



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

DINAMICA DE LA INFECCIÓN DE LOS VIRUS DEL COMPLEJO
RESPIRATORIO BOVINO: IBR,DVB,PI-3 Y VRSB Y EVALUACIÓN DE
LA RESPUESTA A LA VACUNACIÓN EN HATOS DE LA CUENCA DEL
VALLE DEL MEZQUITAL, HIDALGO

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA
SÁNCHEZ VALDEZ OSCAR.**

TUTOR: MC EDGAR ALFONSECA SILVA

**COMITÉ TUTORAL:
DRA. MARÍA ALEJANDRA AYANEGUI ALCÉRRECA
DR. HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA**

México, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA.

Dedico la presente tesis a mis padres Ing. Ramón Sánchez Martínez y Dra. Catalina Valdez Rubio que son fuente de inspiración para toda la gente. Y a las personas que necesitan un ejemplo de que se pueden hacer las cosas aún cuando no se crea

A mi hermano M.C. Ismael Sánchez Valdez por ser ejemplo de superación y por darme hospedaje en su casa

A mis hermanas Psicóloga Erika Sánchez Valdez y Dra. Gabriela Sánchez Valdez por ser fuentes de inspiración para mí

A mis amigos el estudiante de Veterinaria Gonzalo, Ingeniero Ofelio Hernández Gonzales, Oscar Pérez Ríos por su apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Edgar Alfonseca Silva y comité tutorial Dra. Alejandra Ayanegui Alcerreca y Dr. Humberto Ramírez Mendoza por la paciencia que me tuvieron.

A mi amiga Dra. Elizabeth Téllez Ballesteros por la invitación a estudiar la maestría y ayudarme durante esta.

Al CONACYT por las oportunidades que ofrece y por el apoyo económico.

A la UNAM y a la FMVZ por darme el conocimiento y estudios que necesito para la vida misma.

RESUMEN.

Las enfermedades respiratorias en el ganado bovino son la principal causa de muerte y de pérdidas económicas. La prevalencia se incrementa cuando los animales están sometidos a estrés, malas condiciones de alimentación y ambientales, entre otras. La morbilidad puede llegar al 100% y la mortalidad alcanzar rangos del 4 al 20%. Para determinar la seroprevalencia y dinámica de la infección de los virus de IBR, DVB, VRSB y PI-3, se realizó un muestreo aleatorio en ganaderías de engorda y establos lecheros, sin historia de vacunación, de la cuenca del Valle del Mezquital, Hidalgo (Localización: 20° 27'23" N 99° 11'48" Altitud 1745 msnm). Se obtuvieron muestras de sangre, por punción de la vena coccigea en tubos tipo vacutainer de 229 animales provenientes de 8 establos: 50 beceras, 32 vaquillas, 67 vacas y 80 toretes mediante muestreo aleatorio simple. Con el fin de comparar las seroprevalencias con otro centro de producción se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena coccigea en tubos tipo vacutainer, de todo el hato de CEPIPSA-FMVZ, ubicado en San Miguel Topilejo Distrito Federal (Localización: 19° 12' 33.31" N 99° 9' 11.75" W) con un total de 84 muestras que corresponden a vacas productoras de leche de la raza Holstein. Se realizó la detección de anticuerpos séricos para cada uno de los virus mediante la utilización de inmunoensayos enzimáticos comerciales (IDEXX y Pourquier) indirectas y competitivas correspondientes de cada virus. Para evaluar la respuesta a la vacunación se formaron 4 grupos de 7 animales de 6 meses de edad, de raza cebú con peso promedio de 300 kg seronegativos a virus IBR y DVB. La seroprevalencia promedio en el Valle del Mezquital para los virus del Complejo Respiratorio Bovino fue para IBR de 18.77 %, para DVB del 22.27%, VRSB 83.33% y para PI-3 58.33%. La dinámica de infección por edades, para IBR fue de 4% en beceras, 6.25% en vaquillas, 25.37% en vacas; en bovinos de engorda 27.5%. Para DVB fue de 8% en beceras, vaquillas 3.12%, vacas 14.92% y en bovinos de engorda 45%. Para VRSB fue de 33.33% en beceras, vaquillas, vacas y bovinos de engorda del 100%. Y para PI-3 fue, beceras 25%, vaquillas 100%, vacas 50% y bovinos de engorda de 58.33%. Las seroprevalencias en el otro centro de producción fueron iguales para los virus IBR y DVB. Los animales vacunados mostraron niveles de anticuerpos específicos para el virus de IBR, a partir de los 7-14 días posvacunación y al día 28 para virus de DVB. De los controles sin vacunar y expuestos al desafío natural, 14 % seroconvirtieron a los 7 días en el caso del virus de IBR y a los 28 días para el virus de DVB. La asociación de virus de la Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), virus de la diarrea viral bovina (DVB), virus de la parainfluenza tipo 3 y virus respiratorio sincital bovino, se ha demostrado en bovinos lecheros y de engorda, su control se basa en la combinación del manejo de las condiciones ambientales y la prevención de la infección por medio de la vacunación. A pesar de las pérdidas económicas que ocasionan los virus del CRB, no existen datos concretos de su prevalencia en bovinos del valle del Mezquital y por lo tanto, se dificulta la propuesta de medidas de prevención y control.

Palabras clave: Complejo Respiratorio Bovino; Valle del Mezquital; seroprevalencias; bovinos.

ABSTRACT.

