Cortese y col., 1998, Houe., 1999).

**4.6.1 Diarrea viral bovina aguda:** Es una infección post natal aguda, de severidad variable, que se presenta en bovinos seronegativos e inmunocompetentes. Se pueden presentar varios síntomas, que van desde fiebre, depresión y secreción líquida en la nariz y en los ojos, hasta diarrea, úlceras en la boca, o enfermedad respiratoria y aborto al mes de la exposición (Baker, 1995, David y col 1994).

La infección aguda altera la función ovarica y reduce la fertilidad. El vDVB causa ooforitis intersticial no purulenta, con necrosis de células de la granulosa y de oocitos. 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 v DVB puede ser aislado a partir de semen, el cual es de baja calidad y potencialmente puede infectar a hembras seronegativas (Brownlie y col, 2000).

- Infecciones subclínicas: La mayoría de las infecciones son subclínicas o de carácter moderado, con fiebre, descarga oculonasal, leucopenia transitoria, elevada morbilidad y baja mortalidad. Se desarrollan anticuerpos neutralizantes 14 a 28 días post infección y consecuentemente la protección contra reinfecciones por cepas homologas del virus es de por vida (Baker, 1987, David, 1994).
- Complejo diarrea neonatal bovina: Cuando fracasa la transferencia pasiva de anticuerpos, el virus participa en el complejo diarrea neonatal de los terneros. Infecciones concurrentes con enteropatógenos resultan en manifestaciones clínicas más severas, debido al efecto inmunodepresivo del vDVB, o simplemente a una sumatoria de efectos (Baker 1987).

- Infección aguda severa: La infección aguda severa es de elevada morbilidad y mortalidad, asociada con virus de alta patogenicidad, caracterizada por fiebre elevada, signos respiratorios, diarrea y abortos, caída en la reproducción y producción de leche; la exposición a cepas de alta virulencia ocasionan una enfermedad con signos clínicos y lesiones anatomopatológicas similares a la forma de la enfermedad de las mucosas (Baker, 1987)
- Síndrome hemorrágico: Ocasionado por el virus del genotipo II del vDVB. Se caracteriza por mucosas anémicas con hemorragias petequiales y equimóticas, hipertermia, hemorragia en múltiples sistemas orgánicos, diarrea sanguinolenta, epistaxis, sangrado constante en los sitios de inyección, anemia, leucopenia, trombocitopenia y muerte (Bolin y col., 1992), esta sintomatología se atribuye a trombocitopenia y alteración de la función plaquetaria. Se ha demostrado una disminución de la respuesta de las plaquetas a la agregación y, aunque se desconoce el mecanismo de estas alteraciones, es probable que el virus actúe por uno o más mecanismos:
  - Se ha detectado antígeno viral en los megacariocitos, lo que podría resultar en una menor producción de plaquetas y en un incremento en el porcentaje de plaquetas envejecidas (los trombocitos viejos son menos sensibles a los estímulos de agregación)
  - El virus se aísla de los trombocitos y una interacción virus plaqueta directa puede afectar la respuesta plaquetaria a la agregación.
  - Aumento en la producción de sustancias inhibitoras de la agregación plaquetaria; bovinos infectados con el vDVB presentan altas concentraciones de prostaglandina E y óxido nítrico. Hay una frecuente correlación entre la fase trombocitopénica y viremia, además, la recuperación del recuento plaquetario está estrechamente relacionada con la aparición de anticuerpos neutralizantes. Esto sugiere que este síndrome es el resultado de la alteración y consumo de los trombocitos periféricos, más que una alteración en su producción (Ramírez y col, 1994)
- Inmunodepresión: El vDVB ocasiona leucopenia y altera las funciones de los leucocitos, aumentando la patogenicidad de microorganismos coinfectantes. Tiene una fuerte afinidad por el tejido linforreticular, ocasiona necrosis y atrofia de dichos tejidos. En el tejido linfoide el virus se localiza principalmente en las células del estroma, incluyendo los macrófagos y células de soporte. Estas células elaboran citoquinas esenciales para el normal desarrollo y maduración de los linfocitos, lo que sugiere que la necrosis linfoide es secundaria al

trastorno del microambiente que proveen las células intersticiales y no a la acción directa del virus sobre los linfocitos.

- Enfermedad respiratoria: El vDVB origina inmunodepresión sistemática y pulmonar, aumentando la patogenicidad de los restantes agentes respiratorios, según Baker 1999 ciertos virus de la DVB actúan como agentes primarios de neumonías.
- Trastornos reproductivos: La infección aguda altera la función ovárica y reduce la fertilidad. El vDVB causa ooforitis intersticial no supurativa, 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, reducción de los niveles de estradiol durante la fase folicular y disminución o ausencia de las oleadas de hormona luteinizante pre-ovulatoria o retraso en el tiempo del pico de hormona luteinizante pre-ovulatoria (Grooms y col., 1998).

Rondón 2006 y Lértora 2003, sugieren que en la infección ovárica es posible que actúen varios mecanismos:

- Inadecuado soporte gonadotrófico por infección de la glándula pituitaria.
- La leucopenia que acompaña a la infección aguda puede ser el reflejo de una deficiencia en la población de leucocitos ováricos, células vitales para la dinámica folicular normal.
- La necrosis de las células de la granulosa de los folículos pre-ovulatorios, afectan negativamente a la secreción de estradiol, y, consecuentemente, suprime la liberación de hormona luteinizante y retrasa o impide la ovulación.
- La disfunción ovárica puede ser el resultado de la ooforitis y de los cambios en la concentración de citoquinas ováricas.
- La reducción de los niveles de estradiol durante la fase folicular pueden perjudicar el comportamiento estral, impedir la ovulación o reducir el número y calidad de oocitos liberados.

El impacto del vDVB durante la preñez se divide en cuatro períodos, con base en las manifestaciones clínicas de la infección durante estos intervalos de tiempo específicos.

- Etapa embrionaria (0-45 días): Las infecciones de hembras susceptibles próximas al momento del apareamiento ocasiona muerte embrionaria repetitivas de servicio hasta que desarrollen respuesta inmune. Se

desconoce como los biotipos NCP afectan al embrión. El virus no tiene efecto sobre el crecimiento y desarrollo de los embriones hasta el día 8-9, momento en que pierden la zona pelúcida y se vuelven susceptibles. El resultado de la infección no citolítica también puede causar daño cromosómico, resultado en el desarrollo de malformaciones. Por otra parte, la replicación del virus en células oviductales puede alterar sus funciones biológicas, como la secreción de factores embriotrópicos que soportan el desarrollo embrionario.

- Día 45 a 125 de gestación: Este período comienza al finalizar la etapa embrionaria y culmina cuando el feto adquiere competencia inmunológica al DVB. El momento exacto en que el feto adquiere competencia inmunológica al virus no es claro, se han detectado anticuerpos neutralizantes contra el virus en fetos infectados entre los días 100 y 135 de gestación. La infección con biotipos NCP antes que el feto adquiera competencia inmunológica, resulta el nacimiento en animales PI e inmunotolerante. Durante este período también se produce muerte fetal con momificación o aborto meses después y un pequeño porcentaje de teratogénesis (Lértora 2002, Lértora 2003)
- Día 125 a 175 de gestación: Este período representa el comienzo de la inmunocompetencia fetal y del estado de organogénesis, momento en el cual se presenta un gran porcentaje de alteraciones del desarrollo. También se pueden producir abortos, pero éstos son mas frecuentes en las etapas tempranas de gestación. Se pueden observar distintos tipos y grados de malformaciones tales como hipoplasia cerebelar, microencefalia, hipomielogénesis, hidranencefalia, hidrocefalia, atrofia o hipoplasia del timo, cataratas, microftalmia, degeneración de retina, hipoplasia y neuritis del nervio óptico, alopecias, hipotricosis, hipoplasia pulmonar, braquignatismo, arnogrípisis, retraso general del crecimiento y deformidades esqueléticas. Posibles explicaciones de estas malformaciones serían el daño celular directo por el virus o la destrucción de las células infectadas por el sistema inmune fetal. Los fetos ovinos infectados con el virus de la enfermedad de la frontera desarrollan hipotiroidismo y bajos niveles de hormonas tiroideas afectan la concentración de la enzima 2',3'-nucleotido cíclico-3'-fosfodiesterasa esencial para la mielinización y el normal desarrollo del sistema esquelético. Se desconoce si el vDVB induce fetopatías por un mecanismo semejante. La inmunohistoquímica reveló abundante

cantidad de antígeno de la glándula pituitaria, hipotálamo y tiroides de un ternero infectado in útero con trastornos severos y generalizados de la osteogénesis. Este hallazgo sugiere que el virus altera el metabolismo hormona fetal originando trastornos del desarrollo esquelético (Lértora 2002).

- 175 días de gestación en adelante: En esta etapa el feto se encuentra en un período de crecimiento general y es inmunológicamente competente. Las infecciones en este período resultan en el nacimiento de terneros seropositivos o débiles, mientras que los abortos son ocasionales (Lértora 2002).

**4.6.2 Enfermedad de las mucosas (EM):** La enfermedad de las mucosas es otra de las manifestaciones clínicas provocadas por la DVB y es una secuela de la infección intrauterina ya que solo se ha encontrado en animales inmunotolerante entre los 8 y 22 meses de edad después de degradar su inmunidad materna, en este caso confluyen en un mismo animal los biotipos CP y NCP del virus (Barajas y col 1987). Esta enfermedad se presenta de forma aguda cuando un animal PI durante la vida intrauterina, infectado con una cepa NCP se sobre infecta con una cepa antigénicamente homóloga pero de tipo CP (Brownlie y col, 2000, Bolin y Gooms, 2004); esta condición ocurre en animales PI que sufren una sobreinfección con biotipos de origen exógeno generada por cambios genéticos o recombinación del ARN de las cepas NCP residentes (Baule y col., 2001); esto suele ocurrir entre los 6 a 24 meses de edad. En esta forma se aíslan ambos biotipos que son antigénicamente similares. Es una forma esporádica, fatal, de curso agudo o crónico y se caracteriza por severa leucopenia, diarrea profusa, erosiones y ulceraciones digestivas (Lértora, 2006). En animales con EM el biotipo CP es predominantemente aislado de bazo, colon y ciego y el biotipo NCP de intestino, hígado, bazo, riñones, tonsilas y nódulos linfáticos mesentéricos, a su vez, aunque en sangre se encuentran los dos biotipos la mayor concentración corresponde al biotipo NCP (Lértora 2006).

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 mas 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 EM 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 oral, 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 (Bewoo, 2007, Lértora 2002)

Cuando la sobreinfección de un animal inmunotolerante portador del vDVB ocurre con una cepa citopática pero antigénicamente diferente, heterológa, se desencadena la enfermedad de las mucosas de tipo crónica, que se manifiesta con inapetencia, diarrea intermitente y emaciación progresiva; el pelaje se presenta hirsuto, se produce deformación de las pezuñas y lesiones erosionadas con escaras a nivel del periné, escroto orificio prepucial y vulva, cara interna de las 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 (Lértora, 2002).

#### **4.7 Animales Persistentemente Infectados (PI)**

Los animales PI constituyen un grupo importante para la perpetuación de las enfermedades en las poblaciones animales, por lo que son conocidos como los únicos reservorios naturales del virus (Bolin, 1992). El ternero PI es portador del virus mientras vive y es incapaz de montar una adecuada respuesta inmune contra el virus presente en su organismo, estos animales son los reservorios y los principales diseminadores del virus en el hato y pueden desarrollar la enfermedad de las mucosas de curso fatal (Rivera, 2001).

Una vez han desaparecido los anticuerpos maternos, el PI puede eliminar el virus durante toda su vida. Se asume que la vida útil de los PI, es reducida por diversos aspectos, además de la probabilidad de manifestar EM la cual tiene consecuencias letales.

Solo el biotipo NCP de la DVB ha sido reportado capaz de establecer una infección persistente en el feto, (Young y col., 2006).

Los PI son mas susceptibles a otras enfermedades comunes a los terneros, como diarreas y neumonías; estos animales permanecen en las fincas, pues los propietarios no relacionan la situación con el vDVB, y mediante cuidados alternativos, tratan de nivelar el grupos de animales jóvenes favoreciendo la supervivencia de los PI, aunque pocos terneros PI puedan hacerlo. Son animales aparentemente normales, en ocasiones tienen ganancias de peso y desarrollo menor cuando se comparan con los otros animales del grupo. En casos donde el hato sea libre de la enfermedad, o los niveles de inmunidad sean bajos, se pueden presentar brotes de DVD con alta mortalidad (Parra 1994; Andino y col, 1987)

En algunas ocasiones, los PI se comportan como diseminadores del virus, creando un nivel de tolerancia en el resto de los animales. Cuando se ha llegado a un equilibrio entre las defensas del animal y la presencia el virus, las manifestaciones clínicas en el hato están mas relacionadas con una disminución en la eficiencia reproductiva y un incremento en el porcentaje de diarreas y neumonías en animales jóvenes; en algunos hatos con títulos serológicos de vDVB so se ha demostrado un efecto negativo en la producción.

Aunque tradicionalmente se ha descrito que los animales PI no desarrollan anticuerpos neutralizantes detectables contra el vDVB, recientemente se ha demostrado que esta afirmación es relativa debido a que cada vez creciente el número de estudios donde se demuestra la presencia de anticuerpos neutralizantes y precipitantes en inmunotolerantes (Bolin y col., 1991), sin embargo estos animales son inmunocompetentes frente a otros antígenos virales y/o bacterianos.

Las vacas PI siempre paren terneros PI, sin embargo, algunas vacas seropositivas pueden producir terneros persistentemente infectados si sus anticuerpos circulantes no tienen reacción cruzada con el virus al cual son expuestas. Los terneros PI son susceptibles a numerosas enfermedades por el efecto inmunosupresor del virus (Brownlie y col, 2000). Algunas veces, sin embargo, pueden ser aparentemente normales y saludables.

**4.7.1 Infección persistente:** Un animal persistente infectado (PI) es aquel en que es posible aislar el virus de la sangre o tejidos en dos ocasiones sucesivas con un intervalo no menor a dos semanas. Estos animales son virémicos durante toda su vida y no producen anticuerpos contra la cepa que les origino inmunotolerancia. La infección persistente debe ser considerada en todo ternero pequeño al nacimiento, con escaso desarrollo y ganancia de peso, débil y con cuadros recurrentes de enfermedad respiratoria y digestiva (Raymond y col, 2002)

Los animales PI resultan de la infección fetal con DVB durante el primer trimestre de gestación, dado que el sistema inmune fetal infectado con DVB antes del día 125 de preñez, no reconoce el vDVB como agente infeccioso o extraño, además la mayor expansión de órganos linfoides fetales y sus poblaciones leucocitarias ocurre en el tercer trimestre de gestación (Raymond 2002; Frederiksen y col, 1999).

Solo el biotipo NCP del vDVB ha sido reportado capaz de establecer una infección persistente en el feto, también se propuso que la capacidad del virus NCP y CP para establecer la infección persistente está relacionada con diferencias en la habilidad de inducir interferón (IFN). Aunque se cree que la multiplicación considerable del virus genera diversidad, no se han detectado cambios genéticos en virus aislados en diferentes momentos del mismo animal.

## 4.8 Diagnóstico

Debido al amplio tipo y severidad de lesiones inespecíficas, en ocasiones solo evidenciadas por microscopia, el diagnóstico se basa únicamente en el aislamiento del virus o detección del antígeno viral específico. El objetivo principal del diagnóstico es la detección y remoción de bovinos PI, principal fuente de infección y reservorio del virus (Bewoo, 2007).

**4.8.1 Diagnóstico clínico:** El diagnóstico clínico se basa en la historia, signos y lesiones. La enfermedad aguda en general cursa como una infección subclínica que pasa inadvertida en la mayoría de los hatos (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 oral. Algunos animales también evidencian lesiones pódalas (úlceras interdigitales y inflamación del rodete coronario). El aborto como consecuencia de la infección con DVB puede suceder desde unos días hasta varias semanas después de la infección sub-clínica o enfermedad clínica (Cotrino y col, 1997, Cotrino y col, 2003).

**4.8.2 Serología:** Las pruebas serológicas han sido un buen indicativo para la detección de la presencia del virus en las poblaciones bovinas y tienen amplia acogida; entre las pruebas serológicas más importantes se destacan:

- **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 (Cotrino y col, 2003).
- **Neutralización Viral (NV):** La neutralización viral se basa en la determinación de anticuerpos neutralizantes contra el virus que aparece en el suero de los animales pos infección. Un título de anticuerpos séricos con un incremento mayor a 4 veces indica infección aguda, o bien la aparición de anticuerpos contra DVB en animales que anteriormente eran seronegativos (Cotrino, 2003). 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 reciproca de la dilución más alta de cada suero en la cual el virus es neutralizado en el 50% de los pocillos (Lértora 2003).
- **Ensayo Inmunoenzimático (ELISA):** Es una prueba sensible, rápida, confiable y económica para diagnóstico serológico de infección por DVB.

La prueba de ELISA para el vDVB está diseñada para detectar anticuerpos específicos en muestras de suero, plasma y leche; esa prueba consiste en una técnica donde se utilizan placas de microtitulación tapadas con antígeno de vDVB. Los anticuerpos presentes en la muestra se unen con el antígeno de la placa, el material no ligado se elimina mediante un lavado, el complejo antígeno anticuerpo se detecta mediante un conjugado de peroxidasa de rábano, el resto del conjugado se elimina mediante el lavado de la placa y se añade una solución de sustrato/cromógeno. En presencia de la enzima, el sustrato se convierte en un producto que reacciona con el cromógeno generando una coloración azul, la cual con la adición de la solución de frenado se emite un color amarillo (Arbeláez y col, 2002).

Los sistemas ELISA basados en anticuerpos policlonales dirigidos contra varias proteínas y glicoproteínas de cepas antigénicamente diferentes, son capaces de detectar una amplia variedad de vDVB. Este sistema comparado con el aislamiento viral, ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad (97,9% y 99,7% respectivamente) y es comparable a los sistemas ELISA que utilizan un pool de anticuerpos monoclonales. Por otra parte, los sistemas ELISA basados en un anticuerpo monoclonal epítipo específico son cuestionables, debido a que su estrecho rango de especificidad puede fallar en detectar algunas cepas del vDVB (Arbeláez y col, 2002).

- 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 (Lértora 2003)

El análisis serológico de una pequeña muestra de sangre tomada al azar de terneros de 6 a 12 meses de edad permite distinguir hatos con infección activa, de hatos sin bovinos PI, con un alto grado de seguridad. Se puede cometer errores de clasificación cuando los hatos poseen animales PI muy jóvenes, que no han tenido tiempo de infectar a los animales seronegativos, cuando los sistemas de explotación y la virulencia de la cepa permitan una diseminación lenta, o si se toma la muestra de animales menores de 6 meses de edad, los cuales tendrán anticuerpos calostrales, estos problemas se solucionan repitiendo el examen unos meses después (Lértora 2003).

Medir el nivel de anticuerpos en las leches almacenadas en tanques permite determinar el status infeccioso del hato y es ampliamente empleado en países que están erradicando esta enfermedad (Bitsch y col., 2000); sin embargo este método no distingue entre hato con animales PI y hatos donde dichos animales han sido

recientemente eliminados, debido a que los títulos de anticuerpos en la leche declinan fácilmente (Bitsch y col., 2000).

**4.8.3 Detección de virus o partículas virales:** Una vez identificados los hatos con infección activa, se debe examinar individualmente a los animales para detectar a los bovinos PI. Para ello existen diferentes métodos:

- Aislamiento viral en cultivos celulares: Es una técnica de diagnóstico muy usada y sensible. El virus puede ser aislado de sangre, ya sea libre en suero, de coagulo y con mayor sensibilidad de leucocitos en sangre. A la necropsia puede aislarse de muchos órganos, principalmente órganos linfoides como timo, bazo, placas de Peyer (Barrieto 2004).

Este es un método de referencia, 100% específico y altamente sensible. Sin embargo, es prohibido para ser usado en el diagnóstico de animales PI en un programa de control y erradicación (Celedon y col, 1998). El cultivo celular se ha optimizado con el sistema microlitro multi-well, donde células cultivadas en placa con múltiples pocillos son inoculadas con 10 a 50 µl de suero problema e inoculadas por 4 días; la presencia de los biotipos NCP se detecta con el empleo de anticuerpos anti – DVB marcados con peroxidasa o fluorocromos (Bitsch y col., 2000).

Los animales PI presentan altos títulos vírales en sangre y el virus puede ser aislado prácticamente desde todos los órganos. En los toros PI el virus también puede ser aislado de semen (Brownlie y col, 2000). El aislamiento de virus de 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 período 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 período de 2 a 3 semanas (Barrieto 2004).

Los cultivos celulares varían en su susceptibilidad a diferentes virus, por lo que, se debe incluir el tipo celular más susceptible al virus sospechado en la muestra, para el vDVB las líneas celulares de elección son: EBTr (NBL-4) de tráquea de embrión bovino, Bu (IMR-31) de pulmón de búfalo y MDBK de riñón bovino (Donis y col b1987).

Solo se deben usar células sanas, recientemente preparadas, jóvenes, ya que las células viejas son menos sensibles a infecciones por virus. Para hacer el aislamiento viral se debe hacer un examen microscópico de las células para determinar que estén en buenas condiciones, descartar el medio consumido e inocular un volumen apropiado de la muestra, dependiendo del recipiente a emplear; permitir una adsorción a 37°C durante 30 a 60 minutos, tiempo

después del cual se adiciona medio de cultivo de mantenimiento y se lleva a incubación. Se debe observar los cultivos cada día para verificar la presencia de efecto citopático compatible con el agente, lo cual se verifica comparando con el control. Se debe mantener el cultivo por lo menos durante dos semanas bajo observación, antes de dar una muestra como negativa (Ramírez y col., 2005, citado por Vera y col 2006).

Cuando ocurren efectos inducidos por un virus, se realiza un pasaje del sobrenadante del cultivo infectado, en cultivo fresco del mismo tipo celular, con el objeto de asegurar su recuperación para la futura identificación 8 Ramírez y col., 2005).