Respiratory diseases in cattle are the leading cause of death and economic loss. The prevalence increases when animals are under stress, poor diet and environmental conditions, among others. Morbidity can approach 100% and the mortality ranges from 4 to 20%. To determine the prevalence and dynamics of virus infection of IBR, BVD, BRSV and PI-3, we performed a random sampling of broiler farms and dairy farms with no history of vaccination in the Valley of Mezquital, Hidalgo (Location: 20 ° 27'23 "N 99 ° 11'48" Elevation 1745 m). Blood samples were obtained by coccygeal venipuncture into vacutainer tubes of 229 such animals from stables 8: 50 calves, 32 heifers, 67 cows and 80 steers randomly. To compare the seroprevalence with another production center blood samples were obtained by puncturing the coccygeal vein into Vacutainer tubes type, whole-FMVZ CEPIPSA herd, located in San Miguel Topilejo Distrito Federal (Location: 19 ° 12 '33.31"N 99 ° 9' 11.75"W) for a total of 84 samples corresponding to dairy cows of the Holstein breed. We performed the detection of serum antibodies to each virus, using commercial enzyme immunoassays (IDEXX and Pourquier) indirect and competitive for each virus. To evaluate the response to vaccination was formed four groups of 7 animals 6 months of age, Zebu average weight of 300 kg seronegative to IBR and BVD virus. The seroprevalence in the Mezquital Valley for Bovine Respiratory Disease Complex virus IBR was for 18.77% to 22.27% of DVB, BRSV 83.33% and 58.33% PI-3. The dynamics of infection by age, for IBR was 4% in calves, heifers 6.25%, 25.37% in cows, beef cattle at 27.5%. For DVB was 8% in calves, heifers 3.12%, 14.92% cows and beef cattle 45%. For BRSV was 33.33% in calves, heifers, cows and beef cattle 100%. And for PI-3 was 25% calves, heifers, 100%, 50% cows and beef cattle of 58.33%. The seroprevalence in the other production center were similar for IBR and BVD virus. Vaccinated animals showed levels of specific antibodies to IBR virus, from 7-14 days post-vaccination and day 28 for DVB virus. Of the unvaccinated controls and exposed to natural challenge, 14% seroconverted after 7 days for IBR virus and 28 days for the virus DVB. The association of virus infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus, bovine viral diarrhea (BVD), parainfluenza virus type 3 and respiratory syncytial virus bovine, it has been demonstrated in dairy cattle and fattening, control is based on combining the management of environmental conditions and the prevention of infection through vaccination. Despite the economic losses caused CRB viruses, there are no specific data on its prevalence in cattle Mezquital Valley and is therefore difficult to propose measures of prevention and control. Keywords: Bovine Respiratory Disease Complex, Valle del Mezquital, seroprevalence, cattle.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Complejo Respiratorio Bovino	6
1.1.1 Factores anatomofisiologicos	6
1.1.2 Impacto económico	7
1.1.2.1 Analisis Economicos	8
1.1.3 Etiologia	9
1.1.4 Patogenia	10
1.1.4.1 Inmunologia	11
1.1.5 Metodos Diagnosticos	12
1.2 IBR	13
1.2.1 Taxonomía	13
1.2.2 Ciclo viral	14
1.2.3 Epidemiología	14
1.2.3.1 Distribución Mundial	15
1.2.3.2 Factores predisponentes	16
1.2.3.3 Impacto económico	16
1.2.3.4 Impacto en la producción	17
1.2.4 Presentación clínica	17
1.2.4.1 Patogénesis / Patogenia	19
1.2.5 Tratamiento, vacunas y manejo preventivo	20
1.2.5.1 Tipos de vacuna	20
1.2.6 Métodos diagnósticos	21
1.2.6.1 Directos	22
1.2.6.1.1 Aislamiento viral	22
1.2.6.1.2 Microscopía electrónica	23
1.2.6.1.3 Inmunofluorescencia	23
1.2.6.1.4 Inmunohistoquímica	23
1.2.6.1.5 PCR	24

1.2.6.1.6 Otros	24
1.2.6.2 Indirectos	25
1.2.6.2.1 Seroneutralización	25
1.2.6.2.2 ELISA	25
1.2.6.2.2.1 Competitiva	27
1.2.6.2.2.2 Indirecta	27
1.2.6.2.2.3 Otros	28
1.3 DVB	28
1.3.1 Taxonomía	28
1.3.2 Ciclo viral	28
1.3.3 Epidemiología	29
1.3.3.1 Distribución Mundial	29
1.3.3.2 Factores predisponentes	29
1.3.3.3 Impacto económico	30
1.3.3.4 Impacto en la producción	30
1.3.3.5 Presentación clínica	30
1.3.4 Patogénesis / Patogenia	34
1.3.4.3 Diagnóstico clínico	38
1.3.4.4 Diagnóstico diferencial	39
1.3.5 Inmunología	39
1.3.6 Tratamiento, vacunas y manejo preventivo	40
1.3.7 Métodos diagnósticos	42
1.3.7.1 Directos	42
1.3.7.1.1 Serología	42
1.3.7.1.2 Aislamiento viral	44
1.3.7.1.3 Inmunohistoquímica	44
1.3.7.1.4 PCR y RT-PCR	45
1.3.7.2 Indirectos	46
1.3.7.2.1 ELISA	46
1.4 PI-3	47

1.4.1 Taxonomía	47
1.4.2 Epidemiología	47
1.4.3 Cuadro clínico	48
1.4.3.1 Patogénia	48
1.4.4 Prevención control	49
1.4.5 Diagnostico de laboratorio	49
1.5 Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB)	50
1.5.1 Taxonomia	50
1.5.2 Epidemiologia	51
1.5.3 Presentación clínica	51
1.5.4 Patogenia	52
1.5.5 Prevención y control	53
1.5.6 Diagnostico de laboratorio	54
II. HIPOTESIS	54
III. OBJETIVO	55
3.1 Objetivo general	55
3.2 Objetivos particulares	55
IV. MATERIAL Y METODOS.	55
V. RESULTADOS.	58
5.1 Seroprevalencias	58
5.2 Respuesta a la vacunación	60
VI. DISCUSION	61
VII. CONCLUSIONES	66
VIII. BIBLIOGRAFIA	66
IX. ANEXO 1. FIGURAS	80

DINÁMICA DE LA INFECCIÓN DE LOS VIRUS DEL COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO: IBR, DVB, PI3 Y VRSB Y EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A LA VACUNACIÓN EN HATOS DE LA CUENCA DEL VALLE DEL MEZQUITAL, HIDALGO

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades respiratorias en el ganado bovino son la principal causa de muerte y de pérdidas económicas. La prevalencia se incrementa cuando los animales están sometidos a estrés, malas condiciones de alimentación y ambientales, entre otras. La morbilidad puede llegar al 100% y la mortalidad alcanzar rangos del 4 al 20% ¹. Las enfermedades respiratorias no dependen únicamente de la infección por un virus, una bacteria o ambos, sino de una serie de factores que condicionan la presentación de la enfermedad, lo cual hace sumamente difícil controlar todas las variables presentes.