- Detección de antígenos mediante inmunohistoquímica (IHQ): La IHQ se realiza, rutinariamente, en tejido fijado en formalina y en 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 (Givens y col, 2007).

La IHQ de tejidos fijados en formalina es el método diagnóstico más conveniente para la detección del vDVB en fetos. Hay un número significativo de falsos positivos y falsos negativos con la inmunofluorescencia (sensibilidad 77%, especificidad 73%), así con un significativo número de falsos positivos con el aislamiento viral (sensibilidad 83%, especificidad 100%), mientras que la IHQ posee el mejor desempeño: especificidad 97% y sensibilidad 97%. En casos de fetos con avanzada autólisis, la IHQ de cerebro fijado en formalina se recomienda sobre el aislamiento viral y la detección del antígeno o por la prueba de ELISA (Grooms y col, 1998).

La presencia del antígeno del vDVB en queratinocitos de la epidermis y células epiteliales de folículos pilosos de bovinos PI clínicamente normales, ha originado el desarrollo de la técnica inmunohistoquímica en biopsias de piel para el diagnóstico de estos animales. Esta técnica, en comparación con el aislamiento viral, ha demostrado ser eficaz, rápida, económica, sencilla y fácilmente implementable en cualquier laboratorio de histopatología. Además, la recolección y remisión de las muestras al laboratorio es simple. Las muestras fijadas en formalina son más estables que las muestras de sangre o suero, evitándose así falsos negativos por autólisis o putrefacción, adicionalmente, los anticuerpos calostrales no interfieren con la técnica, permitiendo analizar terneros neonatos (Lambot y col, 1998).

La inmunoreacción en piel de bovinos PI permite visualizar al DVB como estructuras granulares de distinto diámetro, localizadas en el citoplasma de todas las células epiteliales de la epidermis y de los folículos pilosos, células de las glándulas sebáceas, células de las glándulas sudoríparas, histiocitos, músculo liso y células endoteliales. Este patrón de tinción y la distribución de la inmunoreacción son característicos de una infección persistente y deben tenerse en cuenta a la hora del diagnóstico inmunohistoquímico. Además, se puede demostrar la presencia de antígenos del vDVB en el citoplasma de las células que conforman la vaina de la raíz de pelos extraídos manualmente de bovinos PI. Sin embargo, no se recomienda el empelo de muestras de pelo para el diagnóstico rutinario de estos animales, ya que pese a ser fácil la toma de muestra, es una técnica laboriosa que consume gran cantidad de reactivos y no permite el estudio simultáneo de numerosas muestras. La inmunolocalización de este virus en tejidos fijados en formalina al 10% empleando anticuerpos monoclonales es difícil, ya que es un virus antigénicamente variable y sensible a los efectos de la fijación. (Lindberg y col, 2006).

- Detección del ácido nucleico viral: Existen diversos métodos para detectar el ácido nucleico de los virus, entre los que se destacan:

- *La reacción en cadena de la polimerasa (PCR):* es un método rápido, sensible, que detecta diversos tipos y biotipos de vDVB y permite investigar un gran número de muestras en corto tiempo. Su sensibilidad permite detectar el virus en pool de muestras de sangre y leche de tanque, sin embargo, su elevada sensibilidad puede originar resultados falsos positivos. Para minimizar la detección del vDVB se han seleccionado partidores de la región 5' no codificante del genoma del *pestivirus* (Léctora, 2002, Léctora, 2003).

Para el vDVB, que posee ARN en su genoma, lo que generalmente se hace es convertir el ARN en una copia de ADN, por acción de la enzima transcriptasa reversa, antes de realizar la amplificación con la ADN polimerasa.

Según Léctora 2003 y Motoshi 2004, para la realización de la prueba, siempre se utilizan controles positivos. Para el desarrollo de la PCR, se llevan a cabo los siguientes procesos:

- a) Extracción de ácidos nucleico, tanto de ARN como de ADN a partir de material biológico.
- b) Amplificación enzimática de ácidos nucleicos: Para la reacción de transcripción reversa reacción en cadena de

la polimerasa (RT-PCR) se utilizan “primers” específicos seleccionados a partir de regiones conservadas de los agentes a analizar (DVB) de acuerdo con secuencias publicadas.

c) Visualización de los productos de PCR: Los productos amplificados se someten a electroforesis en geles de agarosa en concentración del 2% y se visualizan por tinción con bromuro de etidio y exposición a la luz UV, los productos también pueden ser visualizados por separación mediante geles de poliacrilamida con tinción de plata.

- *Enzimas de restricción:* El ADN puede ser fraccionado por enzimas de restricción, las cuales son obtenidas de agentes bacterianos que las emplean para destruir agentes invasores, reconocen y cortan el ADN en una corta secuencia de nucleótidos específicos. El análisis de los fragmentos de ADN permiten su reconocimiento con diferencias de tan solo 0.2% en las bases del ADN (Vera y col., 2000). La combinación de PCR con endonucleasas permite inicialmente y con base en primers específicos, amplificar una región determinada del genoma del virus, la cual posteriormente es cortada con diferentes enzimas de restricción, metodología que se conoce como PCR-RFLPs, de gran importancia dentro de la clasificación molecular del virus (Nakamura y col, 2001)
- *Hibridación de los ácidos nucleicos:* Es una prueba molecular básica y muy sensible, que mediante el uso de sondas genómicas (copias de una de las bandas del ácido nucleico), puede identificar diferencias entre distintas cepas de virus o bacterias. Esta prueba consiste en transferir a un papel de nitrocelulosa el ácido nucleico; una vez realizada la transferencia se calienta el papel a alta temperatura con el fin de desnaturalizar el ácido nucleico, posteriormente se incuba con una sonda radiactiva preparada con un fragmento del genoma. La hibridación se visualiza por auto-radiografía; las sondas se preparan como ADNc construidas con base en secciones de ADN (cadena sencilla) o ARN con una apropiada polimerasa e incorporando bases nitrogenadas marcadas con  $^{32}\text{P}$  (citado por Vera y col., 2000). Dados los riesgos que conlleva el manejo de sustancias radioactivas, se emplean sondas frías que tienen el mismo principio ya mencionado pero que no utilizan radioactividad (David y col., 1994).

#### **4.9 Prevención, control y erradicación**

Los programas de erradicación sólo se pueden poner en marcha en las regiones donde la vacunación no es una práctica corriente, en especial en áreas de baja densidad de ganado. En contraste, en áreas de alta densidad con alta seroprevalencia y donde la vacunación ha sido y continuará siendo una práctica de amplia aplicación, sólo se podrá poner en acción programas de control que busquen minimizar las pérdidas económicas reduciendo el número de animales PI. En ambos casos se deberán emplear herramientas diagnósticas eficientes y de bajo costo. La posibilidad de éxito en los programas de erradicación y control, dependerán de la disponibilidad de métodos diagnósticos. La erradicación de vDVB a nivel de hato es posible, y manteniendo un hato cerrado, mejora sustancialmente su salud y productividad (Barrieto, 2004).

##### **4.9.1 Factores a considerar en un programa de erradicación para el vDVB.**

- 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 hatos, cual es el tipo de producción predominante (leche, carne u otros), densidad poblacional. Es importante conocer 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 hatos, participación de animales en exhibiciones (Rondón y col, 2001).
- Monitoreo de la prevalencia: Es importante para identificar hatos susceptibles y hatos infectados. Es importante dar a conocer datos serológicos, incidencia de enfermedad de las mucosas y resultados de investigaciones diagnosticas en hatos sospechosos. En hatos 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 hatos de carne la utilización de un test comercial es la forma principal de monitoreo serológico (Rondón y col, 2001)
- 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 (Vera y col 2006).

- Educación: Es importante educar a los propietarios y trabajadores con aspectos básicos de la enfermedad como signos clínicos, epidemiología, manejo del hato con énfasis en como evitar los posibles orígenes de infección (Barrientos y col, 2004).
- Bioseguridad: los hatos libres de vDVB son más susceptibles a una reinfección, si estos hatos 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 hato vecino infectado, contacto directo o indirecto con otros rumiantes infectados, ingreso de una hembra preñada al hato. Cada vez que ingrese un animal con un estado infeccioso desconocido para DVB debe guardar cuarentena, hasta que se verifique su condición de libre de vDVB. Otras rutas de reinfección son los fómites (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 (Vera y col, 2006).
- 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 hatos que están en mayor riesgo.
- Legislación: se debe regular el movimiento de animales posiblemente virémicos, persistentemente infectados, que son los principales diseminadores del virus (Vera y col, 2006).

**4.9.2 Erradicación sin vacunación:** Como producto de las limitantes que tiene el uso de vacunas para el control efectivo de la DVB, se han desarrollado programas sistemáticos para su erradicación, sin vacunación, ya que en poblaciones bovinas con alta prevalencia de la enfermedad, no es posible mantener un hato cerrado o con estrictas medidas de bioseguridad; las principales estrategias de control son:

- La identificación y separación de los hatos infectados y de los no infectado
- El monitoreo y certificación de los hatos no infectados
- La eliminación del virus de la DVB de los hatos infectados, lo cual se basa en la identificación y remoción de los bovinos PI.

Estos programas se han venido implementando en los países escandinavos. Suecia y Noruega comenzaron sus esfuerzos de erradicación en 1993, seguidos por Finlandia y

Dinamarca en 1994. En algunos países, el virus ha sido completamente erradicado y, en general, los resultados han sido bastante exitosos, lo que ha servido de ejemplo para que otros países de Europa, como Austria, Alemania, Italia y Holanda, hayan implementado programas de control/erradicación.

Finalmente, con base en las experiencias antes señaladas y tomando en consideración los mecanismos de difusión del virus de la DVB, la erradicación de este virus podría ser una alternativa factible para algunas fincas con hatos infectados y pérdidas de consideración, con la expectativa de que los beneficios posteriores compensarán los costos de su implementación (Vera y col, 2006)

**4.9.3 Erradicación con vacunación:** En poblaciones bovinas con alta prevalencia de la enfermedad, donde no es posible mantener un hato cerrado o con estrictas medidas de bioseguridad; las estrategias principales de control son:

- Identificación del hato con infección activa.
- Eliminación de animales PI.
- Programa de vacunación en vacas y terneras (La vacunación por si sola no elimina el virus del hato y su finalidad es proveer protección contra infecciones trasplacentarias que den origen a terneros PI).

Según Brownlie y col 2000, la experiencia que existe en los diferentes países demuestra que un programa de erradicación en áreas de alta prevalencia no puede ser seguro sin regulaciones oficiales que controlen las vías de transmisión y que coordine la erradicación en todos los hatos de una región, ya que la principal vía de reintroducción del virus a un hato libre es a través del contacto directo indirecto con hatos.

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 períodos 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 período de tiempo
- Vacuna de virus vivo modificado: Su uso en vacas preñadas está contraindicado por la capacidad que tiene para cruzar la placenta, provocando infección fetal ( 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.

#### **4.10 Control de la enfermedad**

**4.10.1 Control en el hato:** 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 hato 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 hato de por lo menos 2 años de antigüedad que considere al menos los siguientes puntos (Brownlie y col, 2000)

- Historia clínica del hato.
- Hato abierto vs hato cerrado (contacto con otras vacas en ferias, exposiciones, toro compartido o alquilado).
- Registro del hato: edad, raza, fertilidad, producción de leche, monta natural o inseminación artificial.
- Resultado de exámenes postmortem.
- Resultado de muestreos de leche a partir del estanque de almacenamiento para evaluar nivel de anticuerpos contra DVB.
- Resultado test serológico para DVB.

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

- Animales persistentemente infectados que ingresan al hato.
- Vaquilla y/o vaca portando un feto persistentemente infectado.
- Animal infectado agudamente que ingresa al hato 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 hato, identificar animales seropositivos y persistentemente infectados (Brownlie y col, 2000)

#### **4.11 Vacunas**

Las primeras vacunas comerciales aparecieron en el mercado en 1964, con base a un virus vivo modificado, indujeron una buena inmunidad celular y humoral. Este tipo de vacunas, que aún se utiliza, tienen como inconveniente la posibilidad de infectar los fetos e inducir la muerte fetal o la posibilidad de general animales PI. Como una alternativa para evitar los inconvenientes generados por las vacunas modificadas, están disponibles las vacunas inactivadas que tienen niveles de protección discutibles; últimamente se producen las vacunas recombinantes que emplean componentes

virales, por lo cual obvian las desventajas de las vacunas modificadas (Vera y col., 2006).

En Estados Unidos se encuentran más de 180 vacunas aprobadas desde 1964. Mientras que las vacunas son parte integral de los programas de control en Norte América, estas no han conferido una protección permanente; otro reto para el desarrollo de vacunas prospectivas y seguras es la amplia diversidad antigénica entre las cepas de campo o la supresión inmunitaria asociada al empleo de vacunas vivas modificadas (Van Oirschot y col., 1999, citado por Vera y col., 2006).

La DVB presenta genotipos y biotipos con diferencias antigénicas entre ellos, y por ser un virus ARN tiene alta capacidad de mutaciones; esta diversidad antigénica tiene importantes implicaciones para la inmunidad, ya que requiere una fuerte modulación de la protección cruzada; la inmunización implica que después de la vacunación el animal desarrolle una respuesta inmune protectora contra la invasión del patógeno (Gogorza y col 2001). Un apropiado protocolo de vacunación debe seleccionar el antígeno correcto, liberarse de manera óptima y en el tiempo correcto logrando una respuesta que pueda proteger al animal, en general, una respuesta inmune exitosa debe producir la misma respuesta humoral y celular que las resultantes de una infección natural, con mínimos efectos adversos para la salud del animal. El virus de la DVB presenta tropismo hacia células linfoides, pudiendo generar distintos grados de inmunosupresión, que pueden llegar a la tolerancia, impidiendo de esa manera que la inmunidad ejerza mecanismos efectores para su control (Gogorza y col., 2001)

Existen diferentes tipos y calidades (referido a eficacia y seguridad) de vacunas contra vDVB tanto en vías de desarrollo como disponibles en el mercado. Tanto las vacunas a virus vivo como a virus muerto son aplicables en el ámbito internacional; no obstante, en nuestro país sólo están autorizadas las vacunas inactivadas (Parra 1994).

**4.11.1 Vacunas tradicionales inactivadas:** Las vacunas preparadas con virus inactivado (muerto), pueden generar reacciones postvacunales adversas, pero la inmunidad producida es limitada en cuanto a calidad y tiempo. Las reacciones postvacunales adversas se correlacionan con la cepa vacunal y con las características del cultivo celular empleado para la replicación viral, Los signos más comunes son fiebre, depresión, anorexia y problemas respiratorios (Gogorza y col., 2001).

La mayoría de las vacunas inactivadas no proveen una adecuada protección fetal, reportándose un 25% de protección. Para superar este inconveniente se han empleado dos o tres dosis de una vacuna inactivada; con este esquema Brownlie y col., 1995 (Citado por Vera., 2006), lograron obtener un 60% de protección empleando un a cepa patogénica tipo I, luego de una descarga con una cepa de campo. Los animales no vacunados presentaron abortos y nacimientos PI.

Su principal ventaja es producir inmunización con mínimo riesgo de infección, ya que no son inmunosupresoras para el animal vacunado y no presentan riesgos de inducir infección al feto (Gogorza y col., 2001).

Estas vacunas tienen como desventaja que modulan una débil respuesta de anticuerpos neutralizantes y por lo tanto la duración de la protección es menor lo cual indica la necesidad de aumentar la frecuencia de administración. No logran evitar el pasaje del DBV de la madre al feto en cualquier período de la gestación, y tampoco estimulan la respuesta a células T citotóxicas.

En general se prefieren vacunas inactivadas para evitar los potenciales efectos inmunosupresores de las vacunas atenuadas. Estos efectos inmunosupresores en estadios fetales o perinatales podrían tener marcadas consecuencias adversas dado que el sistema inmune está aún en desarrollo y son períodos de alto riesgo para la exposición a patógenos causantes de neumonías o diarreas (Gogorza y col., 2001)

**4.11.2 Vacunas a virus vivo modificadas:** La inmunidad estimulada por este tipo de vacunas generalmente produce una mayor reacción cruzada que la inducida por las vacunas inactivadas, la cual es importante en la inmunidad contra el vDVB debido a la variabilidad antigénica entre los diferentes aislamientos. Este tipo de vacunas confieren protección contra infección fetal cuando se utilizan los tipos de VDB I y II (Baule y col., 2001). Para el control efectivo de la enfermedad es imperativo que la vacunación contra DVB produzca un alto nivel de protección tanto en la madre como en el feto contra los dos tipos de cepas (Baule y col, 2001).

Por ejemplo: en pruebas de inmunidad protectora cruzada con distintas vacunas, demostraron que las vacunas a virus vivo modificado indujeron mayor protección que las vacunas muertas, cuando los animales fueron desafiados con DVB de diferente tipo al que contenían las vacunas (Giraudó, 2000)

Las vacunas a virus vivo modificado tienen ventajas sobre las vacunas inactivadas: las primeras generalmente son administradas una sola vez, los costos son bajos, debido al pequeño número de partículas virales necesarias para la inmunización (Raymond 2002), otra ventaja que mostraron las vacunas vivas modificadas fueron la estimulación de mayor respuesta a anticuerpos neutralizantes, mayor duración del tiempo de protección, y menor requerimiento del número de dosis.

Como regla general, se considera que los anticuerpos neutralizantes son más eficientes en protección contra los biotipos citopáticos del vDVB (cuadros de enfermedad de las mucosas), mientras que los linfocitos T citotóxicos son eficaces para el control del DBV no citopáticos y para limitar cuadros inmunopatológicos que estos virus puedan causar (Gogorza y col., 2001). El mayor riesgo de las vacunas modificadas reside en la reversión de la virulencia, que puede presentarse en los

animales sometidos a factores estresantes, tales como destete o transporte. Asociados al uso de vacunas vivas modificadas, se han presentado cuadros de inmunosupresión, la potencial infección y la infección fetal por contaminación con DVB adventicio o por la potencial recuperación de la virulencia del virus vivo modificado (Gogorza y col., 2001), además, este tipo de vacunas pueden producir abortos, infección fetal inmunosupresión y signos respiratorios (Parra y col 1999) Otra desventaja puede presentarse en el uso durante la etapa perinatal, ya que los anticuerpos maternos inhiben la replicación del virus vivo modificado y por lo tanto ello reduce la respuesta inmune a la vacuna (Giraudó, 2000, Gogorza y col., 2001).

Se ha demostrado que el virus contenido en este tipo de vacunas vivas convencionales atraviesa la barrera placentaria como lo hacen los virus de campo e infectan los fetos con todas las consecuencias conocidas en las infecciones de campo. Además, el uso de vacunas con virus CP puede inducir la EM por una recombinación con un virus PI, por tanto, el empleo de las mismas es muy cuestionado y es materia de estudio permanente (Parra y col, 1999)

En la vacuna a virus vivo modificado Breed-Back FP 10™ ( Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc.) se ha evaluado su capacidad en la prevención de infección fetal, abortos y en el nacimiento de animales PI. Las novillas inmunizadas con la vacuna 4 a 8 semanas antes de la inseminación, no desarrollaron efectos adversos y seroconvirtieron 4 semanas después de la inmunización. Las novillas preñadas vacunadas no desarrollaron viremia mientras que los controles no vacunados desarrollaron 100% de viremia, abortos y muerte fetal en 86% (Kovacs y col., 2003, citado por Vera y col., 2006).

**4.11.3 Vacunas recombinantes:** Las vacunas recombinantes para DVB se han producido empleado varias metodologías, se utilizó virus de vacuna recombinante que expresa la proteína inmunogénica E2, estas proteínas tienen un papel principal en el anclaje y la entrada del virus; así como en la inducción de anticuerpos neutralizantes y en la protección contra la exposición al virus. El C-terminal de E2 incluye cerca de 30 aminoácidos hidrofóbicos que funcionan como un ancla transmembranal y como señal de translocación; por lo anterior se ha planteado que la proteína E2 permanece asociada a la membrana celular en las células infectadas con el virus. Bolin y Ridpath, 1996 (Citado por Vera y col., 2006) mostraron que la vacunación con una C-terminal E2 truncada, indujo títulos de anticuerpos neutralizantes respuestas proliferativas y una protección limitada luego de la exposición en vacas.

En la construcción y elaboración de vacunas recombinantes para DVB se debe tener presente que estos virus en su citopatogenicidad han mostrado asociación con la presencia de inserciones de secuencias celulares, la duplicación de secuencias virales

con o sin inserciones, deleciones y mutaciones puntuales en el genoma de las células citopáticas (Gogorza y col., 2001).

El estudio de los marcadores de citopatogenicidad en los genomas de vDVB se ha efectuado mediante la selección de diferentes formas del virus empleado en la vacunación mediante virus vivos atenuados y por análisis de la amplificación por la técnica de RT-PCR y la secuenciación. Balint y col., 2005 (citado por Vera y col., 2006), demostraron que existen inserciones en sitios específicos del genoma viral, especialmente uno que contiene homología con el gen que codifica para la proteína de unión 1 al interferón murino; además esta inserción afecta la expresión de la proteína viral induciendo su clivaje. Según este autor, lo anterior sugiere que hay partes del genoma viral que son puntos calientes para los eventos de recombinación en cepas NCP.

Las mutaciones en los elementos Cis dentro de la región no traducible (RNT) del vDVB, resultan en la generación de una serie de virus mutantes que exhiben un crecimiento alterado incluyendo también el fenotipo de las placas (Parra y col, 1994). El análisis de estos mutantes han mostrado que son genética y fenotípicamente estables. Se encontró que el empleo de los mutantes como inmunógenos, inducen títulos de anticuerpos neutralizantes que van de moderados a altos; previenen la viremia de una infección con cepas heterológica del virus. Lo anterior da la alternativa para el empleo de dichos mutantes (e.g. el 5'-RNT) como vacuna viva para el control de la enfermedad.