La complicación más común y severa es el Complejo Respiratorio Bovino (CRB) en la que se encuentran involucradas bacterias y/o virus. En el caso de los virus podemos encontrar: virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), virus de la diarrea viral bovina (DVB), virus respiratorio sincitial bovino, virus de Parainfluenza-3, adenovirus, reovirus y coronavirus. En el caso de bacterias se encuentran agentes como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Chlamydomphila spp* y *Mycoplasma spp*. ²

Los agentes virales producen daño epitelial e inmunosupresión lo que favorece la proliferación de bacterias como *Mannheimia haemolytica* o *Pasteurella multocida*, causando problemas de neumonías y bronconeumonías que podrían ser de curso fatal, sobre todo en animales jóvenes o susceptibles. ³

1.1 Complejo Respiratorio Bovino (CRB)

El CRB no depende únicamente de la infección por un virus, una bacteria o ambos, sino de una serie de factores que condicionan la presentación de la enfermedad, lo cual hace sumamente difícil controlar todas las variables presentes. Entre éstas, por ejemplo, existen factores anatomofisiológicos que predisponen a los bovinos específicamente a padecer estos problemas y que no podemos controlar. ⁴

Hay otros factores incontrolables como los cambios bruscos de temperatura y algunas otras situaciones estresantes que afectan al animal. Si a esto se suman medidas de manejo como el transporte, castraciones y otros, es comprensible el hecho de que la enfermedad se presente aún en animales vacunados. ⁵

1.1.1 Factores Anatomofisiológicos

Los bovinos están en total desventaja comparativamente con otras especies animales en cuanto a su capacidad respiratoria. Se han determinado una serie de diferencias que predisponen al bovino a padecer con mayor facilidad las neumonías y una mayor dificultad para corregirlas. Entre estos factores predisponentes se encuentran: ⁶

1. Pleura poco distensible. La pleura del pulmón del bovino es más gruesa que la de otras especies animales, lo que la hace menos distensible y por lo tanto se requiere de un mayor esfuerzo para captar un volumen determinado de aire.
2. Pulmones pequeños. La proporción del tamaño del pulmón con relación al peso corporal del bovino es menor en comparación con la que poseen otras especies; por ejemplo, un bovino de 300 kg tiene pulmones más pequeños que un equino del mismo peso y lo mismo ocurre con el cerdo. El resultado de

lo anterior es que se necesita un esfuerzo extra para oxigenar el mismo volumen corporal.

3. Ángulo traqueo – bronquial. La unión de la tráquea con los bronquios en el caso del bovino es casi en ángulo recto, lo que ocasiona que las secreciones se acumulen en este punto, con ello se produce una obstrucción y dificultad tanto para respirar como para expectorar. Es común observar en animales que murieron de neumonía un tapón de secreción en esta zona anatómica.
4. Menor número de macrófagos alveolares. Comparativamente con otras especies existe un menor número de macrófagos alveolares/mm³ en el pulmón del bovino, lo que representa una menor capacidad defensiva ante el ataque de gérmenes patógenos.
5. Menor presión para el intercambio gaseoso. La presión gaseosa para el intercambio de oxigenación a nivel alveolar en la mayoría de las especies es de 95 mm de Hg, mientras que en el bovino es de 85 mm; es decir, 10 mm menos, que son necesarios para una mejor oxigenación.

1.1.2 Impacto económico

El CRB ha sido reportado como la enfermedad más costosa en ganado de carne. La NAHMS (National Animal Health Monitoring System) de los Estados Unidos, ha estimado pérdidas anuales, asociadas con enfermedad respiratoria, de aproximadamente 1 Billón de dólares.⁷

En ganado lechero, adicionalmente a las causas obvias de pérdidas económicas (como mortalidad, costos de tratamientos, etc.), los efectos tardíos correspondientes a la pobre tasa de crecimiento y una reducida producción de leche durante la vida productiva tienen gran importancia. De esta manera, se han reportado costos de US\$ 10.53 por vaca/año y US\$ 14.71 por becerro/año en lo que respecta a las secuelas dejadas por Enfermedad Respiratoria Bovina.⁸

1.1.2.1 Análisis Económico

Si se realiza una evaluación costo-beneficio entre los costos asociados con la intervención médica previa a la presencia del complejo contra los costos generados por la intervención médica terapéutica en animales que presentan la enfermedad, se tiene lo siguiente:

- Costo de vacuna de 50 dosis \$1,362.00.
- Costo de un aborto: \$5,000 (pérdida del producto (\$2,700), pérdida de la producción láctea, doble inseminación (\$1,000), incremento en el período de días abiertos, tratamiento con antibióticos (\$300), lavado de la matriz, manejo y veterinario (\$1,000)). El aborto es común en el 25 al 50% de los casos positivos.
- Costo de la enfermedad= suma de costos del tratamiento + disminución en la producción del hato.