Según Balint y col., 2005, las vacunas de ADN tienen ventajas sobre las vacunas convencionales. Una es la facilidad para construir y modificar el plásmido vector, optimizar la codificación del gen antigénico escogido y poder alterar la localización subcelular. Por tanto, este tipo de vacunas pueden ser rápidamente modificadas para introducir secuencias de cepas de campo prevalentes (citado por Vera y col., 2006). Se ha demostrado que este tipo de vacunas administradas a neonatos, inducen una fuerte respuesta humoral y celular y no son afectadas por la presencia de anticuerpos maternos trasferidos pasivamente.

En la búsqueda de una mayor eficiencia se han diseñado variantes de vacunas de ADN. Liang y col., 2005 (citado por Vera y col., 2006), evaluaron una que codifica para varias versiones de E2, realizaron una deleción del ancla transmembranal y se adicionó una secuencia señal del *Herpesvirus bovinum-1*, para mejorar la secreción de E2 en el medio de cultivo. La vacunación de bovinos confirmó una mejor respuesta humoral, haciendo de esta estrategia una buena candidata para generar una vacuna ADN contra esta enfermedad en el futuro.

Liang y col., 2005 demostraron que la aplicación intradérmica e intramuscular de una vacuna ADN que codifica para E2, induce anticuerpos específicos en ratones Balb/c contra los virus NC y NCP, aunque no se ha visto su real eficacia en grandes animales, es el caso de vacunaciones con ADN E2 donde se producen respuestas inmunitarias moderadas con una protección parcial al desafío con el virus (Citado por Vera y col. 2006).

#### **4.12 Situación mundial de la Diarrea Viral Bovina**

**4.12.1 DVB en Colombia:** En Colombia, Vera y col., 1999, identificaron el biotipo NCP en el suero fetal bovino empleado en diferentes laboratorios de investigación del país, estableciendo que de 32 hatos analizados, 12 (25.8%) fueron positivos al biotipo NCP, mientras que en el mismo estudio evaluando 28 lotes de cultivos celulares (primarios y líneas) y de células del mieloma empleadas en la producción de anticuerpos mononucleares, 12 (42.8%) fueron positivos al biotipo NCP.

Con el objeto de optimizar la metodologías de los cultivos celulares para mejorar su utilización con respecto a la problemática de los contaminantes adventicios y latentes tanto en medicina veterinaria como humana, Ramírez y col., 1994, evaluaron los efectos producidos por un inactivante primario (BEI) aplicado en el suero bovino, el cual se suplementaron cultivos primarios de riñón fetal y células MDBK, concluyendo que el empleo de inactivantes químicos constituye una alternativa viable, para contribuir a la solución de los problemas causados por la contaminación de los sueros utilizados como suplemento en los cultivos celulares.

Mendigaña y col., 1994 (Citado por Vera y col., 1999 y Vera y col., 2006) realizaron el primer estudio comparativo encontrando diferencias entre las proteínas virales de cepas de campo tanto como biotipos CP y NCP aisladas en Colombia: este estudio permitió reportar una proteína 31-35 kDa en las cepas NCP de vDVB nacionales por técnicas de SDS-PAGE, inmunoperoxidasa e inmunoblotting.

Estudios realizados en la Sabana de Bogotá, sobre algunas enfermedades reproductivas en toros, se demostró que la DVB presentó el mayor porcentaje de reactores (83%) entre las enfermedades estudiadas (Vera y col., 2006). Estos resultados coincidieron con otros estudios realizados en el país, en los cuales la entidad mostró alta reactividad en la población estudiada (Rondón 2006).

Parra y col., 1994, realizaron un estudio prospectivo en fincas de la Sabana de Bogotá, evaluando la actividad serológica por grupos etarios, para varias entidades, entre ellas la DVB (Citado por Vera y col., 2006), este estudio señaló una respuesta serológica

activa al virus en los diferentes grupos. El de mayor actividad corresponde a las vacas, mientras que los títulos de las novillas estuvieron catalogados como medios y bajos, y los terneros como bajos. Según Parra 1994 el 44% de los animales muestreados (465/1048) presentó reactividad  $> 1:4$ , el 50% de las vacas tuvieron títulos con un rango promedio entre 1:64 a 1:512; en este grupo se ubicaron los títulos más altos de la población analizada (1:8192) (Citado por Vera, 2006). En este mismo año, Parra determinó que las tasas de seroconversión en fincas tuvieron un rango de 50-88% con una incidencia del 70 al 94%, identificando además, coinfecciones con otras entidades, como IBR, Leucosis Bovina y *L. hardjo*: lo cual incrementa el impacto económico negativo sobre la producción bovina, representado especialmente por un aumento en el número de días abiertos y servicios por concepción (Citado por Vera y col., 2006).

El estudio de Parra 1994 (Citado por Vera, 2006), es consistente en lo reportado en la literatura ya que en la respuesta observada, intervienen una serie de variables dependientes del agente, del medio ambiente propio de cada subregión, de las prácticas de manejo establecidas para cada hato y de las condiciones de la población afectada; las pérdidas en la producción debido a la infección con DVB, son resultados de la inmunosupresión, problemas reproductivos (repetición de servicios, abortos, momificación) y muerte por enfermedad de las mucosas (Bielefeldt 1995, Houe 1999). Jaime y col., 1996 (Citado por Vera y col., 2006), establecieron en el país metodologías para determinar la presencia de animales PI, mediante la identificación de bovinos negativos a seroneutralización o que tuvieran títulos  $< a \frac{1}{4}$  a los cuales se le hizo cultivos de células polimorfo nucleares y posterior detección del virus por inmunoperoxidasa indirecta, complementando el diagnóstico con ELISPOT, ELISA y Westernblot.

Burbano y col., 2002 (Citado por Vera y col., 2006), realizaron la normalización de la prueba de RT-PCR, para ser empleada como herramienta en la detección del virus. Los primers utilizados amplificaron un sector de 280 nucleótidos que se encuentran dentro del extremo 5'UTR del genoma viral. El protocolo establecido demostró un buen funcionamiento in vitro y es la base para posteriores pruebas de validación y evaluación de la prueba diagnóstica.

En Colombia, el diagnóstico de vDVB se ha realizado mediante seroneutralización, ELISA y pruebas inmunoenzimáticas, aunque, ya se han realizado estudios de normalización de RT-PCR (Burbano y col., 2002, citado por Vera y col., 2006), lo cual hará posible la realización de programas de control y prevención, eliminando animales PI, y la realización de futuras investigaciones en cuanto a genotipificación viral, que permitirá la caracterización molecular de las cepas colombianas.

**4.12.2 DVB en el mundo:** La DVB ha emergido como uno de los agentes infecciosos más importante en los bovinos. La naturaleza insidiosa de la DVB ha llevado a pérdidas económicas substanciales a la industria lechera y de carne ya que la infección por DVB se encuentra ampliamente diseminada a través del mundo, aunque el grado de difusión varía entre regiones y países, 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).

En Argentina los datos de seroprevalencia son variables. Según Lértora 2003, Kobrak y Werber (1997) informan que la situación en este país es similar a la del resto del mundo, con 70% de seroprevalencia y una prevalencia en bovinos PI del 1%, además se reportan seroprevalencia del 90,7% 48,6% en bovinos adultos en el sudeste de la provincia de Buenos Aires y en los llanos de la Rioja, respectivamente, porcentaje de bovinos seropositivos de 6 a 12 meses de edad fue de 41,9%, 25,6% y 46,6% para 11 distritos del sudeste de la provincia de Buenos Aires, 7 del sur de Corrientes y 9 de los llanos de La Rioja, respectivamente. Estos números indicarían la presencia de las enfermedades en este país, endémica en algunas regiones, que un porcentaje importante de bovinos jóvenes está siendo expuesto al virus. Sin embargo, surge el interrogante del grado de interferencia de los anticuerpos vacunales en la seroprevalencia. Otro dato, que no deja lugar a duda de la presencia de hatos con infección activa en la población bovina, es la elevada prevalencia de infección en los fetos.

Según investigaciones hechas por Larsson y col, 2005 en Venezuela, donde se colectaron muestras de 73 fincas ubicadas en los estados Zulia, Mérida, Falcón y Guárico. De estas fincas, 32 estaban constituidas exclusivamente por ganado nativo no vacunado y en 41 habían realizado importación de animales.

Larsson y col, llegaron a la conclusión que se presenta evidencia serológica que ha habido infección por el vDVB en algunos hatos de Venezuela, en este experimento se evidenció, en ganado nativo no vacunado 6 animales con altos niveles de anticuerpos neutralizantes. Por otra parte, 12 bovinos (67%) no presentaron anticuerpos neutralizantes, lo cual puede obedecer a que no habían tenido contacto con el virus, sin descartar la posibilidad de que algunos pudieran haber sido bovinos inmunotolerantes, ya que estos animales generalmente no desarrollan anticuerpos contra el vDVB y en caso contrario niveles bastante bajos.

Según este estudio, en fincas de ganado importado, se detectó por seroneutralización que el 96,2% de los bovinos tenían anticuerpos contra el vDVB, con títulos que varían

desde 1:128 hasta 1:4096 lo cual fue indicativo que dichos animales estaban inmunes contra el virus.

En Perú, estudios realizados por Rivera G y col en 2004 en donde se tomaron muestras de 268 bovinos de la Estación Experimental del Trópico del Centro de Investigaciones IVITA, se llegó a la conclusión que la DVB tiene una amplia distribución en los bovinos del país, con prevalencias que van de 0 a más del 90% (H. Rivera, comunicación personal); de allí que la ausencia de este patógeno en el hato de la EE del IVITA sugiere que no se han introducido bovinos infectados o que ha habido poco contacto de estos animales con otros rumiantes infectados, que es el modo usual de introducción del vDVB a un hato o una región. En poblaciones de animales susceptibles, el virus se transmite con eficiencia, sobre todo en hatos de crianza intensiva o durante la concentración del ganado para actividades sanitarias en caso de la crianza extensiva.

No existen datos de prevalencia de la DVB en bovinos del trópico y menos aún de Pucallpa. Si en algún momento la infección fue introducida a la zona, es posible que se haya auto limitado debido a la reducida población de animales y al tipo de crianza, minimizándose su transmisión. La ausencia del virus en el hato concuerda con la baja frecuencia de abortos o pérdidas embrionarias que se reportan, pero también constituye un riesgo de ingreso del agente si no se mantiene el hato cerrado.

Celdon y col en 1998 realizaron estudios en 34 predios en la región Metropolitana de Chile; de los 34 predios muestreados, en 22 se detectaron bovinos PI, lo que corresponde a una prevalencia predial de un 65%. De los 238 bovinos seleccionados en 97 se pudo detectar el vDVB en un primer muestreo, lo que corresponde a un 41% de positividad. Todos los sueros de estos animales presentaron títulos de anticuerpos neutralizantes menores que 8. En el segundo muestreo sólo se pudo ubicar a 59 animales, de los 97 virémicos al primer muestreo. La diferencia fue producto de muerte natural, sacrificio, venta o traslado de animales. Con las 59 muestras recuperadas en el segundo muestreo, en que 42 resultaron positivas al aislamiento viral y con títulos de anticuerpos seroneutralizantes menores que 8, se pudo establecer que existe un 18% de PI al DVB en predios sospechosos de poseer animales en esta condición en la Región Metropolitana. Con base en los antecedentes clínicos, recopilados en el momento de tomar la primera muestra, se pudo observar que de los 124 animales con antecedentes de signos clínicos, 36 (29%) resultaron positivos al aislamiento viral y 88 (71%) resultaron negativos; de los 74 animales con antecedentes de no mostrar signos clínicos de enfermedad 49 (66%) resultaron positivos al aislamiento y 25 (34%) negativos; y de los 40 animales en que se desconocían sus antecedentes clínicos, 12 (30%) resultaron positivos al aislamiento viral y 28 (70%) fueron negativos.

Según Gogorza 2001 en los países Nórdicos (Suecia, Noruega, Dinamarca y Finlandia) se creó un programa para la erradicación y control del vDVB que consiste:

- El primer paso consiste en un screening de todos los hatos bovinos, con el objetivo de identificar hatos libres de vDVB y maximizar las medidas para que aquellos que lo sean continúen así. Se toman muestras de leche a partir del estanco 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 DVB, utilizando un ELISA indirecto que indica el nivel de exposición del rebaño. En aquellos hatos con altos niveles de anticuerpos, se toman muestras de vacas y de terneros, si estos resultan con anticuerpos se considera al rebaño infectado y se prohíbe el movimiento de animales.
- El segundo paso es identificar hatos 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 a todos los individuos persistentemente infectados en hatos 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 DVB.

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 hatos bovinos, de leche y carne, los cuales son aproximadamente 15.000, con un tamaño promedio de 28 a 10 vacas, respectivamente (Gogorza, 2001)

A comienzos del año 2002 todos los hatos de carne y leche están bajo un programa de control para DVB, el porcentaje de hatos de carne y leche que han sido certificados como libres de vDVB 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 vDVB 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 hatos, 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 hatos permanecen con restricción de movimiento de sus animales (Gogorza, 2001).

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

Dinamarca posee aproximadamente 620.000 bovinos de leche y 130.000 bovinos de carne, agrupados en 9.000 y 13.000 hatos respectivamente. A comienzos del año 1994 se creó el programa de control y erradicación para DVB, el cual comenzó en forma voluntaria, pero desde 1996 se prohibió el transporte de animales potencialmente virémicos. En el año 1999, el 9% de los hatos lecheros y el 5% de los hatos de carne poseían animales P.I. A fines del año 2003 existen aproximadamente 400 hatos infectados con restricción de movimiento de sus animales (Gogorza, 2001).

En Finlandia DBV 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 hatos 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 hatos 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 (Gogorza, 2001).

En Alemania, debido a la elevada prevalencia de la infección (más del 80%) y alta densidad animal, la estrategia de control se basa en la identificación y remoción de bovinos PI, mediante la detección de antígeno en sangre por el método ELISA, y la vacunación sistemática de las hembras, además de medidas de higiene y muestreo de todo animal que ingrese al rebaño para prevenir la reintroducción del virus. Todavía no hay información sobre la eficacia de este programa de control. Sin embargo, surge la necesidad de promover mayor educación e información a productores y veterinarios, ya que muchos hatos no continúan con el programa luego del muestreo inicial y eliminación de los bovinos PI (Lértora 2003).

## 5. RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA (IBR)

### 5.1 Historia

La Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) también conocida como nariz roja , lloriqueo de los terneros, vaginitis vesicular, exantema coital; esta es una enfermedad altamente contagiosa causada por un herpes virus que se manifiesta clínicamente de diferentes maneras (Ruiz 1977, Blood y Radostits, 1992).

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1841 por Rychner (veterinario suizo), quien observó los signos clínicos de la vulvovaginitis pustular infecciosa y evidenció su característica de transmisión venérea. Para el año de 1928 Reisinger y Reinman comienzan a investigar la naturaleza del virus y la transmisión del mismo. Posteriormente, a mediados de los años 50, se presentó en los Estados Unidos un brote de una enfermedad respiratoria aguda en el ganado, de la cual se aisló un virus que presentó características de un herpes; en 1953 se empezaron a presentar brotes en lotes de engorde y en hatos lecheros en California y se distribuyó en varios estados; a su vez en Europa el primer caso de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina fue reportado en Alemania en 1960 y posteriormente en otros países europeos (Miller y col, 1991; Gibbs y Rweyemamu, 1977).

Hasta la década de los 60 se pensó que los países de Suramérica estaban libres de IBR, pero durante este período, se realizó un aislamiento en bovinos importados al Perú desde Norteamérica (Zapata y col, 2002). Al comparar este aislamiento con el asociado a las formas genitales se halló que las dos cepas eran indistinguibles (Fenner y col, 1992).

En centros de inseminación artificial (IA) han sido descritos brotes de la enfermedad por Huck en 1961. Saxegaard y col, en 1966, (citado por Vera 2006), realizaron aislamientos de este agente de toros clínicamente sanos. Sprabdrow, en 1968 recuperó el virus de pajillas de semen congeladas (Gibbs y Rweyemamu, 1977).

En Colombia a finales de la década de los 60, se encontraron signos compatibles con IBR tales como abortos tempranos; sin embargo, entre los productores se tenía la creencia que el diagnóstico de preñez por medio de la palpación rectal producía aborto, pudiendo de esta manera pasar así la enfermedad inadvertida en algunas explotaciones (Vera y col, 2006).

La enfermedad fue descrita por primera vez en Colombia, por investigadores de la sección de salud animal del Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, luego de estudios tendientes a determinar las causas de problemas reproductivos en bovinos de los llanos Orientales. Este diagnóstico se realizó en 1972, a partir de un toro Cebú que presentaba lesiones genitales (lesiones granulares, ulcerativas o postulares) y del cual se obtuvieron tres aislamientos (Zuluaga, 1979).

En 1973 el agente se aisló en la Sabana de Bogotá, de ganado lechero el cual presentaba la sintomatología tanto respiratoria como genital (Villate y col, 1973), siendo ampliamente reconocida la asociación entre IBR, la vulvovaginitis pustular y el aborto.

En 1974 Villate y col, también realizaron aislamiento de BHV-1, y lograron además reproducir la enfermedad experimentalmente en vacas preñadas. En este mismo año Aycardy y co 1974, realizaron el primer trabajo para evaluar la prevalencia de la enfermedad en ganado de carne de varios departamentos del país, mediante la técnica de hemoaglutinación pasiva, reportando varios casos de prevalencia de IBR en las cuatro zonas estudiadas.

Dentro de los trabajos de evaluación epidemiológica para IBR, se encuentran los realizados por Griffiths y col (1982), quienes reportaron prevalencias de 21.5% en la región andina, 20.6% en el piedemonte llanero y de 51.7% en la región Caribe.

En un estudio realizado en los departamentos de Córdoba y Sucre, entre los años 1980 y 1984 se encontró una prevalencia de 29.6% en muestras de sueros provenientes de 2295 bovinos (Otte y col, 1985).

En la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, se han realizado algunos trabajos de investigación en IBR, en 1991 Góngora y col lograron aislar una cepa de BHV-1 a partir de esmegma prepucial de un toro seropositivo, el cual fue inmunodeprimido con dexametasona.

En 1992 López y Ramírez, realizaron pruebas serológicas en los hatos de la Universidad Nacional de Colombia (Marengo y Ciudad Universitaria), con el fin de establecer la situación de IBR en dichos hatos y realizar intento de aislamiento del BHV-1. El estudio arrojó como resultado una reactividad de 39.13% en el primero de tres muestreos y de 75% en el último de ellos en el hato de la Ciudad Universitaria, logrando aislar de este hato el virus a partir de un toro inmunodeprimido. En contraste

con el hato de Marengo no se obtuvo ningún animal positivo en los dos muestreos llevados a cabo.

Cotrino en 1997 realizó una recopilación de serologías para IBR en el país; en este trabajo se analizaron 4230 muestras de animales con destino a un programa de transferencia de embriones y de animales con problemas reproductivos provenientes de 263 fincas de 11 zonas del país. Debido a que la mayoría de las muestras provenían de animales con problemas reproductivos, la recopilación no es representativa, pero si es una guía en cuanto al estado de IBR en el país.

En este mismo estudio (Cotrino, 1997) encontró que el 37.4% de los animales fueron positivos a IBR por la prueba de ELISA, teniendo como hallazgo importante el hecho de que más del 60% de los machos incluidos fueron positivos, lo cual es importante para dar una explicación epidemiológica de la diseminación de la enfermedad. Este estudio además arrojó como resultado una positividad de 58.8% de los hatos evaluados, con mayor número de incidencia en hatos de carne que en los de leche; este porcentaje de positividad es muy alto y convierte al IBR en un diagnóstico diferencial importante a tener en cuenta en los hatos que presentan problemas reproductivos, en especial en las explotaciones de carne del país. Cabe destacar que las zonas con más alto índice de positividad encontradas en el estudio fueron las de Santander-Cesar (72.2%) y el Alto Magdalena (58.4%).

Otte y col, (1995) encontraron una positividad a IBR del 10%, en muestras procedentes de vacas en nueve fincas de los llanos orientales, encontrando animales positivos en seis de las nueve fincas, por su parte, Sierra (1998) realizó un estudio de IBR en la zona de cobertura del Centro de Diagnóstico de Aguachica (Cesar), donde se encontraron 156 animales positivos (61%) de 256 animales muestreados; adicionalmente en dos fincas se reportaron manifestaciones clínicas y lesiones que se podrían correlacionar con la forma respiratoria de IBR.

Los últimos estudios realizados en nuestro país, se han llevado a cabo en la zona norte, más específicamente en el municipio de Montería (Córdoba) donde los resultados mostraron una seroprevalencia del 74.7% para IBR no encontrándose diferencias significativas entre las variables del estudio (Betancur y col, 2006).

En la actualidad esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida, siendo diagnosticada en Canadá, Estados Unidos, México, Inglaterra, Australia, Tanzania, Japón y en algunos países de América del Sur (Betancur y col, 2006).

## **5.2 Agente Etiológico**

**5.2.1 Taxonomía y estructura:** Los herpesvirus son virus que poseen un ADN lineal de doble banda, con una cápside icosaédrica de 100 a 110 nm de diámetro, dentro

de una cubierta lipídica; tiene un ADN lo suficientemente largo para codificar de 80 a 100 proteínas, de las cuales tan solo 50 han sido reconocidas, 30 de las cuales son proteínas estructurales, mientras que las otras son enzimas inducidas por el virus que incluyen tiamidina kinasa, ADN polimerasa y ADNasa. El prototipo de estos virus es el Herpes Simplex (Vera y col, 2000.).

Los herpes virus tienen la capacidad de producir infecciones latentes. Las infecciones latentes pueden permanecer en el huésped a lo largo de la vida, incluso presentar niveles de anticuerpos circulantes (Vera y col, 2000)

Se han reportado asociaciones del herpesvirus Epstein-Barr con el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo; del herpes genital (herpes 2 humano) con cáncer de la cerviz uterino y de la vulva (Vera y col, 2000.).

De acuerdo con el ciclo reproductivo, la citopatología y las características de la infección latente se han establecido las siguientes subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*, siendo los géneros el reflejo de las verdaderas relaciones filogenéticas, basándose en la estructura del genoma, en las relaciones serológicas y en la homología de la secuencia de nucleótidos (Vera y col, 2000.)