CONCLUSIÓN: Costo de la intervención < costo del tratamiento

Al desarrollar el análisis en un ejemplo con un hato de 100 vacas productoras de leche se tiene lo siguiente:

Fórmula:

Costo vacuna < (seroprevalencia) (costo enfermedad) (eficacia de la vacuna)

En el ejemplo mencionado se considera que en una granja promedio se tienen los siguientes datos:

Seroprevalencia: 22%

Eficacia de la vacuna: 75%

Porcentaje de aborto: 25%.

Costo por 100 dosis: \$ 2,724

Al sustituir los valores:

$$2,724 < (0.22) (100) (5,000) (0.75) (0.25)$$

$$\text{\$ } 2,724 < \text{\$ } 20,625$$

CONCLUSIÓN: Es 8 veces mejor vacunar

Si se considera que el porcentaje de abortos fuera del 50% en dicho ejemplo, se considera que es 15 veces mejor vacunar.

En el caso de un hato de 100 becerros de ganado de engorda, donde el costo de un torete es de aproximadamente \$5, 000:

Se aplica la fórmula:

Costo de la vacuna < (costo por mortalidad) (seroprevalencia) (eficacia vacuna)

Mortalidad: 4%

Seroprevalencia: 45% en una engorda de 100 animales,

Eficacia de la vacuna: 75%

Costo por 100 dosis: \$ 2,724

Se sustituyen los datos:

$$2,724 < (0.04) (5,000) (45) (0.75)$$

$$\text{\$ } 2,724 < \text{\$ } 6,750$$

CONCLUSIÓN: Es 2.5 veces mejor vacunar preventivamente que

Por lo tanto, al productor se le recomienda vacunar en cualquier tipo de explotación, ya sea de engorda o de producción de leche.

1.1.3 Etiología

El CRB tiene como etiología la acción de virus, bacterias e inmunosupresión por estrés. Dentro de los agentes infecciosos involucrados se encuentran: ⁶

Virus:

- Parainfluenza Bovina tipo 3 (P13).
- Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR).
- Diarrea Viral Bovina (DVB).
- Virus Sincitial Respiratorio Bovino (BRSV).

Bacterias:

- *Mannheimia haemolytica* tipos A1 y A2 principalmente.
- *Pasteurella multocida* tipo A básicamente.
- *Mycoplasma spp* (asociado a *Pasteurella sp*).
- *Streptococcus spp.* (asociados a *Pasteurella sp.*).
- *Histophilus somni*.

La principal interacción entre estos gérmenes para producir enfermedad está dada por *Pasteurella sp.* + virus los cuales sinergizan su acción para lesionar y diseminarse en el pulmón.⁹

Este estudio se enfocará únicamente en los agentes virales mencionados.

1.1.4 Patogenia

La infección viral predispone a una infección bacteriana secundaria, pues los virus incrementan la susceptibilidad del tejido respiratorio, causando destrucción de los cilios o destruyendo las células epiteliales. Otros alteran la función de las células de defensa que fagocitan y limpian el tejido muerto y a las bacterias involucradas. Las formas de afección se resumen en los siguientes 3 puntos:¹⁰

1. Tienen un efecto inmunosupresor directo o dañan a los macrófagos y neutrófilos.
2. Inducen una inflamación tan severa que se destruyen las delicadas paredes alveolares.
3. Alteran la superficie de las células del tracto respiratorio favoreciendo la adherencia de las bacterias.

1.1.4.1 Inmunología

La interacción virus-bacterias-estrés ocurre como sigue:

El virus entra al animal por vía aérea y por su tamaño logra llegar a las células de la faringe, tráquea, bronquios y bronquiolos, introduciéndose en las células y replicándose en las mismas. Si el animal está en buenas condiciones físicas resolverá la infección mediante la fagocitosis y mecanismos de inmunidad innata. Pero si está inmunosuprimido por estrés (transporte, manejo, intervenciones quirúrgicas o aplicación de corticoesteroides) la proliferación viral se acentúa e incrementa la inmunosupresión. En este momento el bovino presenta fiebre e inapetencia, disminuye su consumo de alimento y está apático. Estos signos pueden pasar desapercibidos. El proceso dura entre 3 y 10 días. ¹¹

La destrucción de los epitelios, la congestión de los tejidos, las alteraciones de los mecanismos de inmunidad innata y funciones de los macrófagos y neutrófilos del pulmón, favorecen la proliferación bacteriana de asociación. ¹²

En este momento, el agente bacteriano (en este caso *Pasteurella sp.*) que se encuentra en la faringe del animal como parte de la microbiota, actúa como oportunista, se sale de control y prolifera, causando inicialmente una faringitis y acentuando el malestar del animal. Los microorganismos pasan mecánicamente a la tráquea, bronquios y bronquiolos, y se pueden distribuir sistémicamente por vía hematológica ó por vía linfática. Los fagocitos que actúen localmente acarrearán a los microorganismos hacia los linfonódulos. ⁹

Es de esperarse que, se lleve a cabo la destrucción de las bacterias en los macrófagos, pero no sucede así, pues se ha observado una alteración en los mecanismos microbicidas, pues se altera el mecanismo de destrucción del macrófago, principalmente el bloqueo de la fusión fago-lisosomal y la acción de toxinas contra los leucocitos ⁹ permitiendo de esta manera la supervivencia de las

bacterias y su proliferación en el tracto respiratorio. Al proliferar éstas, los niveles de endotoxinas se incrementan, provocando: ¹²

- Fiebre.
- Ruptura de endotelios vasculares, provocando hemorragias y dejando por lo tanto zonas sin irrigación (isquemia).
- Coagulación Intravascular Diseminada. Coágulos intravasculares, que se transforman en émbolos y posteriormente en infartos, dejando sin irrigación zonas de tejido que posteriormente se necrosa.
- Leucopenia.

Estos efectos tienen una acción directa sobre la circulación pulmonar y si recordamos que la pleura es menos distensible, el animal tendrá más dificultad para distender el pulmón y depurar la inflamación. Las secreciones se acumulan en el ángulo traqueobronquial, disminuyendo la luz de paso de aire y reteniendo gérmenes. La difusión del aire para la oxigenación se ve alterada al haber una perturbación en la presión sanguínea y diversas zonas del pulmón quedan afuncionales al mantenerse sin irrigación, forzando a las zonas sanas a responder a las exigencias respiratorias. La falta de oxigenación general por disfunción pulmonar, se acentúa cuando los niveles de endotoxinas en la sangre se encuentran elevados, provocando un shock vascular, con una vasodilatación central y vasoconstricción periférica, el corazón se somete a una sobrecarga y sobreviene la muerte. ¹¹

1.1.5 Métodos diagnósticos

El diagnóstico clínico tiene un indudable valor presuntivo e indicativo. Se establece en base a la información epidemiológica, la observación clínica y la obtención del cuadro anatomopatológico. El diagnóstico de laboratorio requiere fundamentalmente la disposición de las muestras patológicas adecuadas. Los fallos en la obtención y remisión de las muestras patológicas dificultan o impiden la consecución del diagnóstico. El trabajo de laboratorio comprende la realización de

los análisis microbiológico (bacterias y hongos), parasitológico, histopatológico y virológico. El análisis virológico es fundamental debido al papel preponderante de los diferentes virus que intervienen en este síndrome. Puede realizarse por métodos directos o indirectos. Los directos ponen de manifiesto el virus o el antígeno viral y comprenden los métodos de aislamiento en cultivos celulares, inmunofluorescencia, microscopía electrónica e inmunoenzimáticos. Los métodos directos tienen un gran valor diagnóstico si se realizan y aplican correctamente. Los métodos indirectos se basan en la comprobación de anticuerpos y no poseen valor diagnóstico a no ser que se efectúen sobre muestras pareadas de suero sanguíneo con el fin de determinar la seroconversión.¹⁰

A continuación se describirán a profundidad las características de los virus implicados.

1.2 Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR)

1.2.1 Taxonomía

La rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) es producida por el herpesvirus bovino tipo 1 HVB-1, clasificado dentro de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae* y género *Varicellovirus*³; posee cubierta lipídica, cápside icosaédrica y ácido nucleico ADN.²

Según el análisis genómico y tipo antigénicos, el HVB-1 se divide en HVB-1.1 y HVB-1.2.¹³

Respecto a su morfología, la parte interior del virion consiste en un centro que contiene el genoma viral protegido por una nucleocápside icosaédrica de 100 a 110 nm de diámetro construido por 150 hexámeros y 12 pentámeros. Esta estructura se encuentra rodeada por una capa proteínica, definida como el tegumento. La partícula viral madura mide de 120 a 300 nm de diámetro.¹³

El genoma de los alfaherpesvirus de rumiantes consiste en una doble cadena lineal de ADN.²

1.2.2 Ciclo viral

La familia Herpesviridae está dividida en tres subfamilias: Alfaherpesvirinae, Betaherpesvirinae y Gammaherpesvirinae. Los Alfaherpesvirinae tienen un ciclo de replicación relativamente corto (<24 h), con un rango variable de hospederos y generalmente causan rápida destrucción de las células en cultivo. Los miembros de esta subfamilia establecen infecciones latentes en células neurales. La mayoría de los herpesvirus de importancia veterinaria están en el género Varicellovirus.¹⁴

Los genes de los alfaherpesvirus se expresan en forma de cascada. El primer paso ocurre inmediatamente después de la liberación del genoma del virión proveniente de la cápside, esto produce proteínas inmediatas. El segundo paso ocurre después de la síntesis de proteínas inmediatas a proteínas tempranas. Durante el tercer paso se producen proteínas tardías y este paso se retrasa hasta después de la síntesis del ADN del virión. Finalmente, la expresión de proteínas tardías empieza después de la replicación viral del ADN.²

1.2.3 Epidemiología

La prevalencia en hatos depende de factores como el estado inmunitario de la madre, el periodo de la gestación en que ocurra la infección o si se manifiesta ésta, del tropismo y la virulencia del agente.¹⁵

Según Aguilar¹⁶ dentro de los factores epidemiológicos que parecen favorecer la diseminación del virus se encuentran:

- Alta densidad de animales en un espacio cerrado.

- Introducción continúa de animales que pueden estar infectados o ser portadores del virus en forma latente, reactivándose por el estrés de transporte y la aclimatación de un nuevo ambiente.
- Presencia de un elevado número de terneros destetados en el momento en que los anticuerpos maternos frente al IBR han disminuido, lo que ocurre aproximadamente a las 10 semanas de edad.

Para el 2007, en México, el SIVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica) notificó que de 4,307 muestras de bovinos remitidas para diagnóstico a nivel nacional para IBR, 2,117 fueron positivas, 2,114 negativas. Para un total de 50.9% de prevalencias del virus de IBR.

Para el estado de Hidalgo de 160 muestras para diagnóstico de IBR, 133 positivas y 22 negativas. Para un total del 83.12% de prevalencia.

1.2.3.1 Distribución Mundial

Los estudios realizados indican que la IBR tiene una distribución mundial y que su ocurrencia varía desde esporádica hasta enzoótica, en muchos países de América, Europa, Asia y Oceanía. En Sur América, la enfermedad ha sido diagnosticada en la mayoría de los países y, en Venezuela, las primeras evidencias serológicas se obtuvieron en la década del ochenta, realizándose el primer aislamiento del virus en el estado Portuguesa. La distribución mundial de infección de VHB-1 no implica que la diseminación de la enfermedad sea uniforme en todas las regiones, estados o localidades de un determinado país.¹⁵

En muestras enviadas al Centro Nacional en Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, entre enero de 1992 a febrero de 1996, se obtuvo una frecuencia de positividad al virus de IBR de 56.53% en 18 estados de la República Mexicana.¹⁷

1.2.3.2 Factores predisponentes

El virus de IBR puede mantenerse latente en los hatos, por la presencia de bovinos portadores de cepas de campo que se reactivan ocasionalmente bajo diversos estímulos con la consecuente replicación viral a través de los tractos respiratorio y reproductor, lo cual favorece la transmisión a los animales susceptibles. Esta situación hace que la IBR sea una enfermedad de gran difusión y de muy difícil control.¹⁸

Factores que conducen al establecimiento de animales portadores:¹⁶

- Animales enfermos que eliminan el virus por diferentes secreciones.
- Animales cuya inmunidad pasiva ha disminuido.
- Animales infectados sin signos clínicos aparentes.
- Animales infectados de modo latente.
- Animales en que la tasa de anticuerpos protectores ha disminuido considerablemente y son re-infectados.