- *Alphaherpesvirinae*: Están caracterizados por el amplio rango de huéspedes, su corto período de replicación y la rápida difusión que tienen en los cultivos celulares. Existen los siguientes géneros en la subfamilia: *Simplexvirus* y *Varicellovirus*, en los cuales se ubican las siguientes especies: Herpes humano (HV) 1, HVs bovino 1, 2 y 4 (Rinotraqueitis bovina infecciosa, mamilitis bovina y virus huérfano bovino), HV porcino (virus de la seudorrabia), HV felino (virus de la Rinotraqueitis felina), HV canino (virus de la tos de las perreras), HV 1 de las aves (laringotraqueitis infecciosa) (Vera y col, 2000).
- *Betaherpesvirinae*: Son virus citomegálicos y de lento crecimiento, se caracterizan por estrecho rango de huéspedes, tiene un relativo ciclo de replicación largo y un lento y progresivo efecto citopático en los cultivos celulares. Las células infectadas llegan a ser mas grandes (citomegálicas), tanto en cultivo como en los huéspedes naturales.  
Los géneros incluyen: *Citomegalovirus* que afecta el hombre, siendo la especie tipo el Herpes virus humano 5; el genero *Murimegalovirus* que son megalovirus del ratón tipo 1 y el *Roseolovirus* con la especie tipo: herpesvirus 6 humano que afecta linfocitos B y T (Vera y col, 2000.)
- *Gammaherpesvirinae*: Los virus de esta subfamilia se replican en células linfoblastoides y pueden también afectar células epiteliales y fibroblastoides, siendo específicos de linfocitos B y T. Los géneros de esta familia son:

*Linfocriptovirus* que incluyen el Epstein-Barr humano (herpes humano 4) así como virus similares al Epstein-Barr que afectan al chimpancé y al mandril, *Tetallinfocriptovirus* que ocasionan la enfermedad de Marek (gallid herpesvirus 2) y el género *Rhadinovirus*. (Vera y col, 2000.)

El Herpesvirus cuenta con una escasa resistencia fuera del organismo animal hospedador, es importante excluir la difusión inmediata del virus, que muestra una acusada sensibilidad a la formalina al 5 %, lejía al 0.5 %, ácido peracético al 0.5 %, así como a los disolventes de las grasa (éter, cloroformo, acetona) (Alvarado y col, 1993).

**5.2.2 Clasificación:** *Herpesvirus bovino tipo 1*, también conocido como virus del complejo Rinotraqueitis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus*. Ha sido clasificado en dos subtipos: HVB-1.1 y HVB-1.2, a su vez el HVB-1.2 se divide en HVB-1.2<sup>a</sup> y HVB-1.2<sup>b</sup>, mediante el uso de electroforesis de proteínas virales en geles de poliacrilamida, el uso de paneles de anticuerpos monoclonales y el análisis de las diferencias del ácido nucleico viral detectadas por la digestión con enzimas de restricción o por amplificación diferencial en el ensayo de PCR El subtipo 1.1 se asocia con la forma respiratoria de la enfermedad, IBR, mientras que el subtipo 1.2 se asocia tanto con esta enfermedad respiratoria como con las genitales, IPV/IPB (Ackermann, 1990).

Ellos difieren en los epítopes de la glicoproteína C (gC), lo cual puede alterar la adhesión viral e influir en las diferentes virulencias que presentan (Ackermann, 1990). Las cepas del subtipo HVB-1.1 son las más virulentas y causan las enfermedades de mayor severidad asociadas a las infecciones con HVB-1. Este subtipo es excretado en altos títulos en secreciones nasales y diseminado más efectivamente que el 1.2 (Ruiz, 1977).

**5.2.3 Características biológicas:** Los herpesvirus son virus envueltos, tienen un diámetro de 150-200 nm, ADN doble cadena lineal y una cápside con isometría icosaédrica de alrededor de 100 nm de diámetro compuesta de 162 capsómeros (150 hexámeros y 12 pentámeros). La cápside está rodeada por una capa de material globular, conocido como tegumento, y alrededor de él, una envoltura que contiene las espículas de glicoproteínas virales en su superficie (Murphy y col., 1999).

Los *alphaherpesvirus* presentan un rango amplio de posibles hospederos y alta capacidad para establecer infecciones latentes. El ciclo reproductivo es relativamente corto, y crecen fácilmente en cultivos celulares (Roizman y Pellett, 2001; Jones, 2003). La multiplicación de HVB-1 en células de origen bovino, produce efecto citopático que se caracteriza por la formación de cuerpos de inclusión intranucleares llamados “de

Cowdry” al inicio de la infección y posterior redondeamiento de las células las cuales forman como “racimos de uva”, hasta la total destrucción de la monocapa (Lesko y col., 1993; Suresh y col., 1993).

Otras de las características biológicas del virus son la formación de placas de 1-2 mm en monocapas de células de riñón y de testículos bovinos, la sensibilidad al éter, al calor y a la tripsina (Noda y Barrera, 1985 y 1986). Es estable a pH 7 o ligeramente superior y no resiste la desecación (Griffin y col., 1958;; Rouhander y col., 1967 y Bartha y col., 1969, citados por Barrera, 1996).

**5.2.4 Genoma:** El virión del BHV-1 contiene un genoma ADN de doble banda de aproximadamente 135000-140000 pares de bases, medidas por mapeo por restricción de endonucleasas. Dicho genoma está dividido en dos segmentos, uno largo (UL) de 102-104 kpb y uno corto (Us) de 10.5-11 kpb (ambas longitudes de segmentos medidas por microscopia electrónica); estos dos segmentos están separados por una sección interna repetida y flanqueada por regiones repetidas invertidas de cerca de 24 kpb (Andino y col, 1987; Rodas y col, 1996).

El genoma del BHV-1 puede codificar un número aproximado de 70 proteínas, de las cuales solo cerca de 54 se han logrado identificar en la infección productiva (Rodas y col, 1996). De las proteínas virales identificadas hasta el momento se han clasificado 15 no estructurales y 33 estructurales, de las cuales 13 están involucradas en la envoltura viral, 14 en la nucleocápside y 6 cuya función no se ha establecido (Rodas y col, 1996).

**5.2.5 Glicoproteínas (GP):** El genoma del BHV-1 tiene la capacidad de codificar varias proteínas distintas, con pesos moleculares que van desde los 42 hasta los 180 Kda. Las principales glicoproteínas codificadas son: I, II, III, IV, 42 y 93; las otras identificadas hasta ahora son la E, G y la I del virus herpes simples-1 (HSV-1). De acuerdo a mapeos genéticos realizados se ha encontrado similitud entre glicoproteínas del BHV-1 y el HSV-1, por lo cual se ha propuesto un cambio de nomenclatura de las glicoproteínas del HVB-1 para equipararlas con el VHS-1 (Babiuk y col, 1987; Rodas y col, 1996).

**5.2.6 Tiamidina Kinasa (TK):** Esta enzima es muy importante en cuanto a la capacidad patógena del virus, por lo cual es objeto de estudio en la generación de terapias antivirales; se ha descubierto que mutaciones del gen que codifica esta enzima en el HSV-1, produce una disminución en su virulencia, con base en este hallazgo Miller y col, (1991), realizaron un estudio en el cual expusieron por vía intravenosa a un grupo de hembras bovinas gestantes, a un BHV-1 mutante con delección del gen que codifica para la TK; y a otro grupo le inocularon un BHV-1 normal, encontrando que en el primer grupo ninguno de los animales aborto,

comparado con el segundo grupo en el cual se presentó un 83% de abortos; demostrando de esta manera que la TK regula la virulencia del BHV, en especial para su acción abortiva. Este hallazgo es importante para la producción de vacunas que no induzcan abortos en animales gestantes (Aycardy y col, 1976)

Otras enzimas importantes codificadas por el BHV-1 son la deoxiuridina trifosfatasa (dUTPasa), la ribonucleótido reductasa (RR) y la ADN polimerasa, las cuales participan en la replicación viral (Rodas y col, 1996).

### **5.3 Transmisión de la enfermedad**

**5.3.1 Entrada y diseminación:** Las vías potenciales para el ingreso del virus son la cavidad nasal, orofaríngea, ocular y tracto genital (Blood y Radostits, 1992; Ruiz, 1977).

El paso del BHV-1 de una población a otra y el ingreso a territorios y países libres se produce casi exclusivamente a través de animales con la infección latente y, en ciertas circunstancias, mediante semen contaminado por el virus (Aycardy 1976).

La forma de contagio más importante de la infección genital está dada por el toro, ya que el virus tiene receptores en el tracto genital de la vaca facilitando la infección para la presentación de la vulvovaginitis pustular infecciosa (Ruiz, 1977), otro factor importante para la infección genital son los golpes dados con la cola y las manipulaciones de los animales, no debe excluirse la diseminación del virus por insectos (Thrusfield, 1990).

El BHV-1 se transmite en forma directa por aerosoles o por contacto con animales infectados, a partir de secreciones respiratorias, oculares y del tracto reproductivo, o puede ser transmitido por el semen, durante la monta natural o inseminación artificial (Wiedmann, 1993; Van Oirshot, 1995) e incluso durante la transferencia de embriones (Ríos y col, 2000) o en forma indirecta a través de personas y equipos, sobrecargas extremas por transporte pueden provocar la activación de la infección latente, la producción y excreción del virus y, en casos especiales, manifestaciones clínicas (Jubb, 1993).

El semen contaminado por BHV-1 puede venir de individuos clínicamente sanos. En Argentina se realizó un estudio sobre la presencia del BHV-1 en semen congelado, el cual es comercializado en ese país y se detectó la presencia del virus en 17.5 % de las muestras analizadas (Golan, 1990).

Una hembra infectada, introducida al hato puede ser factor desencadenante de la enfermedad, ya que puede infectar al toro y por ende a otras vacas (Ruiz, 1977).

El IBR en la forma respiratoria se presenta con mayor frecuencia en las fincas donde hay alta concentración de animales, en las cuales la enfermedad se disemina rápidamente, principalmente en el grupo de terneros menores de 8 meses de edad (Ruiz, 1977). Se ha demostrado la presencia del virus de IBR en cerdos aparentemente sanos los cuales podrían transmitir la infección a los bovinos si se establece convivencia entre ellos (Ruiz, 1977), aunque no se conoce realmente las implicaciones epidemiológicas que puedan tener la presencia del virus en cerdos (Vera, 2006).

**5.3.2 Latencia:** El estado de latencia es aquel donde el virus permanece viable pero no activo en el animal huésped, con períodos de reactivación y reexcreción, y el cual no se puede detectar por procedimientos virológicos convencionales. Posterior a la replicación inicial en el sitio de la infección, el virus entra al sistema nervioso y va por vía axonal centrípeta a localizarse en ganglios nerviosos; en el trigémino en infecciones respiratorias y en cordones sacro espinales y ciático en infecciones genitales (Góngora y col, 1991; Rodas, 1996).

Como otros miembros de la subfamilia de *Alphaherpesvirinae*, el BHV-1 puede establecer infecciones latentes en neuronas de ganglios sensoriales, principalmente en el ganglio trigémino, tonsilas y en ganglio sacro en caso de infecciones en los genitales (Blaha, 1995), este es uno de los mayores problemas para el control de la infección del BHV-1 por la capacidad del virus de permanecer en estado latente y persistir por largos períodos de tiempo reactivándose periódicamente, como consecuencia de eventos estresantes o por tratamiento con corticoides (Whetstone y col, 1989).

El ADN viral puede persistir en estado de latencia de por vida en un hospedero infectado o puede reactivarse y diseminarse a animales susceptibles (Blaha, 1995).

Los mecanismos involucrados en el fenómeno de latencia no están del todo esclarecidos. Se han sugerido varios factores que intervienen en el proceso, dentro de los cuales hay factores asociados al virus y factores asociados al huésped. (Blaha 1995).

Dentro de los factores asociados al virus, se encontró recientemente en bovinos infectados latentemente con BHV-1, una región del genoma transcripcionalmente activa durante la latencia, llamada "gen relacionado con latencia" (LR), que podría controlar la expresión de un gen que codifica proteínas inmediatas tempranas (IE), favoreciendo este proceso; además se ha demostrado que las proteínas producto de los LR favorecen la persistencia del virus en neuronas infectadas. Se ha postulado que algunas proteínas requeridas para la transcripción de los genes no se encuentran en

células que no se dividen como las neuronas, favoreciendo también el proceso de latencia (Brown y col, 1988).

En cuanto a los factores asociados al huésped está incluido el factor de crecimiento neuronal (NGF), el cual es un péptido con acciones inmunes y endocrinas, que al ser bloqueados induce la reactivación del BHV-1 en cultivos neuronales infectados latentemente (Schang y col, 1996; Rodas y col, 1996; Wilcox y Jonson, 1987); también se ha descubierto mediante la hibridización *in situ*, la presencia de transcritos asociados a la latencia (lat's) en ganglios nerviosos en humanos seropositivos latentemente infectados con HSV-1. Los lat's podrían bloquear genes codificadores de la transcripción inmediata temprana, que impedirían la expresión de genes del ciclo lítico, interviniendo en esta forma en el proceso de latencia (Rodas y col, 1996).

Aunque se desconoce el mecanismo de reactivación viral, al parecer está relacionado con eventos estresantes como transporte, hacinamiento, cambios climáticos, cambios de hormonas durante la gestación, súperinfección con otros virus como PI-3. Además se ha demostrado que animales tratados con corticosteroides, pueden demostrar reactivación viral, quizás asociada a un fenómeno de inmunosupresión causada por ese tipo de medicamentos, lo cual ha sido comprobado en diversos estudios en nuestro medio (Homann y col, 1983; Góngora y col, 1991; López y Ramírez, 1992).

Homann y Eastaday (1983), inocularon el virus en terneros esperando que se produjeran una infección latente de BHV-1 y lograron su posterior reactivación a través de la aplicación de corticoide (dexametasona); encontrando la presencia de ADN viral intranuclear en neuronas ganglionares a través de hibridización *in situ* y evidenciaron la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares en neuronas del ganglio trigémino. Los animales con infecciones latentes pueden permanecer así por mucho tiempo y no necesariamente ser eliminadores del virus, pero en situaciones de estrés este se puede activar dando origen a nuevas infecciones o al recrudecimiento de signos clínicos (Ruiz, 1977; Blood and Radostits, 1992).

#### **5.4 Epidemiología**

La distribución geográfica del vIBR es mundial, se ha descrito la presencia de BHV-1 en varios países de los cinco continentes con distintos grados de prevalencia; todas las razas son susceptibles a la enfermedad, aunque se presenta con mayor frecuencia en animales mayores de seis meses de edad, esto en razón de que los niveles de anticuerpos maternos duran de uno a seis meses. Se ha reportado que la morbilidad en ganado de leche es del 6% y la mortalidad del 3%, en comparación con el ganado de carne en el cual la morbilidad puede alcanzar el 20-30% (Blood y Radostits, 1992; Gibbs y Rweyemamu, 1977).

No se registra variación estacional de frecuencia, si se exceptúa la observada en bovinos de campos de engorde en el otoño en donde se concentran gran número de animales susceptibles (Blood and Radostits, 1992); en hatos de engorde del norte de Australia, hasta 96% de los toros y 52% de las vacas eran positivos a las pruebas serológicas de la infección y posiblemente la modalidad venerea ya que la respiratoria era poco frecuente (Blood and Radostits, 1992).

En Colombia se han realizado varios estudios serológicos, aunque no se tienen muchos trabajos de correlación entre prevalencia de la enfermedad y presentación clínica (Bosch y col, 1997)

Aunque rara vez se ha reportado la enfermedad, se puede presentar muy esporádicamente en cerdos tanto, en la forma respiratoria como en la forma genital. También se han descrito niveles de anticuerpos en venados, mamíferos silvestres y búfalos; en estos últimos se han reportado prevalencias del 52.5% en una zona ganadera de la india (Blood y Radostits 1992; Renukaradhya y col, 1996).

### **5.5 Patogénesis**

En la enfermedad respiratoria, el virus se localiza en células epiteliales y agregados linfoides de cavidades nasales y vías aéreas superiores, se multiplica en células epiteliales, células de submucosa y tejido conectivo; el efecto viral causa pérdida de cilios, hipertrofia epitelial e infiltración de neutrofilos; posterior a esta replicación inicial hay una viremia corta (Arboleda y col, 1996; Blood and Radostits, 1992; Molano y Rodríguez, 1995).

Además causa un efecto inmunodresor sobre los macrófagos alveolares. El BHV-1 causa una broncoconstricción excesiva por modulación farmacológica del músculo liso, favoreciendo de esta manera el acumulo de secreciones en vías aéreas inferiores, predisponiendo a el animal a la presentación de infecciones bacterianas secundarias, en especial por *Pasteurella*, que junto a virus como el de PI-3 y el mismo BHV-1, están comprometidos en la fisiopatología del complejo respiratorio bovino (Arboleda y col, 1996; Conlon, 1987; Molano y Rodríguez, 1995).

Pueden ocurrir infecciones del tracto respiratorio superior o del tracto genital, debido a que la respuesta inmune es eficiente, estas infecciones son usualmente autolimitantes y la infección del animal dura 1 a 2 semanas (Blood y Radostits, 1992; Ruiz, 1977).

La forma conjuntival se origina posiblemente por migración del virus desde la cavidad nasal, a través de los conductos nasolagrimales hasta alcanzar los tejidos oculares (Mckercher y col, 1963).

A partir de la mucosa nasal, el virus puede colonizar las células de las terminaciones nerviosas y recorrer de forma centrípeta el sistema nervioso. En inoculaciones

intranasales experimentales, el virus puede ser aislado del ganglio trigémino al cuarto día post inoculación, al quinto día alcanza el tallo cerebral y al día 11 se puede aislar de la corteza cerebral, causando encefalitis no supurativa (Blood and Radostits, 1992; George, 1991; Van Dokersgoed and Babiuk, 1991).

Después de la infección primaria el BHV-1 puede infectar monocitos con moderada replicación viral y también puede infectar macrófagos y linfocitos los cuales pueden servir de vehículo hacia diferentes tejidos en el animal. El virus puede causar una invasión sistémica al ser transportado por monocitos y leucocitos periféricos, logrando alcanzar la placenta y el feto, produciendo aborto, pero se observa principalmente en el último tercio de la gestación. Se ha demostrado el efecto de la alta mortalidad embrionaria del virus; cuando se expone la vaca en los primeros 7 días post servicios al BHV-1 este pasa a través del epitelio uterino, infecta las membranas embrionarias y causa la muerte del embrión; la cual puede pasar desapercibida o puede generar un ciclo estral prolongado (Blood and Radostits; 1992; Góngora, 1992).

El BHV-1 inoculado experimentalmente (para simular el efecto de semen contaminado) en el útero, causa una endometritis necrotizante local severa, la cual se resuelve entre una y dos semanas post infección; lo que demuestra la infertilidad temporal que puede causar un semen contaminado con el virus. Posteriormente a la recuperación uterina no se vuelven a presentar lesiones herpéticas, sugiriendo de esta manera que el BHV-1 no es responsable de falla gestacional repetida en el ganado (Blood and Radostits, 1992; Miller, 1991a, b).

A nivel ovárico se ha demostrado un efecto patológico causado por el virus, caracterizado por ooforitis necrotizante y lesión sobre el cuerpo lúteo, siendo este último muy susceptible al virus, en especial en los primeros tres días de ovulación, período en el cual se comienza a formar esta estructura ovárica. Esta acción puede alterar el ciclo estral, generando ciclos alargados (Miller, 1991a; Smith y *col*, 1990).

Para establecer plenamente la importancia de la detección del virus de la IBR, es fundamental conocer las interrelaciones del virus con las células del sistema inmune, por lo cual se hará a continuación una breve descripción de estas se debe tener en cuenta que la respuesta inmune se ven involucrados mecanismos inespecíficos y específicos los cuales buscan el control del agente.

#### **5.5.1 Respuesta inmune inespecífica:**

- Macrófagos: Interactúan con el BHV-1 de manera temprana en el proceso infeccioso, siendo un importante componente en la línea de defensa, a través del proceso de fagocitosis, destrucción del virus y células infectadas, además de la producción de IFN (Forman y *col*, 1982).

Se han comprobado varios efectos del virus de la Rinotraqueitis infecciosa bovina sobre los macrófagos; especialmente sobre los macrófagos con receptores Fc y C3b (Brown and Ananaba, 1988). Aunque los macrófagos de animales infectados con el virus pueden producir interferón  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ) para funcionar activamente y pueden desempeñarse como células citotóxicas, existe controversia respecto al efecto del BHV-1 sobre dichas células, ya que en estudios *in Vitro* se ha limitado la capacidad de producir el factor de necrosis tumoral (FNT) (Brown and Ananaba, 1988; Forman y col, 1982; Rodas y col, 1996).

Además se ha demostrado que los macrófagos obtenidos de animales inoculados con el virus aunque son hábiles en la eliminación de cualquier bacteria disminuyen su capacidad de fagocitosis y junto con la alteración de los mecanismos de broncodilatación por efecto del virus se favorece la presentación de infecciones bacterianas secundarias, mecanismos por el cual el BHV-1 podría estar involucrado junto con la *Pasteurella* en la patogénesis de la fiebre de embarque (Brown y Ananaba, 1988; Conlon y col, 1987; Gibbs y Rweyemamu, 1977).

- Interferón alfa (IFN  $\alpha$ ): Su producción es atribuida a leucocitos incluyendo células NK y células efectoras de la citotoxicidad medida por anticuerpos (ADCC). Se detectan los primeros niveles de INF en secreciones nasales a las 5 horas post infección, alcanzando su pico de producción a las 72-96 horas post infección, lográndose mantener por cerca de una semana (Gibbs y Rweyemamu, 1977; Rodas y col, 1996).

El IFN interviene en varios procesos de la respuesta inmunológica:

- Inicia la maduración de las células precursoras NK a células activas.
  - Modula la migración leucocitaria y la fagocitosis.
  - Aumento la actividad de las células NK y hace más resistentes a los macrófagos a la infección por el BHV-1 (Babiuk y col, 1985).
- Polimorfo nucleares neutrofilos (PMN): Los PMN son mediadores del ADCC y junto con los anticuerpos eliminan efectivamente las células infectadas con el virus. La interacción del BHV-1 con los PMN causan dos efectos principales: el primero es la producción de una sustancia antiviral llamada "poliferon" que puede inhibir la replicación viral, esta producción es estimulada por las glicoproteínas GpI y GpIV (Rodas y col, 1996).

El segundo es la reducción de las funciones antibacterianas de los PMN, por una disminución en la capacidad quimotáctica y fagocítica; lo cual ha sido demostrado experimentalmente por infecciones con BHV-1, observándose una disminución en la infiltración de los PMN hacia el pulmón, en una infección

secundaria por *Pasteurella haemolytica*, debido a una alteración de las células endoteliales; con una consecuente disminución en la capacidad de eliminar dicha bacteria (Rodas y col, 1996; Warren y col, 1996).

- Células NK: Estas son células anticuerpo independiente y su actividad puede aumentar por la acción del IFN, la citotoxicidad de estas células parece depender de la expresión de glicoproteínas virales; llegándose a demostrar en algunos estudios que las células NK son capaces de eliminar células transfectadas con Gpl y GpIV aunque no con células transfectadas con GpIII (Palmer y col, 1990).

### 5.5.2 Respuesta inmune específica:

- Linfocitos B: Los primeros anticuerpos en aparecer son la IgM y la IgG, que aparecen entre los 8 a 12 días post infección, y las células necesitan unirse al sistema de complemento para realizar la neutralización viral. Los terneros neonatos obtienen anticuerpos neutralizantes por el calostro materno, especialmente IgG, los cuales pueden permanecer por períodos de 4 a 6 semanas dependiendo de la cantidad de calostro, título de anticuerpos y eficiencia en la absorción intestinal. Se ha reportado que en animales infectados los anticuerpos pueden llegar a permanecer hasta cinco años (Fulton y col, 1995; Gibbs y Rweyemamu, 1977; Guy y Potgieter, 1985; Kaashoek y col, 1996).

Los anticuerpos bloquean los efectos inmunodepresores inducidos por el BHV-1 sobre los linfocitos T; además intervienen en el control de la infección a través de otros mecanismos:

- Intermedian en la lisis de células infectadas por la vía del complemento antes de que se produzca la diseminación viral célula a célula.
- ADCC mediada por complemento en la cual intervienen el V3B y la IgM.

Guy y col (1985), demostraron que la respuesta inmune primaria está caracterizada por la producción de IgM e IgG; y que a su vez la respuesta secundaria está formada básicamente por IgG2, además se comprobó un elevado título de IgM en animales a los cuales se les indujo el aborto por inoculación viral, a nivel de la secreción genital y respiratoria el principal tipo de anticuerpos es la IgA (Rodas y col, 1996).

Roney y col, (1985), estudiaron el efecto de la aplicación del IFN humano en animales expuestos al BHV-1; comprobando los efectos protectores reportados para el IFN, los cuales son evidenciados por una disminución de la enfermedad respiratoria causada por el virus; aunque la acción protectora del

IFN depende de la dosis aplicada y de la cantidad de virus al que se expone el animal.

Se han hecho estudios para evaluar la respuesta inmune local en cavidad nasal y se ha encontrado que ninguna vacuna protege contra la infección primaria, aunque disminuye la severidad de la enfermedad. De acuerdo con lo anterior Israel y *col*, (1992) produjeron una vacuna con antígeno viral y toxina del cólera, la cual al parecer tiene una acción adyuvante en la respuesta a los antígenos a nivel de mucosas, por mecanismos aún desconocidos; y comprobaron que en animales vacunados se logro prevenir la infección primaria al ser expuestos al BHV-1.

Otros mecanismos involucrados en la respuesta inmune específica, son los linfocitos T ayudadores y los linfocitos T citotóxicos (Gibbs y Rweyemamu; 1977; Rodas y *col*, 1996).

## **5.6 Signos y patología**

La enfermedad se caracteriza por una amplia variedad de signos clínicos, como consecuencia de la acción del virus sobre los sistemas respiratorio, genital, digestivo y nervioso, por lo que se describen diferentes formas de presentación de la enfermedad (Alvarado y *col*, 1993; Chaparro y *col*, 2002 y 2003; Rios y *col*, 2000).

**5.6.1 Forma respiratoria:** El período de incubación después de la exposición experimental va de 2 a 7 días. La enfermedad cursa con fiebre alta (hasta 42°C), disnea, anorexia, hipertermia de la mucosa nasal, disminución en la producción láctea y presentación de secreciones nasales que van desde serosas hasta mucopurulentas por complicaciones bacterianas; la recuperación de la enfermedad se da en 10 a 15 días, aunque llega a ser mortal en los casos que se presenta bronquiolitis obstructiva extensa (Arboleda y *col*, 1996; Blood y Radostits, 1992; Van Doerskgoed y Babiuk, 1991).

Se presenta una forma aguda fulminante, que se caracteriza por aparición súbita de una infección respiratoria severa de rápida diseminación, en donde hay fiebre dificultad respiratoria y puede aparecer una diarrea profusa, por lo que se necesita diferenciar el diagnóstico con otras enfermedades virales como DVB (Ruiz, 1977). El cuadro clínico puede acompañarse de conjuntivitis aunque sin involucrar la cornea (Blood y Radostits, 1992; Gibbs y Rweyemamu, 1977).

Esta forma es la mas significativa e importante económicamente, debido a la alta morbilidad, muerte de algunos animales, perdida de peso, disminución en los parámetros productivos como lo son ganancia de peso y producción de leche (Ruiz, 1977).

**5.6.2 Forma abortigénica:** Puede ser una manifestación de la forma genital o respiratoria en vacas gestantes. Pero por lo regular, los abortos ocurren independientemente de las otras manifestaciones, o si las hay son tan leves que son difíciles de apreciar (Ruiz, 1977).

Cuando se presenta la forma respiratoria en un hato se pueden haber abortos en las 3 a 6 semanas posteriores; aunque estos pueden presentarse en cualquier momento de la gestación, el aborto ocurre generalmente en el último trimestre, llegando a provocar falla gestacional hasta en el 21% de la población (Arboleda y col, 1996; Blood y Radostits, 1992; Gibbs y Rweyemamu, 1977; Miller, 1991b).

Al igual que con el virus de campo, se ha demostrado el efecto abortigénico de algunos virus vacúnales (virus vivo) por lo cual su uso está contraindicado en animales gestantes (Arboleda y col, 1996; Blood y Radostits, 1992; Gibbs y Rweyemamu, 1977; Miller, 1991a,b).

Se ha demostrado en inoculaciones experimentales en animales preñados, que posterior a la inoculación del virus, este tiene una diseminación sistémica, cruza la barrera materno fetal, e infecta el feto, produciendo muerte fetal y aborto (Miller, 1991a,b).

Miller y col, (1991); en varios reportes mencionan que el BHV-1 puede causar mortalidad embrionaria por varios mecanismos:

- Por necrosis del cuerpo lúteo, con caída posterior de la progesterona.
- Por infección del embrión preimplantado ya que el virus puede cruzar el epitelio uterino, infectar el embrión y causar la muerte.
- Por el cambio en el útero que no permite el desarrollo normal del embrión.

Según Bosch 197, El aborto puede aparecer en un hato en forma explosiva, es decir en muchos animales casi simultáneamente, los terneros pueden nacer vivos, débiles, pero casi siempre mueren a los pocos días.

**5.5.3 Forma Genital:** La forma genital de IBR cursa con vulvovaginitis en las hembras o balanopostitis en los machos; esta forma se puede presentar, aunque es raro, junto con la forma respiratoria; lo que se evidenció en un caso reportado fue la confluencia de las dos formas se reportó en Inglaterra en 1997 (Pritchard y col, 1997).

La enfermedad con herpesvirus bovino 1 se caracteriza por asociarse con la infección del tracto respiratorio alto en vacas jóvenes, y vulvo vaginitis postular y aborto en animales con poca inmunidad, aunque es poco común encontrar estas dos formas en un mismo hato (Murray 1990).

Esta forma de la enfermedad es más conocida como vulvovaginitis pustular infecciosa (VPI) o exantema coital, se caracteriza por necrosis focal y respuesta inflamatoria linfoproliferativa; en la mucosa genital se producen lesiones de tipo

vesicular o nodular, las cuales se pueden volver ulcerativas, llegando en algunos casos a producir descarga vaginal mucopurulenta en la VPI (Gibbs y Rweyemamu, 1977; Blood y Radostits, 1992; Miller, 1991).

La VPI cuyo curso dura aproximadamente 10 días, es de carácter benigno y no induce abortos; su secuela mas grave es el prolapso uterino, el cual es causado por el esfuerzo asociado al dolor que producen las lesiones (Arboleda y col, 1996; Miller, y col 1991).

En el macho, el cuadro clínico es la balanopostitis pustular infecciosa (BPI), la cual se caracteriza por lesiones similares a las descritas para la VPI. Si las lesiones son muy severas las cicatrices pueden producir adherencias o desviaciones del pene (Gibbs y Rweyemamu, 1977; Blood y Radostits, 1992).

Es importante mencionar que se ha descrito la transmisión del virus a través del semen y de implementos usados en la recolección de semen para inseminación artificial, observándose la eliminación de virus en toros infectados subclínicamente durante períodos de tiempo variable, sin llegar a presentar signos de enfermedad. De ahí la importancia de la evaluación de los machos para determinar la presencia o ausencia del virus, lo cual determinara su estado de portadores con infección latente y posible reactivación en especial de machos dedicados a la recolección de semen; como se menciona anteriormente (Van Oirschot y col, 1993, Van Oirschot y col 1995).

Buttke y col, 1999, reportaron que vacas con endometritis subclínica, tuvieron un incremento en el influjo de neutrofilos en el útero, llevando con ello a una disminución en las tasas de fertilidad. Es claro que las endometritis clínicas y subclínicas reducen las tasas de concepción en vacas y probablemente resulte en una disminución en la fertilidad y en la sobrevivencia embrionaria. (Galvao y col, 2006)

**5.6.4 Forma ocular:** Está forma de enfermedad puede ocurrir sin reacción sistémica detectable, o puede aparecer acompañada de la forma respiratoria. Se observa inflamación y enrojecimiento de la conjuntiva, así como secreción ocular abundante, al principio clara y después mucopurulenta; puede afectar uno o ambos ojos y puede confundirse fácilmente con queratoconjuntivitis infecciosa causada por *Moraxella bovis* (Blood y Radostist, 1992).

**5.6.5 Forma nerviosa:** El BHV-1.3, agente etiológico de la forma encefálica, se replica en la mucosa ocular o respiratoria a los 3 días post infección, tiempo después del cual desaparecen las lesiones.; la replicación a nivel de tejido nervioso comienza a los 9 a 11 días post infección. Los animales mas susceptibles a está forma de presentación son los menores de 6 semanas de edad que no tiene adecuados niveles de anticuerpos adquiridos por inmunidad pasiva; aunque se ha reportado la enfermedad en animales de 6 meses (George, 1991).

Los signos que presentan los animales afectados por la forma encefálica incluyen depresión, descarga oculonasal, movimiento en círculos, sialorrea, odontoprixis, parálisis de la lengua, "head tilt" (inclinación de la cabeza), nistagmo, déficit propioceptivo, ceguera aparente, convulsiones, coma y muerte. La evolución del cuadro clínico se da en uno a dos días y la muerte sobreviene en cinco días; llegándose a presentar mortalidad en cerca del 100% de los afectados (Arboleda y *col*, 1996; George, 1991; Smith y *col*, 1990).

La forma digestiva esta asociada a meningoencefalitis, mayormente en terneros menores de 6 meses, ocasionando ataxia, movimientos frenéticos, salivación profusa, rechinar de dientes, postración y muerte (Martin y *col*, 1997).

**5.5.6 Forma Digestiva:** Afectan terneros de 1 a 3 semanas, causando fiebre, dificultad respiratoria y diarrea, se observan lesiones necróticas de color blanco en el tracto digestivo. La enfermedad evoluciona en forma aguda con alta mortalidad (Martin y *col*, 1997). pueden presentarse brotes en recién nacidos en hatos susceptibles después de la introducción de animales portadores.

## **5.7 Población hospedadora**

Además de la existencia de reservorios del virus, de las circunstancias que originan la activación de infecciones latentes y la disposición de mecanismos de transmisión intactos, otra premisa para la génesis y curso de una epizootia es la sensibilidad de la población para el BHV-1. El grado de sensibilidad de un individuo o una población viene determinado decisivamente por el estatus inmunológico existente en el momento del contagio (Dennis y *col*, 1994).

Según Ríos y *col*, 2000, las granjas especializadas en la recría de terneros y vacunos jóvenes cuentan con unas características claves para el proceso epizoótico y el mantenimiento de la cadena infecciosa por BHV-1. Tales establecimientos reúnen una serie de requisitos básicos para la presentación de manifestaciones clínicas (numerosos pases por los animales, poblaciones de origen heterogéneo, fluctuaciones en los individuos, sistemas de explotaciones intensivas que favorecen los contactos entre animales). Tomando en consideración estas circunstancias, las granjas de recría de terneros y vacunos jóvenes necesitan una particular protección frente a infecciones, si se desea que tenga éxito la prevención de contagios y enfermedades por BHV-1 en estos establecimientos, hay que eliminar todos los factores estresantes. (Denis y *col*, 1994; Guarino y *col*, 2001).

## 5.8 Diagnóstico

Para el diagnóstico de IBR se deben tener en cuenta los signos clínicos, los hallazgos a la necropsia pero se requiere de pruebas especiales para el diagnóstico definitivo (Rock y col, 1992).

Por los signos clínicos que se presentan en IBR se debe tener en cuenta otras entidades como diagnósticos diferenciales, en la parte respiratoria principalmente otros virus como diarrea viral bovina y parainfluenza. En el caso de la forma genital y abortiva, debe diferenciarse de aquellas condiciones capaces de causar aborto. En la forma conjuntival es preciso diferenciar de la queratoconjuntivitis infecciosa (Ruiz, 1977).

El diagnóstico de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina igualmente se hace mediante la detección de anticuerpos a través de un ELISA indirecto; detección del antígeno viral mediante la prueba de inmunoperoxidasa en tejidos; y detección del virus mediante el aislamiento viral (Palomino, 2004).

**5.8.1 Necropsia y toma de muestras:** Este tipo de procedimiento se realiza con el fin de coleccionar muestras, para a partir de ellas identificar el virus. Las muestras deben ser tomadas en la fase aguda de la enfermedad sobre todo cuando las descargas aún son serosas se deben tomar hisopos nasales, traqueales, conjuntivales y genitales en un medio de transporte virológico y enviarlos refrigerados (Di Santo y col, 1995).

- Hallazgos macroscópicos: se puede observar una rinitis serosa con enrojecimiento y edema de la mucosa, que puede extenderse a la laringe y tráquea, a menudo se observan hemorragias petequiales en la mucosa de los senos, nariz y tráquea. (Ruiz, 1977; Blood and Radostist, 1992).

En caso de aborto los fetos no presentan cambios macroscópicos significativos. Las muestras del feto van en frasco, se deben enviar muestras de pulmón, hígado, bazo, cerebro, adrenales, riñón, ganglios y placenta para evidenciar los cuerpos de inclusión y la necrosis focal en hígado, riñón y adrenales (Di Santo y col, 1995).

Se puede encontrar una pseudomembrana en la cavidad nasal, especialmente en los cornetes y en ocasiones en nariz y tráquea, el pulmón puede presentar enfisema (Di Santo y col, 1995).

- Hallazgos microscópicos: Rodger y col, (2007) describieron cambios histopatológicos en terneros tales como: necrosis de coagulación multifocal en hígado, moderada infiltración de mononucleares a nivel periportal, infiltración mononuclear de la túnica media de las grandes venas del hígado, moderada infiltración mononuclear en arterias del pulmón, necrosis multifocal asociadas

con moderada infiltración de neutrofilos en corteza y medula renal, hemorragia local en corteza renal junto con severa hemorragia en la medula renal.

**5.8.2 Aislamiento viral:** Tiene una alta especificidad pero no muy buena sensibilidad ya que se ve limitada por factores medioambientales que influyen en el transporte y almacenamiento de la muestra. Para el éxito de esta prueba, se debe tener en cuenta que las muestras ideales son los hisopados nasales, fetos abortados (pulmón, tejido placentario, sangre periférica, cerebro, corazón, bazo, riñón, hígado, adrenales y ganglios linfáticos) o semen. Deben ser transportadas y almacenadas en congelación, idealmente a -70 °C, y en lo posible en medio MEM. La toma de la muestra debe ser en el período de viremia (durante los 7 a 10 días posteriores al momento de la infección), ya que posteriormente aparecen anticuerpos que neutralizan el virus y dificultan su aislamiento (Palomino, 2004).

Esta prueba se realiza en cultivos celulares inoculados con muestras de exudado nasal, oculares, genitales o suspensiones de membranas mucosas del tracto respiratorio, tonsilas, pulmón, nódulos linfáticos bronquiales (Palomino, 2004)

El aislamiento en casos de abortos, es difícil, porque el aborto ocurre 1 a 2 semanas después de la viremia o porque el virus muere en el medio ambiente.

En los casos positivos, el efecto citopático característico del virus es el desprendimiento de células de la monocapa, redondeamiento y agrupación en racimos de las mismas o presencia de células multinucleadas (Palomino, 2004). El aislamiento debe confirmarse con pruebas serológicas (seroconversión en seroneutralización contra antisueros específicos) o inmunofluorescencia indirecta o indirecta (Palomino, 2004)

**5.8.3 Detección de antígeno viral:** Esta técnica es rápida y puede estar disponible en muchos laboratorios; consiste en detección de antígeno viral en tejido fresco, muestras de fluidos nasales, oculares o genitales a través del uso de anticuerpos policlonales o monoclonales mediante la técnica de inmunofluorescencia (IF) o inmunoperoxidasa (IP) (Palomino, 2004)

**5.8.4 Detección de ácido nucleico viral:** Consiste en la demostración del ADN del BHV-1, estos incluyen hibridación del ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Palomino, 2004)

- Serología mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA): Permite la detección de anticuerpos séricos contra IBR tanto en suero sanguíneo como en leche. Tiene una buena sensibilidad y especificidad.

La mayor casuística se trata de problemas reproductivos, los cuales son más difíciles de diagnosticar, debido a que la viremia ocurre tiempo antes de la evidencia de los signos clínicos (aborto, infertilidad, etc.), y por lo tanto el pico

de anticuerpos ocurre igualmente antes, y no es posible detectar seroconversión en muestras pareadas que por lo general se toman en el momento del aborto y 15 a 30 días después (Palomino, 2004)

Para un diagnóstico de hato con problemas reproductivos, se debe muestrear 10 animales o 10 % del ganado, idealmente de diferentes grupos etéreos, y en caso de existir una infección aguda en el momento, habrá una seroconversión en algunos animales. En los casos de abortos, es más diagnóstico el hallazgo de anticuerpos fetales en líquido torácico o sangre, pero debido a que los fetos al parecer tienen anticuerpos anti-peroxidasa (enzima unida a anti-IgG bovina usada como conjugado), no es posible utilizar la técnica de ELISA en fetos, por que se obtiene resultados con títulos de 0.0, dando así un falso negativo (Palomino, 2004)

Los animales con infección latente pueden dar resultados falsos negativos, hasta por períodos de 2 años, tiempo que puede durar la latencia.

La infección con BHV-1 en terneros jóvenes bajo la inmunidad pasiva maternal, pueden llevar a una latencia viral; si no hay seroconversión, puede darse un falso negativo, en el momento en que se desaparezcan los anticuerpos maternos (Palomina, 2007)

El kit de ELISA utilizado, no difiere de animales vacunados, de infectados naturalmente. Tanto los animales infectados como vacunados muestran anticuerpos por mucho tiempo o aun de por vida, pero no con capacidad neutralizantes es decir, no son siempre protectivos (Palomino, 2004)

Según Navarrete y col, 2002; Chaparro y col, 2002, se puede sospechar de IBR con base en los signos clínicos, patología y epidemiología; pero para hacer un diagnóstico definitivo se requiere de las pruebas de laboratorio.

**5.8.5 Detección de anticuerpos virales:** Está es una de las pruebas de diagnóstico más utilizadas. Las de mayor uso son las de neutralización viral y la prueba de ELISA (Rios y col, 2000).

**5.8.6 Inmunoperoxidasa:** Es una prueba que permite la detección del antígeno viral en los tejidos afectados. Cuenta con una mayor sensibilidad que el aislamiento viral, tiene como ventaja permitir el diagnóstico en tejidos autolisados, momificados fijados en formol y/o embebidos en parafina. Actualmente se usa anticuerpo policlonal contra BHV-1, pero se tendría una mayor especificidad con el uso de complejo avidina biotina y anticuerpos monoclonales (Palomino, 2004)

## **5.9 Prevención, control y erradicación**

El mayor objetivo en la patogénesis del virus de IBR es el conceptus bovino. En la hembra preñada y no protegida, el virus cruza rápidamente la placenta y produce viremia fetal, necrosis en muchos órganos y muerte fetal 24-48 h post infección. El feto es aparentemente susceptible durante toda la gestación. La prevención de la infección fetal se basa en neutralizar la viremia materna a través de la inmunización de la vaca. Se ha demostrado que títulos bajos de anticuerpos neutralizantes son suficientes para prevenir la viremia materna (Deregt y col, 1993; Kramps y col, 1993).

No existe tratamiento específico para esta enfermedad, pero se citan algunos tratamientos antivirales a continuación.

**5.9.1 Tratamiento antiviral:** Hasta el presente, todas las sustancias antivirales disponibles son viroestáticas, por ello, se requiere que el sistema inmune se mantenga intacto para conseguir la supresión de muchas enfermedades víricas. Ello puede significar que la mejor defensa clínica contra las enfermedades víricas sigue siendo la prevención (vacunación) antes que el intento del tratamiento específico de una infección ya presente (Papich y col, 2003).

La idoxuridina y la trifluridina son análogos de la timidina por lo que solo son eficaces contra los virus ADN, principalmente herpesvirus y poxvirus interviniendo en los procesos de transcripción (Papich y col, 2003).