1.2.3.3 Impacto económico

Desde un enfoque económico, la importancia de la IBR aún no ha sido evaluada completamente, pero se calcula que en diez años se remueve 18% del hato por enfermedades infecciosas, de las cuales es relevante el aborto.¹⁹

La IBR es una enfermedad enzoótica de notificación obligatoria en México por su efecto significativo en la producción pecuaria. Además, pertenece al grupo B del Código Zoosanitario Internacional por su importancia estratégica para las acciones de salud animal en cada país.²⁰

1.2.3.4 Impacto en la producción

En México, la IBR es una de las enfermedades infecciosas de gran importancia en los hatos lecheros, pues en la mayoría de los animales la enfermedad transcurre en forma subclínica; tiene como principal característica el aborto y como consecuencia la pérdida de la cría y la lactancia, afectando los parámetros reproductivos y productivos e incrementando notablemente las pérdidas económicas.²¹

1.2.4 Presentación clínica

Se han descrito 2 subtipos de HVB-1: HVB-1 subtipo 1 representan cepas que causan enfermedad respiratoria: rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR); mientras el subtipo 2 incluye cepas que causan enfermedad genital, como vulvovaginitis pustular Infecciosa (VPI) y balanopostitis Infecciosa (BPI). La forma genital conocida VPI-BPI es una infección venérea caracterizada por infertilidad temporal. Otras presentaciones incluyen dermatitis, mastitis y metritis y la forma encefálica descrita como una enfermedad altamente mortal en terneros.²²

La gran variedad de manifestaciones clínicas que acompañan a las infecciones por IBR y los diversos grados de intensidad de la misma dan lugar a confusión. No obstante, pueden clasificarse con formas clínicas diferentes^{23,24}:

a) Enfermedad del tracto respiratorio. Se manifiesta con temperatura, disnea, disminución del apetito, secreción nasal abundante que luego se transforma en mucopurulenta cuando comienzan las complicaciones secundarias con bacterias. A veces estos síntomas son acompañados de conjuntivitis, con secreciones claras que luego se transforman en mucopurulentas. Generalmente la opacidad de la córnea comienza desde la esclerótica.

b) Enfermedad del Tracto digestivo. Se presenta con diarrea y úlceras en mucosa con materias fecales blanquecinas. Pero resulta extremadamente difícil diferenciar tanto clínicamente como anatomopatológicamente estas lesiones de las lesiones producidas por el virus DVB u otros virus bovinos (ej.: Rotavirus) o bacterias (ej.: *Salmonella*).

c) Encefalomiелitis de los bovinos jóvenes. Se produce en ciertas ocasiones y es caracterizada por incoordinación y movimientos en círculo, o bien mirada sobre los flancos, hasta que finalmente se produce la muerte. Dada la similitud clínica con encefalopatías de otro origen (ej.: bacterias, tóxicos, priones, otros) es importante la confirmación del diagnóstico por laboratorio.

d) Vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV). Varios años atrás se le atribuía esta manifestación clínica a otro virus, hoy se reconoce como una única identidad etiológica. La vulvovaginitis pustulosa es la infección de la mucosa vaginal con secreción mucopurulenta. Muchas veces pasa desapercibida en cierta forma benigna, en otras las hembras adoptan una postura de dolor perineal característico y micción permanente. Aunque otros agentes (como *Mycoplasmas* y *Ureaplasma*) pueden presentar lesiones similares debe buscarse los mismos asociados a los síntomas respiratorios en el hato.

e) Muerte embrionaria y Abortos. Aunque mayoritariamente se presenta como abortos del último tercio, también son frecuentes las repeticiones de celo por esta virosis. Cuando existe un aborto generalmente presenta cierto grado de autólisis, edemas y tejidos friables. Esto es debido al tiempo entre la muerte del feto y su expulsión que es por lo general entre 8 y 45 días. Debe diferenciarse de algunas afecciones bacterianas como listeriosis, donde se observa una autólisis importante y retenciones placentarias o como la leptospirosis y brucelosis, que expulsan el feto rápidamente y no se observan autólisis marcada.

El VHB-1 puede persistir en forma latente en las neuronas ganglionares del trigémino o sacro, e incluso en las tonsilas. Bajo condiciones de estrés el virus puede ser reactivado y causar infecciones usualmente de tipo subclínica; siendo una fuente de infección para animales susceptibles.²⁵

Las lesiones típicas se encuentran en la superficie de las mucosas y se caracterizan por formar placas o pústulas blanquecinas adheridas debido a la existencia de necrosis que son el resultado de acúmulos de leucocitos, fibrina y células epiteliales necrosadas. En el tracto respiratorio son frecuentes en tráquea y conductos nasales. En el tracto genital su manifestación es la vulvovaginitis pustulosa en las hembras y la balanopostitis en el macho. Siempre es más frecuente que se encuentren lesiones graves en fetos y terneros recién nacidos que en animales adultos. En el feto abortado microscópicamente puede observarse necrosis focal en hígado, riñón y abomaso.²⁶