La citarabina y la vidarabina son nucleótidos análogos de la citosina y de la adenosina respectivamente, poseen actividad *in Vitro* frente a ciertos virus ADN, incluyendo herpesvirus, poxvirus, vaccinia, rabia, citomegalovirus y probablemente virus de la hepatitis B (Papich y col, 2003).

La ADN-polimerasa inducida por herpesvirus parece ser más sensible a esta inhibición que la equivalente de la célula de los mamíferos. Es utilizada principalmente en la queratitis por herpesvirus y sistémicamente en la encefalitis por herpes simplex (Papich y col, 2003).

La ribovirina es un análogo nucleótido triazol purínico que inhibe la replicación *in Vitro* de un gran número de virus ARN y ADN. Su actividad más potente se da sobre todo contra virus respiratorios ARN (influenza A y B) y herpes virus, pero también se incluye actividad en mixovirus, paramixovirus, arenavirus, bunyavirus, retrovirus, adenovirus y poxvirus (Papich y col, 2003).

La ribovirina se puede administrar por vía oral, intravenosa y en aerosol. Cuando se administra por las dos primeras vías pueden aparecer signos de anemia debido a la hemólisis extravascular, inhibición de la médula ósea, toxicidad gastrointestinal y sintomatología nerviosa central (Papich y col, 2003).

Aciclovir y ganciclovir son nucleótidos sintéticos análogos a la desoxiguanosina, cuya actividad antivírica se restringe a los herpesvirus, el aciclovir es particularmente

efectivo contra virus herpes simplex 1 y 2 y virus varicela-zoster ; tiene menor actividad contra los virus de Epstein-Barr y citomegalovirus (Papich y col, 2003).

El aciclovir está indicado en muchas infecciones por herpesvirus, incluidas la formas mucocutáneas crónicas y recurrentes, el herpes genital primario y secundario, el herpes neonatal y la encefalitis por herpes simplex (Douglas, 1990).

El uso veterinario de estos agentes antivíricos es poco conocido, aunque el aciclovir se ha usado en el tratamiento de encefalitis experimental por herpes virus (Norton y col, 1991).

Una de las principales características del BHV-1, que debe tenerse en cuenta para su control es su capacidad de persistir en el animal de por vida, ya que el BHV-1 permanece integrado por un período indefinido en células preferenciales. Es necesario definir la decisión de controlar la enfermedad o eliminar la infección (Cotrino y col, 2003; Rios y col, 2000).

**5.9.2 Vacunación:** IBR tiene alta prevalencia y no hay campañas de erradicación, históricamente no se vacunaban animales preñados por el riesgo de inducir infección y muerte fetal. Ahora se sabe que si la vaca ha sido apropiadamente inmunizada con vacuna contra IBR entre los 6 meses de vida y su primera gestación, su inmunidad debería ser suficiente para prevenir la viremia si es expuesta al virus durante la preñez (Zambrano, 2007).

Para el control y prevención se disponen de dos tipos de vacunas:

- Vacunas convencionales vivas y muertas: Estas vacunas usualmente previenen los signos clínicos después de una infección de BHV-1. Aunque la mayoría de estas vacunas convencionales reduce la cantidad de virus eliminado después de la infección, su uso ha servido para restringir la difusión de la enfermedad en hatos y regiones (Schang y col, 1996).
- Vacunas marcadas vivas y muertas: Estas vacunas recientemente desarrolladas permiten no solo prevenir los signos clínicos después de una infección, además previenen la replicación y posterior excreción del virus y puede ser usada en presencia de brotes de la enfermedad, disminuyendo la incidencia y transmisión de BHV-1. También permiten diferenciar animales vacunados de infectados (Thrusfield, 1990).

En conclusión, las vacunas de virus vivo son seguras para usar en animales preñados si ellos son inmunes al momento de la revacunación con el virus vivo. El estatus inmune puede ser proporcionado al vacunar esos animales con productos atenuados o vivos antes de iniciar la vida reproductiva del animal (Ellsworth y col, 2003).

Un protocolo comúnmente recomendado para la protección contra efectos reproductivos de IBR en los bovinos es iniciar la vacunación en terneras a los 5-6

meses de edad con el virus vivo, para evitar la neutralización del virus vacunal por parte de los anticuerpos colostrales realizar un refuerzo antes, dos meses antes de que las novillas sean inseminadas o entren a los grupos de reproducción. Una vez cumplido este esquema se puede considerar que los animales tienen un buen nivel de inmunidad contra IBR por lo cual, no debería importar el tipo de virus que se utilice siempre y cuando se siga realizando una vacunación anual durante el período del postparto, esto resulta eficiente por lo menos para controlar los efectos reproductivos de IBR, sin embargo, puede no prevenir absolutamente la infección y menos evitar la latencia del virus (Zambrano, 2007).

Está última de especial interés ya que si no se mantienen los niveles adecuados de inmunidad bajo condiciones de estrés podrían desencadenar un aumento en la presentación clínica de casos así como de la capacidad infectiva del virus.

Existen actualmente alrededor de 2000 vacunas para IBR con licencia para su uso en animales domésticos por el Ministerio de Agricultura de Estados Unidos, todas ellas deben cumplir con los requisitos exigidos en términos de la pureza, potencia, seguridad, y la eficacia prescrita en el código de regulaciones federales en Norte América. Las recomendaciones sobre su uso y eficacia se pueden encontrar en la etiqueta y se refieren a la prevención de la infección contra un patógeno específico o para el uso como ayuda en la reducción de la enfermedad, las diferencias en lo que prometen demuestran la variación en la protección de las diferentes vacunas (Zambrano, 2007).

La eficacia de las vacunas utilizadas en bovinos particularmente en lo que se refiere a aquellas utilizadas en el control de enfermedades reproductivas, siempre ha sido difícil de evaluar. Según Zambrano 2007, se ha sugerido que el problema de las vacunas es un resultado de lo siguiente:

- El nivel de confianza de quien aprueba la licencia basado en los datos generados por el fabricante (quién tiene un interés adquirido).
- La aceptación de la eficacia por parte de quien aprueba genera la licencia cuando la información acerca de los estudios de la eficacia provienen de estudios que no fueron apropiadamente diseñados o que no proporcionan resultados que se pudieran correlacionar significativamente con la protección contra la enfermedad natural.
- La ausencia de datos por parte de laboratorios independientes, que puedan ser contrarios a los datos en los cuales se basa quien aprueba la licencia.
- Supervisión inadecuada de la eficacia de vacunas después de que son aprobadas, y la no disponibilidad de una revisión del análisis de los datos realizada por parte de un par académico o imparcial.

Para determinar el costo/beneficio de un programa de vacunación, es necesario tener en cuenta:

- El costo de un caso clínico, lo cual incluye el costo del tratamiento y el costo promedio de la mortalidad o el evento clínico que considere indeseable como Ej. Numero de abortos (promedio de la tasa de fatalidad por caso multiplicada por el valor promedio del animal, o de la gestación).
- El costo total anual de vacunar cada animal,
- La incidencia prevista de la enfermedad, y
- La eficacia de la vacuna.

La vacunación se considera beneficiosa cuando las pérdidas que se pueden prevenir gracias a ella son más grandes que los costos implicados. Cuando se verifica la investigación clínica que ha sido publicada para una vacuna particular, Zambrano 2007, propone que puede ser útil utilizar la siguiente lista de chequeo

- ¿La vacuna ha sido evaluada en el laboratorio y en el campo en estudios al azar y controlados?
- ¿Eran los grupos controles concurrentes o históricos?
- ¿Cómo fueron desafiados los animales de ensayo? ¿En un desafío de laboratorio, el modelo se acerca al natural? ¿Con los ensayos de campo, los animales del grupo control se enfermaron?
- ¿La medida del resultado fue significativa?
- ¿Fueron consideradas la biología y la epidemiología de la enfermedad?
- ¿La vacuna fue asignada aleatoriamente a los grupos?
- ¿Se utilizaron diseños de estudios ciegos para reducir al sesgo?
- ¿Qué otros sesgos potencialmente importantes fueron evidentes?
- ¿Cuál era la probabilidad de obtener un resultado solo por casualidad?
- ¿Cuáles son las diferencias entre los animales de ensayo y los animales en un ható? ¿Cuan relevantes son los resultados de la prueba de campo con relación a los hatos que no son de prueba? La evaluación de una vacuna toma tiempo y no es particularmente fácil. Una vacuna puede funcionar bajo algunas circunstancias pero en otras circunstancias no. La enfermedad por si misma puede cambiar con el tiempo, convirtiendo una vacuna que fue efectiva en el pasado en ineficiente. Las enfermedades no son entidades estáticas, sino sistemas dinámicos en evolución. Los veterinarios necesitan un acercamiento lógico hacia la determinación de la mejor información disponible, para poder hacer recomendaciones con fundamento a sus clientes. El proceso requerirá de una actualización permanente, así como la naturaleza de las operaciones

de los hatos cambia, los cambios de la tecnología, y nuestra comprensión de las enfermedades mejora cada día (Zambrano, 2007).

Fallas en la vacunación o fallas en la eficacia: dependen de cual es la definición de éxito que se puede esperar; Zambrano 2007 propone que algunos de los factores asociados se discuten a continuación:

- La cantidad o el tipo de antígeno y/o de coadyuvante no es inmunológicamente apropiado.

La cepa o el serotipo utilizado no es igual al que causa la infección o la enfermedad, el nivel de la fabricación es pobre y no induce una respuesta inmune eficiente - EV bajo.

Evaluación: Realizar serología antes y después de la vacunación para detectar los anticuerpos específicos y si es posible los anticuerpos no específicos (IgG, IgM) o CMI (requiere el laboratorio especial).

- Cepas vivas modificadas: El agente no está presente, o es no viable, o está por debajo de límites identificables. Se puede deber a mala calidad en la producción de las vacunas, o a un mal manejo de las mismas (Por ejemplo, sobrecalentamiento o exposición a la luz solar, congelación).

Evaluación: Realizar serología antes y después de la vacunación para determinar si se producen los anticuerpos específicos o los anticuerpos no específicos.

Envíe la vacuna para la detección del virus (Ej. PCR u otras pruebas). Envíe un frasco que no se ha reconstituido y uno se que haya reconstituido y utilizado.

- Manejo de la vacuna: Mezclar vacunas, uso de los coadyuvantes o los preservativos incompatibles (destruyen las cepas vivas modificadas) e inactivan el producto.
- Contaminación Bacterial: Permitir que el contenido de la vacuna se contamine con las bacterias; inactivará o destruirá las cepas vivas modificadas.
- Contaminación con químicos o desinfectantes: Añadir productos químicos como desinfectantes, alcohol, inactivará la vacuna.
- Sobrecalentamiento: Permitir que cepas vivas modificadas o vivas una vez se reconstituye la vacuna excedan los 5° C o se expongan a la luz del sol por períodos de tiempo prolongados.
- Inyección inadecuada: Sitio o ruta de administración equivocada, subdosificación de la vacuna, perdidas durante la inyección.
- Agujas y jeringas: Usar agujas y jeringas reutilizadas promueven la contaminación bacteriana del contenido de la vacuna con la muerte o

inactivación de las cepas de la misma. El cloro contenido en el agua corriente puede también inactivar las cepas vacúnales cuando agujas y jeringas son solamente desinfectadas con agua de la llave.

**5.9.3 Inmunidad de hato:** La inmunidad de hato es la resistencia de un grupo de animales a la invasión y a la dispersión de un agente infeccioso debida a la inmunidad colectiva del grupo ya sea por vacunación o por la exposición previa a determinado patógeno (Zambrano, 2007).

La transmisión de la mayoría de los agentes infecciosos en general, no continuará dentro de un grupo expuesto de animales si la proporción de animales inmunes en ese grupo está sobre el umbral de alarma, típicamente entre 70 al 80%. Este nivel depende de la virulencia del agente y de los factores que influyen la probabilidad de transmisión, tales como la densidad animal y la dosis típica del agente (Se debe diferenciar el concepto de inmunidad de hato de la resistencia de hato, un término más inclusivo. La resistencia de hato puede ser circunstancial debido por ejemplo al mantenimiento de animales nuevos en cuarentena de ser introducidos al hato, o por la operación de un hato totalmente cerrado) (Zambrano, 2007).

El propósito en programas de la vacunación es aumentar la proporción de animales en la población que sean inmunes.

En términos prácticos todas las medidas utilizadas rutinariamente como lavado y desinfección de equipos y fómites, y elementos de cirugía, sellado de pezones, utilización de agujas desechables entre otros, representan algunas de las metodologías eficientes para reducir probabilidad de la transmisión de una infección. (Santamaría y col, 1983). El aislamiento o la cuarentena de animales enfermos se pueden utilizar para reducir el número de contactos. De manera adicional, el tratamiento de enfermos cuando sea pertinente, o la vacunación pueden reducir la duración del período infeccioso y por lo tanto son medidas que permiten reducir el riesgo de transmisión a otros animales en la población. En algunas enfermedades especialmente de tipo bacteriano (Ej. salmonelosis) el uso de tratamientos puede prolongar el período infeccioso si existe resistencia antimicrobiana (Zambrano, 2007).

**5.9.4 Manejo Sanitario:** Se debe evitar el ingreso del virus en el hato, entre las medidas de control se recomienda supervisar el movimiento del ganado evitando el ingreso de nuevos animales sin conocer su estado sanitario, realizar cuarentena y análisis serológicos anuales para evaluar el estado de la enfermedad en el hato con eliminación de animales seropositivos (Vera y col, 2006).

**5.9.5 Programa de vacunación:** Antes de empezar un programa de vacunación se debe tener en cuenta las preocupaciones señaladas anteriormente y además otros aspectos tales como:

- La aplicación de una vacuna por vía intramuscular (IM), induce una ligera inmunidad para los diversos cuadros clínicos de la Rinotraqueitis y es aceptable solo para la forma respiratoria.
- La aplicación de una vacuna por vía intranasal (IN), induce una protección alta contra el cuadro respiratorio y solo parcial para las formas genitales.
- En general la aplicación de las vacunas, reduce la intensidad de los cuadros clínicos y suprime el aborto en las hembras gestantes.

Para la mayoría de los autores, la utilización de vacunas vivas atenuadas, puede provocar en las hembras gestantes abortos, y la presentación de focos de contagio.

De acuerdo con Cotrino, (2003), hay tres posibilidades de control cuando en un hato se manifiesta la enfermedad:

- Prevención de los casos clínicos: aplicando vacunas atenuadas, vacunas termo-sensibles o vacunas inactivadas. Los animales infectados permanecen latentemente infectados, porque la información genética de BHV-1 persiste en los ganglios nerviosos.
- Eliminación del virus de campo del hato y prevención de los casos clínicos: vacunando a todos los animales del hato dos veces en intervalos de 4-6 semanas con vacuna viva atenuada, en las mucosas nasales, mucosas genitales y en las conjuntivas. La vacunación se repite cada año.
- Eliminación del virus de campo:
  - En hatos pequeños con hasta 20% de prevalencia, se prefiere una vacuna inactivada porque no producen latencia.
  - Los animales vacunados serán reemplazados gradualmente
  - El reemplazo de los animales se efectúa solamente con animales que vengan de hatos libres de BHV-1.
  - Las exposiciones ganaderas y ferias se realizaran solamente con animales libres de BHV-1.

## **5.10 Situación mundial del vIBR**

### **5.10.1 IBR en Colombia**

En Colombia se ha reportado para hembras bovinas una seroprevalencia del 51.7% para la región Caribe, un 21.5% para la región Andina y un 20.6% para el Pie de Monte Llanero (Griffiths y col. 1982). En toros de La Sabana de Bogotá se encontró un 15.3% de reactores positivos (Góngora y col. 1995); en un informe de 2952 muestras de suero bovino, procedentes de diferentes regiones del país, por la técnica de ELISA, se reporto un 53.4% de positividad a IBR. En estudios realizados en los departamentos de Córdoba y Sucre, se encontró una prevalencia del 29.6% en

muestras de sueros provenientes de 2295 bovinos (Otte y col. 1995). El estudio demostró que no existieron diferencias significativas entre el ganado lechero y el de carne y que los índices de prevalencia aumentaron progresivamente conforme aumento la edad de los animales (Otte y col. 1995; Villate y col 1976).

En estudios realizados por la Universidad Nacional de Colombia en San Gil (Santander) se evaluó la seroprevalencia de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, en 352 bovinos de 42 granjas del municipio, en el muestreo se incluyeron hembras de diferentes grupos etareos y 30 toros usados en programa de cruzamiento. La prevalencia hallada fue del 33.5% en bovinos y 71.4% en las granjas, por edades dichos hallazgos se distribuyeron así: Hembras menores de 1 año 11.8%, hembras entre 1 y 3 años 22.2%, vacas mayores de 3 años 56%, toros muestreados 10%. Se encontró asociación estadística entre la positividad a IBR y las variables tipo de explotación (leche), edad de los animales (adultos), origen de los reemplazos (otras regiones) y positividad de los reproductores (toros) (León y col. 2002)

Para lograr una adecuada prevención de la enfermedad, es indispensable conocer la situación epidemiológica local y regional, contar con el concepto de la autoridad sanitaria y efectuar medidas generales de prevención tales como: el aislamiento y observación de los animales recién integrados a la explotación y (las circunstancias lo ameritan), la posterior aplicación de la vacuna mas indicada.(León y col, 2002; Navarrete y col, 2002). La vacuna a virus vivo modificado (VVM) para inoculación intramuscular (la primera vacuna desarrollada), está todavía en uso, es fácil de administrar y se encuentra disponible en combinación con otras vacunas; está contraindicada para su uso en animales lactantes. La administración intranasal de VVM IBR ha ganado una amplia aceptación, debido a que puede ser usada con seguridad en hembras gestantes y la producción de interferón y de anticuerpos secretores en a superficie de la mucosa (Navarrete, 2002).

### **5.10.2 IBR en el mundo**

La IBR en alguna de sus manifestaciones clínicas, ha sido diagnosticada en numerosos países; como causa de aborto en los Estados Unidos de Norteamérica, Canadá, México (Ruiz y Cuevas, 1971), Japón 1972, Bélgica 1973. En Argentina se aisló el VHB-1 y *Listeria monocytogenes* desde un feto abortado (Epstein y col., 1972). En otros países se ha descrito Rinotraqueítis o Vulvovaginitis pero no aborto, tal es el caso de Australia, Nueva Zelandia, Gran Bretaña, Sudáfrica, Tanzania, Israel, Dinamarca, Francia, Chad, Nigeria, Irán, Hungría, Bulgaria, Austria, Rusia y Suiza entre otros. (Wyler y col, 1989a, b).

Existe un plan que coincide con un esfuerzo en varios países de la Unión Europea por erradicar el virus IBR de sus poblaciones bovinas y la IBR ya se ha erradicado de

Escandinava, Suiza, Austria y la región de Bolzano en Italia y Francia, Alemania y Holanda tienen en marcha programas de control nacionales o regionales. Las razones para la erradicación del vIBR son principalmente comerciales; desde enero de 1999 está prohibido el movimiento dentro de la Unión Europea de embriones y semen de hatos seropositivos a IBR y desde mayo de 2004 no está permitido la venta de animales de hatos seropositivos a Alemania. Todo ello hace que esta enfermedad adquiera aún mayor importancia económica como consecuencia de las limitaciones comerciales de ganado vacuno y de sus productos por parte de los países libres de la misma. Por otra parte, España es un país importador de ganado vacuno y debe evitarse que sea el destino de animales infectados.

En México la IBR fue diagnosticada en 1971 y a la fecha se ha aislado el virus a partir de bovinos con signos que hacían sospechar de esta enfermedad, correspondientes a hatos de diferentes partes de la República Mexicana, también se han encontrado anticuerpos neutralizantes contra IBR en bovinos de Estado de México, Puebla, Yucatán, encontrándose diseminada por diferentes zonas ganaderas del país (Correa, 1988). Desde el punto de vista económico, es probablemente la más importante, específicamente en lotes de ganado de engorde, habiendo pérdidas en vacas lecheras, por abortos, anomalías fetales, reducción en la producción, problemas respiratorios, muertes, gastos de tratamientos, retraso de crecimiento, etc (Barajas y col., 1987; Correa, 1988; García, 1990; Bosch y col., 1996).

En Latinoamérica los principales estudios de IBR se han realizado en Colombia (Aycardi y col., 1978; Zúñiga y col., 1978), Perú (Acosta y col., 1967; Fernández y col., 1967), Brasil (Galvao y col., 1962; Wizigmann y col., 1971; Mueller y col., 1978). En Argentina, Epstein y col., en 1972 aislaron el virus de IBR desde fetos abortados y de un carcinoma ocular. En el Salvador, Rice y Jenney en 1979, presentan evidencias serológicas de IBR. En Uruguay, Guarino y col., 1981 aislaron el virus de IBR del prepucio de un bovino clínicamente sano, luego de la administración de corticosteroides. (Citado por Zúñiga y col, 1978)

En Venezuela, a pesar de la elevada proporción de animales seropositivos a la IBR, hay pocos reportes de la ocurrencia de patologías con pérdidas económicas de consideración, que pudieran clínicamente ser asociadas con la IBR, lo que pudiera hacer pensar que las cepas actuantes sean poco virulentas, tal como fue sostenido en otros países (Wyler y col 1989a.). Encuestas en bovinos no vacunados, mediante la prueba de seroneutralización, indican que la prevalencia serológica está en el orden del 43%. En 1985. Se detectó infección activa del virus herpes bovino tipo-1 (VHB-1), responsable de esta enfermedad en el estado Lara y en 1986 fue confirmada mediante

el aislamiento y la caracterización de una cepa de VHB-1, en bovinos del estado Mérida (Wylor y col 1989a,b).

En Chile, el virus fue aislado por primera vez en el año 1981, y a partir de esa fecha se han detectado varias cepas, tanto de animales con problemas respiratorios como reproductivos. De acuerdo a estudios de prevalencia serológica llevados a cabo en determinadas zonas del país, la infección en hatos de carne y leche, está presente en el 74% y 93.2%, respectivamente, con una prevalencia a nivel de animales de 45.1% en ganado de carne y de 44.8% en ganado de leche. En el muestreo serológico realizado en la zona noreste del país, se determinó una prevalencia a nivel de predios del 100%.