1.2.4.1 Patogénesis / Patogenia

El virus se transmite en forma directa por aerosoles o por contacto con animales infectados, a partir de secreciones respiratorias, oculares y del tracto reproductivo, o en forma indirecta a través de personas o equipos.²⁴

También se puede transmitir a través del semen, bien sea por monta natural o por inseminación artificial e incluso durante la transferencia de embriones.²⁷

Uno de los mayores problemas en el control de la infección del HVB-1 es la capacidad del virus de permanecer en estado latente y persistir así por largos períodos de tiempo o reactivarse periódicamente, como consecuencia de estrés fisiológico del animal o por tratamiento con corticoides.²⁸

La enfermedad tiene un periodo de incubación de 21 días, en promedio. Cuando la infección ocurre en forma subclínica aquella se caracteriza por la interrupción de la

gestación, lo cual sucede en 25% al 50% de las vacas gestantes; si la infección se establece tempranamente en la gestación puede provocar reabsorción embrionaria, pero si la muerte ocurre en los dos primeros trimestres de la gestación (cuando ésta es dependiente del cuerpo lúteo por progesterona) el intervalo entre la muerte fetal, la luteólisis y la expulsión es suficiente para la autólisis fetal. Generalmente el aborto ocurre en el tercer tercio de la gestación, en un tiempo no mayor a tres semanas en el que el feto está autolizado.¹⁵

1.2.5 Tratamiento, vacunas y manejo preventivo

Se cuenta con diferentes tipos de vacunas que se aplican una vez realizado el diagnóstico clínico y de laboratorio²⁹, o a partir de un programa sanitario preestablecido. En Europa y EUA la totalidad del ganado es vacunado contra IBR.³⁰

La inmunidad pasiva de anticuerpos maternos protege al becerro durante los primeros 30 a 45 días; luego es necesario la vacunación y revacunación para elevar el nivel de anticuerpos³¹. La recomendación de manejo no es sólo aumentar la protección sino evitar todas aquellas situaciones que aumenten el contagio y el estrés. Es importante considerar que las vacunas que hoy se utilizan no previenen de la infección, pero sí de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y sus perjuicios económicos.³²

1.2.5.1 Tipos de vacuna³³

Vacunas a virus inactivado modificado: se aplican intraparenteral o intranasal (aerosol). Dan buenos resultados pero con riesgo de producir abortos en vacas preñadas y ciertos síntomas respiratorios. Proveen buena inmunidad pues se aplican una vez en la vida. Puede ocurrir la eliminación de virus modificado al medio ambiente.

Vacunas a virus inactivado: los antígenos luego de su producción se inactivan y se formulan con diferentes adyuvantes acuosos u oleosos. Son vacunas muy seguras y se pueden aplicar en vacas preñadas. Se han desarrollado recientes avances tecnológicos con adyuvantes que tienen Selenio y que estimulan el desarrollo de anticuerpos.

Vacunas en base a subunidades víricas: están en fase de experimentación. El virus es tratado con detergentes no iónicos para romper las membranas del virus en pequeños fragmentos. Estos antígenos protéicos con actividad inmunológica requieren de adyuvantes que complementen su actividad y por lo general son necesarias varias dosis para lograr una buena inmunidad.

Vacunas polivalentes:

1. De componentes víricos exclusivamente. Por lo general además del HVB-1 (IBR) cepas T-1 y cepa T-2; se incluye el virus de la Diarrea Viral Bovina (BVD), con adyuvante oleoso.
2. Combinación de antígenos virales y bacterianos. Incluye las cepas T-1 y T-2.

1.2.6 Métodos diagnósticos

Existen métodos diagnósticos directos e indirectos.

Las técnicas rutinarias para el diagnóstico de IBR son indirectas e incluyen: seroneutralización, fijación del complemento, ELISA, neutralización viral, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.³⁴⁻³⁷

Se utilizan las siguientes muestras clínicas: hisopos nasales y oculares; hisopos vaginales y prepuciales; tráquea y pulmones; hígado fetal, riñón y pulmón; suero sanguíneo de animales enfermos y convalecientes. Las muestras deberán ser enviadas para aislamiento viral en cultivos celulares y titulación de anticuerpos.¹⁸

Frecuentemente se realiza un diagnóstico presuntivo con base en los signos clínicos y lesiones. Para el diagnóstico definitivo se requiere la demostración de las células infectadas mediante inmunofluorescencia, aislamiento e identificación del virus, o la demostración de un aumento significativo en el título de anticuerpos anti-IBR entre los sueros de la fase aguda y los de la fase de convalecencia. La inmunofluorescencia es el método preferido para el diagnóstico de abortos por IBR, porque el virus frecuentemente no es viable debido a la autólisis avanzada de los tejidos fetales.³⁸⁻³⁹

El virus es fácilmente aislado de las muestras clínicas por la inoculación de cultivos celulares de origen bovino. El virus induce un efecto citopático (ECP) característico en cultivos celulares. HVB-1 y HVB-5 no pueden ser diferenciados serológicamente por pruebas de rutina, debido a que muestran una gran reactividad serológica cruzada.³⁹

A continuación se explicarán los diversos métodos diagnósticos para IBR.