## 6. CONCLUSIONES

1. El virus de la DVB, infecta principalmente a los bovinos, especie para la cual representa uno de los patógenos más importantes, pero también puede ser encontrado en ovejas, cabras y ruminantes salvajes, que pueden actuar como reservorios del virus. La infección transplacentaria de los fetos con DVB, en vacas preñadas, es un fenómeno muy frecuente, resultando en animales inmunotolerantes y PI con el virus, cuando la infección del feto ocurre en etapa temprana de la gestación. Los animales PI son la fuente más importante de transmisión del virus a los bovinos susceptibles. Por otro lado, los aerosoles, la saliva, secreciones nasales, orina y heces contaminadas con DVB, constituyen las fuentes más frecuentes de infección, así como, el semen, secreciones uterinas, líquido amniótico o placenta contaminada
2. Es importante resaltar que el diagnóstico presuntivo de la DVB en un rebaño puede ser sospechado con base a la observación de animales con los síntomas clínicos descritos en esta revisión bibliográfica. Sin embargo, es necesario que se realice un diagnóstico definitivo, para lo cual deben realizarse exámenes de laboratorio específicos a los animales enfermos o sospechosos.
3. En la mayoría de los hatos con infección activa, el 60% o más de los bovinos son seropositivos y naturalmente inmunes al virus de vDVB; por lo tanto, no tiene sentido vacunar a una población donde la mayoría de sus individuos ya está protegida. Los esfuerzos deben dirigirse a la detección y eliminación de los bovinos PI, principal fuente de infección y reservorio. La vacuna por sí sola no elimina los animales PI y debe emplearse como una herramienta para evitar la reintroducción de la infección.

4. Se ha demostrado un efecto negativo en la producción, debido a que en casi todas las ocasiones, los animales PI se comportan como diseminadores del virus, creando un nivel de tolerancia en el resto de los animales.
5. Desde hace tiempo, para combatir el virus de la DVB, se han utilizado vacunas convencionales que se elaboran con los biotipos CP y NCP, en la búsqueda de una mayor efectividad, pero sin mejoras significativas, esto se puede deber a que, en parte, a la corta duración de la inmunidad conferida por las vacunas inactivadas contra el virus de la DVB, que usualmente no es mayor de cuatro meses. Sin embargo, independientemente de los biotipos y genotipos del virus de la DVB, y de la variación antigénica entre las diferentes cepas este virus limita que algunas cepas no puedan brindar protección post-vacunal adecuada contra otro grupo. Las vacunas a virus vivo modificado contra este virus, desde el inicio de su comercialización, han estado asociadas con efectos indeseables.
6. Se puede concluir de acuerdo al análisis de la revisión bibliográfica que las vacunas de virus vivo son seguras de para ser utilizadas en animales preñados si ellos son inmunes al momento de la revacunación con el virus vivo, ya que estas vacunas normalmente permiten prevenir los signos clínicos después de una infección, además previene la replicación y posterior excreción del virus y pueden ser usada en presencia de brotes de la enfermedad, disminuyendo la incidencia y transmisión. El estatus inmune puede ser proporcionado al vacunar los animales con productos atenuados o vivos antes de iniciar la vida reproductiva de este.
7. En cuanto al diagnóstico clínico de IBR, se puede concluir que no es sencillo debido a la existencia de otras enfermedades que cursan con signos clínicos semejantes. Sin embargo, la enfermedad puede ser sospechada cuando se presentan afecciones del tracto respiratorio superior, con mediana o alta morbilidad y baja mortalidad, además, de problemas de fertilidad, reabsorción embrionaria y abortos. Por los signos clínicos que se presentan en IBR se deben tener en cuenta otras entidades, en la parte respiratoria principalmente otros virus como DVB y parainfluenza 3. Si se presenta el caso de la forma genital y abortiva, también debe diferenciarse de otras patologías causantes de aborto. En la

parte ocular, la forma conjuntival es puntual diferenciarla de la queratoconjuntivitis infecciosa.

8. De acuerdo a esta revisión bibliográfica, se pudo concluir que en Colombia, los estudios de DVB e IBR son muy escasos. Queda mucho por investigar en términos de situación epidemiológica en las distintas regiones ganaderas, así como en la implementación de métodos diagnósticos eficaces y evaluación del impacto económico de la infección, prerequisites indispensables para planear una estrategia de erradicación y control.
9. Finalmente, es importante destacar que un buen diagnóstico de la DVB e IBR depende de un manejo apropiado de las muestras, la historia clínica de los animales, del amplio conocimiento de los programas de vacunación, lo que exige un trabajo en conjunto de ganaderos, veterinarios, microbiólogos, grupos de investigación, entidades gubernamentales entre otros, que colaboren con aportes y conocimientos para la erradicación de dicha enfermedad, para que así no se vea afectada la economía del país.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. ACOSTA, A.; FERNANDEZ, M., y LORA, A. Investigación de anticuerpos contra Rinotraqueítis Infecciosa de los bovinos en el ganado nativo del Perú. Rev. Cent. Nac. Pat. Anim. 7: 51–56. 1967.
2. AKERMAN, M. Y COL. Erradication of Infectious Bovine Rhinotracheitis in Switzerland: Review and Prospects. En: Veterinary Microbiology .Vol. 23.; 251 -256. 1990
3. ADLER H., JUNGI W., PFISTER H., STRASSER M., SILEGHEM M., PETERHANS E. Cytokine regulation by virus infection: bovine viral diarrhoea virus, flavivirus, downregulates production of tumor necrosis factor alpha in macrophages in vitro. J Virol; 70:2650-2653. 1996.
4. ADLER H, FRENCH B, JUNGI T, PETERHAN. IN: GLEW, E.; HOWARD C. Antigen-presenting cells from calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, a member of the *Flaviviridae*, are not compromised in their ability to present viral antigen. J Gen Virol; 82:1677-1685. 2001
5. AL-MASRI A., WERFEL T., JAKSCHIES D., VON WUSSOW P. Intracellular staining of Mx proteins in cells from peripheral blood bone marrow and skin. Mol. Pathol. 50: 9-14. 1997.
6. ALVARADO A., AGUILAR A., MEJÍA P., DE PAZ O., VILCHIS C. Aislamiento y tipificación de una cepa de Herpesvirus Bovino 1, del tipo vulvovaginitis pustular infecciosa. Técnica pecuaria de Mexico. 31: 73-83. 1993.
7. AMES T. The causative agent of DVB: its epidemiology and pathogenesis. Vet Med 81: 629-633. 1986.

8. ANDINO, R; TORRES, H; POLACINO, P; SCHUDEL, A. AND PALMA E. Detection of Bovine Herpesvirus-1 Nucleic acid Sequences, Using a dot-blot Hybridization Procedure. En: American Journal of Veterinary Research. Vol. 48, #6.p 984-987. 1987
9. ARBELAEZ SONIA., RIVERA HERMELINDA., PEZO DANILO., GARCIA WILBER. Detección de anticuerpos contra pestivirus de una comunidad campesina de la provincia de Canchas, Cusco. Rev Inv Peru 13(1). 46-51. 2002.
10. ARBOLEDA, J; RODAS, J; OSSA, J; ZULUAGA, F. Espectro Clínico y Epidemiológico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina. En: Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 9. No1-2. p. 3-13. 1996
11. AYCARDY, E; SANCLEMENTE, V; MONCADA, I; CORTEZ, M. Prevalencia de Anticuerpos para el Virus de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Ganado de Carne en Colombia y Aislamiento del Virus en Casos Clínicos en : Memorias décimo Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y de Zootecnia . p 81-83. 1976
12. AYCARDI, E.; SANCLEMENTE, V., y CORTES, J. Prevalencia de anticuerpos para el Virus de Rinotraqueitis Infecciosa en ganado de carne en Colombia y Aislamiento del Virus en casos clínicos. Rev. Fac. Med. Vet Zotec. 30 (85–86):14-19. 1978
13. BABIUK, L; Y COL. Effect of Bovine a Interferon on Bovine Herpesvirus Type- 1 Induced Respiratory Disease. En: Journal of Genetic Virology. No. 66 .1985.
14. BAKER J. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infections. The Veterinary Clinics of North. America. Food Anim. Pract. 11: 3425-445. 1995.

15. BAULE C., KULCSAR G., BELÁK K., ALBERT M., MITTELHOLZER C., SOÓS T., KUCSERA L., BELÁK S. Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhoea virus type 1. *J. Clin. Microbiol.* 39: 146-153. 2001.
16. BARAJAS, R. Y., BERMUDEZ, R.M., RIEMANN, H. Prevalencia de anticuerpos contra Diarrea Viral Bovina y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en ganado Holstein cebú en el trópico húmedo de México, DF. p.p. 61-62. 1987.
17. BARRERA, M. Herpesvirus Bovino-1: Obtención de Medios de Diagnóstico y Prevención. *Tesis para la Opción del Grado Científico de Dr.C. Veterinaria. ISCAH. CENSA. Cuba.* 1996
18. BARTHA, A.; BÉLAK, S. Y BENYEDA, J. Tripsina and heat resistance of some strains of the herpesvirus group. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 19(1): 97-99.1969
19. BARRIETO CARDENAS SUSANA MARITZA, Presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la diarrea viral bovina (DVB) en sueros bovinos de 4 predios de la IX region. Tesis de pregrado. Universidad Católica de Temuco. 2004.
20. BAKER, J. C. Clinical aspects of bovine virus diarrhoea virus infection. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9 (1): 25-41. 1990
21. BETANCUR, C.; GONZALEZ, M.; REZA, L. Seroepidemiología de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en el Municipio de Montería, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Córdoba.* vol. 11 No. 2. 2006.
22. BEWOO JOSEPH N., HAASE CRISTOPHER J.M, SHARP PATRICIA., SCHULTZ RONALD D. Leukocyte profile of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 115: 369-374. 2007.
23. BIELEFELDT OHMANN H. The pathogenesis of bovine viral diarrhoea virus without vaccines. *Food Anim Pract* 11: 627-640. 1995.

24. BITSCH V. HANSEN KEL, RONSHOLT L. Experiences from the Danish programmed for eradication of bovine virus diarrhoea (DVB) 1994-1998 with special reference to legislation and causes of infection. *Vet microbiology* 77: 137-143. 2000.
25. BLAHA T. *Epidemiología especial veterinaria*. Zaragoza (España). Acribia. 1995.
26. BLOOD, D AND RADOSTITS, O. *Medicina Veterinaria*. Séptima Edición. Mcgraw Hill, 1992.
27. BOLIN SR, RIDPATH JF. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *Ava. J. Vet Res* 53: 2157-2163. 1992.
28. BOLIN, S. R., D. L. GROOMS. Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. *Vet. Clin. Food. Anim.* 20: 51-68 .2004
29. BOLIN S. R., MATHEWS P. J, RIDPATH J. F. Methoda for detection an frecuency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea viruses in a vaccinatd herd. *Am. J. Vet. Res.* 52 (7): 1003, 1991.
30. BOSCH J.C., FRANKENA K., VAN OIRSSCHOTT J.T. Effect on milk production of vaccination with a bovine Herpesvirus 1 gene-deleted vaccine. *Vet Rec* 140: 196-199. 1997.
31. BOSCH, J. C., KAASHOEK, M.J., KROESE, A.H., OIRSCHOT, J.T. An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccine. *Veterinary Microbiology*, 52: 223-224. 1996.
32. BORDA A. R. *Diarrhea viral bovina en terneros y terneras procedentes de Holanda*. "Tesis". Med Vet. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. 1975
33. BROWNLIE, J., M. C. CLARKE, C. J. HOWARD.. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Reseach in Veterinary Science* 46: 307-311.1989

34. BROWNLIE, J., I. THOMPSON, A. CURWEN. Bovine virus diarrhoea virus strategic decision for diagnosis and control. In Practice vol. 22, 176-187.2000
35. BUTTKE T., SANDSTORM P. 1994. IN: SCHWEIZER M., PETERHANS E. Oxidative stress in cells infected with bovine viral diarrhoea virus: a crucial step in the induction of apoptosis. J Gen Virol; 80:1147-1155. 1999.
36. CARNERO R. Fiebre Porcina Africana. Serie: Salud Animal. Publicación científica No 3. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, ICA. San José, Costa Rica. 1982.
37. CELEDON M. CARBONELL J. IBARRA L. PIZARRO J. Detección de bovinos portadores e inmunotolerantes al Virus de la Diarrea viral Bovina en predios lecheros de la Región Metropolitana de Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. vol.30, no.1, p.125-132. Chile, 1998.
38. CHAPARRO J. Evaluación de la capacidad infectiva de una cepa de campo del virus de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en terneros. Tesis MSc, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 2003.
39. CHAPARRO J., RAMIREZ G., VERA V., GONGORA A., VILLAMIL L. Aislamiento de una cepa de campo del Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina de una explotación de ganado de carne en el Departamento del Meta, Revista Orinoquía. Vol. 6 (1): 100-107. 2002.
40. CHU C. J., ZEE Y. C. Morphology of bovine viral diarrhoea virus. Am. J. Vet. Res., 45 (5): 845-850. 1984.
41. COLLETT M., LARSON R., RETZEL E. Protein encoded by Bovine Viral Diarrhoea Virus: The Genomic Organization of a Pestivirus. Virology (165): 200-208. 1988
42. CONLON, P; OGUNBIYI, P; PERRON, R. AND EYRE, P. Effects of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus Infection on Bovine Airway reactivity. En: Canadian Journal of Veterinary Research. No 51. 1987. p. 345-349.

43. COSTABLE PD, HULL BL, WICKS JR, MYRE W. Femoral and tibial fractures in a newborn calf after transplacental infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 132: 383-385. 1993
44. CORTESE V., GROOMS D., ELLIS E., BOLIN S., RIDPATH J., BROCK K. Protection of pregnant against infection with bovine viral diarrhoea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. *Am. J Vet. Res.* 59: 1409-1413. 1998.
45. COTRINO B. IBR Y DVB, su importancia en reproducción. En.:Memorias, seminario, taller "Actualización en IBR y DVB 2003", aspectos moleculares epidemiológicos y de control Universidad Nacional de Colombia, Septiembre 25 y 26. 2003.
46. COTRINO, V. Anotaciones Sobre Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) como Problema Infeccioso que Afecta la Reproducción de los Bovinos. 1997.
47. CORREA, G.P. Enfermedades virales de los animales domésticos poligástricos. 5ª edición. Paradigmas, México. p.p. 45-90. 1988.
48. DAVID GP., CRAWSHAW TR., GUNNING RF., HIBBERD RC., LLOYD GM., MARSH PR. Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with DVB virus infection. *Vet Rec* 134: 468-472. 1994.
49. DENIS M., SPLITTER G., THIRY E., PASTORET P., BABIUK A. Infectious bovine rhinotracheitis (Bovine Herpesvirus) helper T cells, cytotoxic T cells and NK cells. Cap 10. CRC Press 1994.
50. DEREGT, D; CHO, H; KOZUB, G. A Comparative Evaluation of Two Sensitive Serum Neutralization Tests for Bovine Herpesvirus-1 Antibodies *Canadian Journal veterinary Research.* 57. 1993. p. 56-59.
51. DIDERHOLM H., DINTER Z., IN: BAIGENT S., ZHANG G., FRAY M., FLICK-SMITH H., GOODBOURN, S, MCCAULEY J. Inhibition of beta interferon transcription by noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus is through an

- interferon regulatory factor 3-dependent mechanism. *J Virol*; 76:8979-8988. 1996.
52. DI SANTO, M; Y COL. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina. En: Terrizo Vol. 24, No. 123. 1995; p143-165.
53. DONIS R., DUBOVI E. Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally infected with cytopathic and noncytopathic of bovine biotypes of bovine virus diarrhea-mucosal disease virus. *Virology*; 158:168-173. 1987
54. DONIS R., DUBOVI E. Characterization of bovine viral diarrhea mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells. *Journal of General Virology* 68: 1597-1605. 1987
55. DOUGLAS, Jr. Antimicrobial: Antiviral Agents in the Pharmacological Basis of Therapeutics. Gilman; Rall, T; Nies, A.S. and Taylor, P (Eds). Pergamon Press. New York,. p. 1182-1201. 1990
56. EDWARDS, S. NEWMAN, R. H. Y WHITE, H: The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relation to viral genotype. *Br. Vet. J.* 147: 216-231. 1991
57. ELVANDER M., BAULE C., PERSSON M., EGYED L., BALLAGI-PORDANY S., BELAK S., ALENIUS S. An experimental study of concurrent primary infection with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine viral diarrhea virus (DVB) in calves. *Acta Vet. Scand.* 39: 251-264. 1998.
58. ELLSWORTH, M; BROWM, M; FERGEN, M; TUCKER, C; BIERMAN, P; TERHUNE, T. Safety of a Modified Combination Vaccine against Respiratory and Reproduce Diseases in Pregnant Cows. *Vet. Ther.* 4. 2003. p. 120-127.
59. ENGELS, M.; STECK, F. Y WYLER, R. Comparison of the genomes of Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch. 1985 Virol.* 67(2): 169-174.

60. EPSTEIN, B.; GIL TURNES, C., y ETCHEVERRIGARAY, M. E. Aislamiento de feto bovino abortado y virus de la Rinotraqueitis bovina y *Listeria monocytogenes*. Rev. Med. Vet. Buenos Aires. 53 (2): 99–102. 1972.
61. Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. Elsevier, Academic Press.
62. FENNER F., BACHMAN P., GIBBS P., MURPHY F., STUDDERT M., WHITE D. *Virología Veterinaria*. P. 349-370. Editorial Acribia S. A. Madrid, España. 1992.
63. FERNANDEZ, C. L.; NARVAEZ, O. C., y TERRY, E. T. Rinotraqueitis infecciosa de los bovinos. Informe de los primeros casos detectados en el Perú. Rev. Cent. Nac. Patol. Anim. Perú. 7 (11):39-50. 1967.
64. FLINT S., ENQUIST., KRUG R., RACANIELLO V., SKALKA A. Principles of virology. Molecular Biology, pathogenesis and control, 1<sup>st</sup> ed. ASM Press, Washington D. C. 2000.
65. FORMAN, A; BABIUK, L; MISRA, V AND BALDWIN. Susceptibility of Bovine Macrophages to Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus Infection. En: Infectious Immunology. Vol. 35.. p. 1048-1057. 1982.
66. FRAY M., CLARKE M., THOMAS I., MACAULEY J., CHARLESTON B. Prolonged nasal shedding and viraemia of cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in experimental late-onset mucosal disease. Vet. Rec (143): 608-611. 1998.
67. FRAY M., PRETINCE M., CLARKE C., CHARLESTON B. Immunohistochemical evidence for the localization of bovine viral diarrhoea virus, a single stranded RNA virus, in ovarian oocytes in the cow. Vet Pathol ; 35: 253-259, 1998
68. FREDERIKSEN B., PRESS C., LOKEN T., ODEGAARD S. Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea. Vet Microbiol; 64:109-122. 1999

69. FULTON, R Y COL. Antibody Responses by Cattle After Vaccination with Commercial Viral Vaccines Containing Bovine Herpesvirus-1, Bovine Viral Diarrhea Virus, Parainfluenza-3 Virus and Bovine Respiratory Synticial Virus Immunogens and Subsequent Revaccination at Day 140. En: Vaccine. Vol. 13 No. 8. p. 725- 733. 1995
70. GALLEGO M., CORTES E.. DE GALVIS A., DE AGUDELO D. Diarrea Viral Bovina en Colombia. Revista ANALAC, (70): 10-13. 1987
71. GARCÍA, V. Z. Epidemiología veterinaria y salud animal. Limusa. México. p.p. 58-68. 1990
72. GALVAO, C.; DORIA, J., e ALICE, F. Anticorpos neutralizantes para o virus Rinotraqueitis infecciosa dos bovinos em bovinos de Brasil. Bol. Ins. Biol. Bahía. 6 (1):15–26. 1962.
73. GEORGE, L. Understanding the Encephalitic form of Infectious Bovine Rhinotracheitis. En: Veterinary Medicine. MR.1991. p 335-337.
74. GIBBS, E.P.J. AND RWEYEMAMU, M.M. Bovine Herpesviruses. Part 1. En: The Veterinary Bulletin. Vol. 47, No. 5 1977; p. 317-340.
75. GIVENS MD. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. Theriogenology, (in press). 2006.
76. GIVENS M DANIEL., RIDDELL KAY P., WALZ PAUL H., RHOADES JIM., HARLAND RICHARD., ZHANG YIJING., GALIK PATRICIA K., BRODERSEN BRUCE W., COCHRAN ANNA M., BROCK KENNY V., CARSON ROBERT L., STRINGFELLOW DAVID A. Noncytopathic bovine viral diarrhea virus can persist in testicular tissue after vaccination of peri-pubertal bulls but prevents subsequent infection. Vaccine 25: 867-876. 2007.

77. GOGORZA L.M., MORÁN P.E., LARGHI J.L, IGLESIAS M.A. Y PÉREZ A. Vacunación contra la Diarrea Viral Bovina; fortalezas y limitaciones. Departamento de virología y Sanidad Animal: FCV UNCPBA 4-15. 2001
78. GOLÁN, A; SCORTTI, M; OCCHI, H. Detección de Herpes Virus Bovino Tipo 1 en Semen Congelado y Fetos Abortados en la Provincia de Santa Fe, Argentina. Avances en Medicina Veterinaria, Vol. 5(2), Julio-diciembre 1990.
79. GONGORA, A. Y COL. Aislamiento de un Herpesvirus Bovino tipo 1 de Secreción Nasal y Esmegma Preputial en un Toro Reproductor . EN: Revista de Medicina Veterinaria y de Zootecnia; p 43-46. 1991
80. GONGORA A, VILLAMIL LC, VERA V, RAMIREZ G, PARRA J. Diagnóstico de las principales enfermedades reproductivas en toros de la sabana de Bogotá. Énfasis en IBR. Rev Med Zoo; 43: 37 – 41. 1995.
81. GRIFFITHS.; GALLEGGO.; VILLAMIL. L.:Factores de Infertilidad y Perdidas de Ganado de Leche en Colombia .Publicaciones ICA. p 168. 1982.
82. GRIFFIN, T. P.; HOWELLS, W. V.; CRANDELL, R. A. Y MAURER, F. D.: Stability of the virus IBR. *Am J. Vet. Res.* 19: 990-992. 1958
83. GUARINO, H.; MAISONNAVE, J.; CAPANO, F., y PEREIRA, J. Primer aislamiento e identificación del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en el Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*. 78: 131–134. 2001.
84. GUY, J; AND POTGIETER, L. Bovine Herpesvirus-1 Infection of Cattle : Kinetics of Antibody Formation After Intranasal Exposure and Abortion Induced by the Virus . En: *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 46 No. 4 . p. 893-898. 1985.
85. GROOMS DANIEL L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. *Theriogenology* 66: 624-628. 2006.

86. GROOMS DL., BROOCK KV., PATE JL., and DAY ML. Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhea virus. *Theriogenology* 49: 595-605. 1998.
87. HOTMAN, E AND EASTERDAY, B. Experimental Latent and Recrudescant Bovine Herpesvirus-1 Infection en Calves. En: *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 44, No. 2. p 309-313. 1983.
88. HOUE H., Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Food Animal. Pract* 11. 89-107. 1995.
89. HOUE H. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhea virus (DVB) infections. *Vet. Microbiology* 64. 89-107. 1999.
90. ISRAEL, B; HERBER, R; GAO, Y AND LETCHWORTH, G. Induction of a Mucosal Barrier to Bovine Herpesvirus-1 Replication in Cattle. En: *Virology*. Vol. 188. p. 256-264. 1992.
91. JAIME J., RAMÍREZ G. Inmunosupresión e inmunotolerancia asociados a infección por DVB. *Rev Med Vet Zoo*; 49:54-58. 1996
92. JONES C: Herpes simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 79-95. 2003.
93. JUBB K. Pathology of domestic Animals, 4<sup>th</sup> edition. Academic Press Inc. San Diego, California. P. 177-179, 556-558. 1993.
94. JUBB K, KENNEDY P, PALMER N. Pathology of domestic animals. Fourth edition. London. Academic Press Inc.; 2:149-158. 1993
95. KAASHOEK, M; RIJSEWIJK, F AND VAN OIRSCHOT, J. Persistence of Antibodies Against Bovine Herpesvirus-1 and Virus Reactivation Two to Three Years After Infection: *Veterinary Microbiology*. Vol. 53. . p.103-110. 1996

96. KRAMPS, J; QUAK, S; WEERDMEEESTER, K; VAN OIRSHOT, J. Comparative Study on Sixteen Enzyme Linked Inmunosorbed Assay for the Detection of Antibodies to Bovine Herpesvirus-1 in Cattle. *Vet Microbiology*. 35. p. 11-21. 1993
97. LAMBETH LUKE S., MOORE ROBERT J., MURALITHARAN MORLEY S., DORAN TIMOTHY J. Suppression of bovine viral diarrhoea virus replication by small interfering RNA and short hairpin RNA-mediated RNA interference. *Veterinary Microbiology* 119: 132-134. 2007.
98. LAMBOT M., DOUART A., JORIS E., LETESSON J., PASTORET P. Characterization of immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol*; 78:1041-1047. 1998.
99. LARSSON B. OBANDO C. Evidencia serológica de la Diarrea Viral bovina en Venezuela. Instituto de investigaciones Veterinarias; *Veterinaria Tropical*. 15: 77-86. 2005.
100. LAVEN R. Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV). *NADIS*. 2001.
101. LEON R, VILLAMIL L. Seroprevalencia de la Rinotraqueitis infecciosa Bovina en el municipio de San Gil, Santander, Tesis de Grado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, 2002
102. LERTORA WJ. Inmunohistoquímicas en biopsias de piel y bulbos pilosos para el diagnóstico de bovinos persistentemente infectados con el virus diarrea viral bovina. Tesis de Maestría. Universidad Austral de Chile, Valdivia. Chile, 61-90. 2002.
103. LERTORA W.J. Diarrea Viral Bovina: Actualización. Cátedra de Patología General y Sistemática, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE Argentina. 1: 42-51.2003.
104. LESKO, J.; VEBER, P.; HRDA, M. Y FEKETEOVÁ, M: Large-scale production of infectious bovine rhinotracheitis virus in cell culture on microcarriers. *Acta Virol*. 37: 73-78. 1993

105. LOPEZ, G. RAMIREZ, E. Seroneutralización del Virus de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB), en los Hatos de la Universidad Nacional de Colombia Destinados a Docencia. Santa fe de Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. 1992.
106. LINDBERG A, BROWNLIE J, GUNN G.J, HOUE H, MOENNING V, SAATKAMP H.W, SANDVIK T, VALLE P.S. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 25 (3), 961-979. 2006
107. METZLER, A. E.; MATILE, H.; GASSMANN, U.; ENGELS, M. Y WYLER, R. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. 1985 *Arch. Virol.* 85: 57-69. 1985
108. MARTIN S., MEKK A., WILLEBERG P., TARAZONA J. *Epidemiología Veterinaria: Principios y métodos.* Zaragoza (España). Acribia. 1997.
109. McKERCHER, D; STRAUB, O; SAITO, J; WADA, E. Comparative Studies of the Etiological Agents of IBR-IPV. En: *Cond, J Comp Med Vet Sc.* 23. 1959. p. 320.328.
110. McKERCHER, D; STRAUB, O; SAITO, J; WADA, E. Comparative studies of the etiological agents of Infectious Bovine Rhinotracheitis and Infectious Pustular Vulvovaginitis. *Can. J. Comp. Med.* 23 (10): 320–328. 1959.
111. MILLER, J.M.; WHETSTONE, C.A. AND VAN DER MAATEN, M.J. Abortifacient Property of Bovine Herpesvirus Type 1 Isolates that Represent three Subtype Determined by Restriction Endonuclease Analysis of Viral DNA. En: *American Journal of Veterinary Research.* Vol. 52, No. 3; p. 468-461. 1991.
112. MILLER, J; WHETSON, C; BELLO, L AND LAWRENCE, W. Determination of Ability of a Thymidine Kinase-Negative Deletion Mutant of

- Bovine Herpesvirus-1 to Use Abortion in Cattle. En: American Journal of Veterinary Research. Vol. 52, No. 7 1991.
113. MOLANO, D; RODRIGUEZ, J. Caracterización Electroforetica e Inmunológica de una Cepa de Campo del Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina y su Comparación con Cepas de Referencia. Tesis de Grado. Santa fe de Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. 1995.
  114. MOTOSHI TAJIMA. Bovine viral diarrhoea virus 1 is classified into different subgenotypes depending on the analyzed region within the viral genome. *Veterinary Microbiology* 99: 131-138. 2004.
  115. MURRAY R. A. A field investigation of causes of abortion in dairy cattle. *Veterinary Record*. 127: 543-547. 1990.
  116. MUELLER, S.; IKUNO, A.; CAMPOS, M.; RIBEIRO, C (1978). Isolamento e identificação do vírus da Rinotraqueíte Infecciosa dos bovinos de um rim de feto de bovino (IBR/IPV). *Arq. Inst. Sao Paulo*, 45 (3):187–190. 1978.
  117. MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C. Y STUDDERT, M. J: *Veterinary Virology*, Third Edition. 1999
  118. NAVARRETE J. Obtención de anticuerpos monoclonales contra proteínas de cepa de campo del Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa (IBR) y evaluación de su utilidad diagnóstica a través de la prueba de ELISA. Tesis de Magíster. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. 2002.
  119. NAKAMURA S, SHIMAZAKI T, SAKAMOTO K, FUKUSHO A, INOUE Y, OGAWA N. 1995. IN: CHARLESTON B, FRAY M, BAIGENT S, CARR B, MORRISON I. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with failure to induce type I interferon. *J Gen Virol*; 82:1893-1897. 2001

120. NODA, J. Y BARRERA, M.: Efecto de la temperatura, éter y tripsina sobre cepas de herpesvirus bovino tipo 1. *Rev. Salud Anim.* 7: 19-27. 1985
121. NODA, J. Y BARRERA, M. Caracterización de una cepa atenuada de herpesvirus bovino tipo 1. I- Comportamiento frente a agentes físicos y químicos. *Rev. Salud Anim.* 8: 129-134. 1986
122. NORTON, T; GASKIN, J; KOLLIAS, G; HOMER, B; CLARK, C AND WILSON, N. Efficacy of Acyclovir against Herpesvirus Infection in Quakey Parakeets. *American Journal Veterinary Research.* Vol. 52 (12) 1991 .p. 2007-2009.
123. OBANDO CESAR A., RODRIGUEZ JOSEFA M. Manual de Ganadería de Doble Propósito, Diarrea Viral Bovina. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias – INIA, p 317 – 321. Maracay, Venezuela. 2005.
124. OHMANN B., BLOCH B. Electron Microscopic Studies of Bovine Viral Diarrhea Virus in Tissue of diseased Calves and in Cell Culture, *Archives or Virology*, (71) 57 – 74, 1982.
125. OTTE J., OTTE E., NAVARRETE M., SANCHEZ J. Monitoreo de la salud y producción animal en Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Informe técnico 5. 85p. 1989.
126. OTTE E, NAVARRETE M, ORJUELA J. Resultados de una encuesta realizada sobre producción y salud animal en Montería, Córdoba, Colombia. 1982 – 1984: parte II. Proyecto Colombo Alemán ICA – GTZ. Informe Técnico. P. 1 – 125. 1985.
127. OTTE, M.; RAVENBORG, T. AND HUTTNER. A Pilot Study of Elevated Abortion and Stillbirth Ratios in Cattle in the Foothills of the Eastern Plains of Colombia. En: *Preventive Veterinary Medicine.* Vol. 22 p. 103-113. 1995.
128. PATON DJ., LOWINGS JP., RAMIREZ GC., Stability of the gp53 gene of a bovine viral diarrhoea virus isolated at different time from a persistently infected steer. *Br Vet J.* 150: 603-607. 1994.

129. PALMER, Y COL. Bovine Natural Killer-Like Cell Responses Against Cell Lines Expressing Recombinant Bovine Herpesvirus Type-1 Glycoproteins. Journal of Immunology. Vol. 145. 1990.
130. PALOMINO, M. Pasantía Centro de Diagnostico del ICA. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de medicina Veterinaria y de Zootecnia .2004.
131. PAPICH, M, HEIT, M; RIVIERI, J. Fármacos Antifungicos y Antiviricos. Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza España. p. 996-997. 2003.
132. PARRA J., VERA V., VILLAMIL., RAMIREZ G. Seroepidemiología de la diarrea viral bovina en explotaciones lecheras de la Sabana de Bogotá. Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, 42(1):29-44. 1994.
133. PARRA J. Influencia de la infección por diarrea viral bovina y de la coinfección con VLB, *Leptospira hardjo* e IBR sobre la producción en ganado de leche. Tesis de maestría en ciencias de la reproducción animal. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. 1994
134. PRITCHARD, G COOK, N and BANKS, M. Infectious Pustular Vulvovaginitis-Infectious Pustular Balanopostitis in Cattle. En: Veterinary Record. May. p 587. 1997
135. RAMÍREZ M., VERA A., VILLAMIL L., RAMÍREZ G. Utilización de inactivantes químicos en el suero bovino empleado como suplemento en cultivos celulares. Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 42 (1): 48-51. 1994.
136. RAMÍREZ G, VERA V, VILLAMIL L. Diarrea viral bovina – DVB: Inmunosupresión y efectos en la reproducción bovina. El Cebú. 32-40. 1999
137. RAYMOND G. DVB Bovine Virus Diarrhea Virus. Veterinarian's Corner ; 2(9). 2002.

138. RENAUKARADHAYA, G Y COL. Prevalence of the Bovine Infectious Rhinotracheite in the CUS of India. Oficina internacional de Epizootias. 1996.
139. REZA GUEVARA LUIS CARLOS. Impacto del Virus de la Diarrea Viral Bovina en hatos lecheros. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria 2005.
140. RIJSEWIJK, F. A.; KAASHOEK, M. J.; LANGEVELD, J. P.; MELOEN, R.; JUDEK, J.; BIENKOWSKA- SZEWCZYK, K.; MARIS-VELDHUIS, M. A. Y VAN OIRSCHOT, J. T. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *Journal of General Virology* 80: 1477-1483. 1999
141. RIOS Z., ALBERTO E. Seroprevalencia del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en bovinos criollos de crianza extensiva de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. 2000.
142. RIVERA G HERMELINDA. Causas frecuentes del aborto en bovinos. *Rev. investing. Vet, Perú*, vol 12, no 12. 117-122. 2001.
143. RIVERA G HERMELINDA, BENITO Z ALFREDO , RAMOS C OLGER, MANCHENGO S ALBERTO. Prevalencia de enfermedades de impacto reproductivo en bovinos de la Estación Experimental de Trópico del centro de Investigaciones IVITA. *Rev investing. Vet, Perú*. vol.15, no.2, p.120-126. 2004.
144. ROCK D., LOKENSGARD J., LEWIS T., KUTISH G. Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine Herpesvirus 1. *J. Virol.* 66 (4): 2484-90. 1992.
145. RODAS, J; ZULUAGA, F; HENAO, G; RESTREPO, M. Y OSSA, J. Estandarización de una Prueba de Elisa para la Detección de Anticuerpos Contra el Herpesvirus Bovino.1 (BHV-1) en Suero Lácteo. En: *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. Vol. 9..No 1-2 .p 40-43. 1996.
146. RODGER, S; MURRAY, C; UNDERWOOD AND BUXTON, D. Microscopical Lesion and Antigen Distribution in Bovine Fetal Tissues and

- Placentae Following Experimental Infection with Bovine Herpesvirus-1 During Pregnancy. *J. Comp. Path*, Vol. 137 p. 94-101. 2007.
147. RONDON IAN G. Diarrea Viral Bovina: Patogénesis e Inmunopatología. Universidad de los Llanos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Instituto de Investigaciones de La Orinoquía Colombiana, Colombia. 694-704. 2006.
148. RONEY, C ; ROSSI,C; SMITH, P; LAURERMAN, L ; SPANO, J; HANRAHAN, L AND J WILLIAM. Effect of Human Leukocyte a Interferon on Prevention of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus Infection of Cattle. En: *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 46 No. 6 p 1251- 1255. 1985.
149. ROUHANDER, H.; BRINKMAN, M. L. Y SELLS, L. L. Reactivation of ether inactivated IBR virus. *J. Inf. Dis.* 117: 237-241 76. 1967
150. ROIZMAN, B. Y PELLETT, P. E. The family Herpesviridae: A brief introduction . in.: Knipe, D. M. y Howley, P. M (Eds), *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott Williams y Wilkins publishers, Philadelphia. 2381-2398. 2001
151. RUIZ, A. Complejo Rinotraqueitis Bovina Infecciosa Vulvovaginitis Pustular Infecciosa. *Enfermedades de los Bovinos. Enfermedades de los Animales Domesticos en Republica Dominicana. Dirección General de Ganaderia Sub Programa de Sanidad Animal. Santo Domingo. Republica Dominicana.1977.*
152. RUIZ-DIAZ, R., y CUEVAS, F. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina como causa de aborto en México. *Tec. Pec. México*. 15-16:51-52. 1971.
153. SANTAMARIA R. ALDANA N., BUSTOS F., MARIÑO O., PEÑA N. Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la leucosis bovina en hatos lecheros del Valle de Sogamoso. *Revista ICA*. 1983

154. SCHWEIZER M, PETERHANS E. Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *J Virol*; 75:4692-4698. 2001.
155. SIERRA, U. Evaluación Clínica y Epidemiológica de la Casuística Diagnóstica de Enfermedades Reproductivas en Bovinos en la Zona de Influencia del Centro Diagnostico Pecuario de Aguachica entre julio de 1996 a marzo de 1997. ICA. Seccional Cesar. 1998.
156. SMITH, P; Y COL. Necrotic Oophoritis in Heifers Vaccinated Intravenously with Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus Vaccine During Estrus. En: *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 51; p. 969- 971. 1990
157. SWASDIPAN S., BIELEFELDT-OHMANN H., PHILLIPS N., KIRKLAND P., Mc GOWAN M. Rapid transplacental infection with bovine *Pestivirus* following respiratory infection. *Microbiol. Pathol.* 32: 49-60.2002.
158. SURESH, S.; KUMANAN, K.; MANORAMA DHINAKARAN; PADMANABAN, V. D. Y RAGHAVAN, N. Growth characteristic of bovine herpesvirus-1. *Indian Vet. J.* 70: 204-206. 1993
159. THRUSFIELD M. *Epidemiología Veterinaria*. Zaragoza (España). Acribia. 1990.
160. VAN DONKERSGOED, J AND BABIUK, L. Diagnosing and Managing the Respiratory From Infectious Bovine Rhinotracheitis. En: *Veterinary Medicine*. p. 86-94. 1991.
161. VAN OIRSCHOT, J. Bovine Herpesvirus 1 in Semen of Bulls and the Risk of Transmission: a Brief Review. *Vet Q*, 17: p. 29-33. 1995.
162. VAN OIRSCHOT, J; RIJSEWIJK, F; STRAVER, P; RUULS, R; QUAK, A; DAVIDSE, A; WESTENBRINK, F; GIELKENS, A; VAN DIJK, J; MOERMAN,

- A. A Subclinical Infection of Bulls with Bovine Herpesvirus Type 1 at an Artificial Insemination Center. En: Veterinary Record. Vol. 132. 1993.
163. VAN OIRSCHOT, J; RIJSEWIJK, F; STRAVER, P; RUULS, R; QUAK, A; DAVIDSE, A; WESTENBRINK, F; GIELKENS, A; VAN DIJK, J; MOERMAN, A. Virulence and Genotype of Bovine Herpesvirus Type 1 Isolate From Semen of a Subclinically Infected Bull. In: Veterinary Record. Vol. 137. p. 235-239. 1995.
164. VERA V. Genética molecular del virus de la diarrea viral bovina. Memorias: Aspectos básicos de la fisiología reproductiva y perspectivas de la biotecnología en Colombia. Villavicencio, Meta. 1999
165. VERA V., RAMÍREZ C., VILLAMIL L., MORENO M., JAIME J. Biología molecular, epidemiología y control de la Rinotraqueitis Bovina Infecciosa y de la Diarrea Viral Bovina. Edición Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Genética. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2006.
166. VERA, V; RAMIREZ, G; BARRERA, J; VILLAMIL, L. Hablemos de Virología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Bogotá. 2000.
167. VILLATE, J.; SEDANO DE LEON, L.; OCAMPO, S. Y CORTEZ, E. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Colombia Aislamiento del Virus y Reproducción Experimental de la Enfermedad. en : Memorias décimo Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y de Zootecnia . 1976; p 80.
168. VILLATE, J; DELEON, L; OCAMPO, S; CORTES, E SIERRA, P. Aislamiento del Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina y Reproducción Experimental de la Enfermedad. En: Informe División Ciencias Veterinarias. ICA. 1973.
169. WARREN, L; BABIUK, L AND CAMPOS, M. Effects of BHV-1 on PMN Adhesion to Bovine Lung Endothelial Cells. In: Veterinary Immunology Immunopathology. Vol. 55, # 1-3. p 73- 82. 1996.

170. WELSH AL. 1995. IN: GLEW E, HOWARD C. Antigen-presenting cells from calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, a member of the *Flaviviridae*, are not compromised in their ability to present viral antigen. *J Gen Virol* ; 82:1677-1685. 2001.
171. WHETSTONE, C; MILLER, J; BORTHER, D; VAN DER MAATEN, M. Change in the Bovine Herpesvirus 1 Genome During Acute Infection, After Reactivation From Latency and a After Superinfection in the Host Animal. *Arch Virol*, 106: 262-279. 1989.
172. WIEDMANN, M. Detection of Bovine Herpesvirus-1 in Bovine Semen by a Nested PCR Assay. *Journal Virology Methods*. 1993.
173. WENTINK, G. H.; VAN OIRSCHOT, J. T. Y VERHOEFF, J. Risk of infection with bovine herpesvirus 1 (BHV1). *Veterinary Quarterly*. 15: 30-33. 1993.
174. WYLCOX, C AND JOHNSON, E. Nerve Growth Factor Deprivation Results in the Reactivation of Latent Herpes Simplex Virus *in Vitro*. En: *Journal of Genetic Virology*. Vol. 62, No. 7. p. 1789-1794. 1987.
175. WYLER R., ENGELS M., SCHWYZER. Infectious Bovine Rhinotracheitis/ Vulvovaginitis (Bo HV1). Institute of Virology. University of Zurich, P. 1-55. 1995.
176. WYLER, R.; ENGELS, M.; NAD, M.; SCHWYZER, M. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Vulvovaginitis (BHV-1). Institute of Virology. University of Zurich. 1989.
177. WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: Wittman, G (Ed). *Development in Veterinary Virology. Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs*. Kluwer Academic Publisher, London. 1-57 pp. 1989.
178. WIZIGMAN, G.; VIDORT, T., e RICCI, Z. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos virus PI-3, IBR e da Diarréia a virus –

enfermedades das mucosas dos bovinos no Estado do Río Grande do Sul. An. Inst. Pesq. Vet. Desidéo Finamor. 1971.

179. ZAMBRANO, J. Principios Básicos de Vacunación e Inmunidad de Hato. Seminario Internacional de Reproducción Bovina y Salud de Hato. Universidad Nacional de Colombia. Septiembre . 2007.
180. ZAPATA J., OSSA J., BEDOYA, ZULUAGA F. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB). Caracterización Molecular de una cepa Colombiana de Herpesvirus Bovino tipo 1. Revista Colombiana de Ciencias Agropecuarias. Col 15: 92-99. 2002.
181. ZULUAGA, F.N. Implicaciones Epidemiológicas de la RIB en Colombia. En: Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 2, # 1; p 45-48. 1979.
182. ZUÑIGA, I.; OSSA, J., e HINCAPIE, O. Prevalencia de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en reproductores del Uraba Antioqueño para 1977. Rev. Colombia Ciencia Pecuaria.1: 135–148. 1978.