1.2.6.1 Directos

1.2.6.1.1 Aislamiento viral

El aislamiento viral tiene como inconveniente su lentitud, ya que tarda al menos una semana; además, requiere de equipo, material y personal especializados. Si las muestras no se trabajan inmediatamente o son almacenadas, deben congelarse a -70°C. En este método se incuban cultivos de células en monocapa, homólogas o primarias a 37°C y se observan diariamente para comprobar la aparición de efecto citopático, este efecto debe valorarse en comparación con cultivos no inoculados llamados testigos negativos, en especial en casos de virus que precisan periodos de incubación superiores a una semana.⁴⁰

Algunos autores mencionan que el diagnóstico en abortos sólo se confirma por

examen de tejido fetal. Aunque los diferentes aislamientos virales obtenidos de distintas formas clínicas de la enfermedad difieren en su afinidad por los distintos órganos, resultan serológicamente idénticos.¹⁵

A nivel oficial, para diagnóstico de IBR se debe utilizar la prueba de seroneutralización, que ha sido aceptada internacionalmente como prueba de referencia.³¹

Como consecuencia de lo anterior es necesario una prueba alternativa de equivalente valor o mejor especificidad, sensibilidad y más rápida para detectar apropiadamente a los animales y fetos infectados en las condiciones existentes en campo.³⁷

1.2.6.1.2 Microscopía electrónica

Por microscopía electrónica se pueden detectar partículas virales en muestras de tejidos pero la Inmunofluorescencia directa es la forma más rápida de diagnóstico etiológico.³⁶

1.2.6.1.3 Inmunofluorescencia

La prueba de inmunofluorescencia se utiliza para identificar antígenos o anticuerpos en material fresco (riñón y glándulas adrenales). La prueba indirecta es más sensible, pero no lo suficiente para justificar su uso, ya que es más demorada. En el examen directo de secciones congeladas de riñón fetal, la prueba tiene especificidad superior a 90% y sensibilidad de 67%.⁴¹

1.2.6.1.4 Inmunohistoquímica

Se realizan impresiones en láminas portaobjetos a partir de los tejidos sospechosos. Estos últimos se incuban con anticuerpos contra el virus de IBR

conjugados con una enzima, generalmente peroxidasa de rábano picante. Después de lavada, la impresión es tratada con el sustrato de la enzima y un cromógeno cuyos productos provocan una reacción coloreada directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Según Smith *et al.*, esta prueba tiene sensibilidad de 94%.⁴²

Esta técnica tiene dos ventajas para el diagnóstico; una es que no se necesitan microscopios equipados para la observación con luz ultravioleta y otra es que pueden fijarse directamente los cultivos celulares infectados en las mismas microplacas utilizadas para el aislamiento viral.⁴²

1.2.6.1.5 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN partiendo de iniciadores, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. Hoy, todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un termociclador.^{34,35}

1.2.6.1.6 Otros

Histopatológicamente se pueden localizar ciertos cuerpos de inclusión en células epiteliales de biopsias vaginales en la etapa primaria de la enfermedad (VPI). Otra forma sería por visualización directa en cortes de órganos por técnicas de inmunohistoquímica específica.⁴³

1.2.6.2 Indirectos

1.2.6.2.1 Seroneutralización

La prueba de seroneutralización tiene como fundamento buscar anticuerpos neutralizantes en el suero de los animales. Si se utiliza la incubación convencional del virus de 1 hora a 37°C, la prueba presenta una sensibilidad de 89.2% y especificidad cercana a 100%. Sin embargo, si los reactivos se incuban durante 24 h, es posible aumentar la sensibilidad a 94.4%, pero la especificidad disminuye a 93.2%. Una limitante de esta prueba es que sólo es certera en hatos donde no se vacuna.³⁷

1.2.6.2.2 ELISA

La técnica ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos ó anticuerpos inmovilizados que capturan antígenos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, de una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre.

Además se han propuesto y desarrollado diferentes métodos de amplificación de la señal (luminiscentes, cascadas enzimáticas,...) que han permitido elevar la sensibilidad de algunos ELISA a la obtenida en el RIA (radioinmunoensayo) hormonal.

Este método ha tenido una enorme aplicación en todos aquellos campos en los que se precisaba la cuantificación de productos mediante anticuerpos: diagnóstico

clínico, detección viral, clasificación de anticuerpos en isotipos, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc.

Los lectores ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la microplaca ELISA. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continua, los lectores de ELISA disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda. Son la que se corresponden con las necesarias para determinar la densidad óptica de los cromógenos más comúnmente utilizados.

Las 4 fases de un ensayo ELISA son las siguientes:

- A. Conjugación del anticuerpo o del antígeno con un enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina u otras). El anticuerpo conjugado con la enzima se emplea en los ensayos directos e indirectos, sandwich, etc. El antígeno marcado se emplea en ensayos de competición de antígeno.
- B. Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos. La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas.
- C. Formación de una o más capas de inmunocomplejos. En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa se incuba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frío frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno.
- D. Revelado de la reacción enzimática. Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el

sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (D.O.) mediante espectrofotometría.

Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten desde la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución (por ej. en el clonaje de anticuerpos monoclonales), o la determinación de la subclase (idiotipo) de un anticuerpo. A continuación se describen los más comunes.

1.2.6.2.2.1 Competitiva

ELISA directo (ensayo ELISA simple de dos capas). Las placas ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Indican la presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo de las analizadas (sangre, orina,...) pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado, o bien se le ha añadido).

1.2.6.2.2.2 Indirecta

Las placas ELISA se preparan de una forma idéntica a la anterior. Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno, y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpo secundarios por cada primario. Es el ensayo más popular, como lo es la inmunofluorescencia indirecta, pues un mismo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permite cuantificar una gran cantidad de antígenos.

1.2.6.2.2.3 Otros

ELISA *sándwich*. (ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos). Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado.

Así pues cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

1.3 Virus de la Diarrea Viral Bovina (VIRUS DE LA DVB)

1.3.1 Taxonomía

El virus de la DVB es un *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*. Se describe un sólo serotipo con variantes antigénicas y dos biotipos definidos por su capacidad de producir efecto citopático in vitro. El biotipo no citopatogénico (NCP), que es el que frecuentemente se aísla desde el síndrome DVB, es considerado el biotipo predominante, y el biotipo citopatogénico (CP) que se aísla, mayoritariamente, tanto en animales que sufren la Enfermedad de las mucosas (EM), pero últimamente también se ha aislado en cuadros de DVB aguda.^{45,46}

1.3.2 Ciclo viral

Son virus envueltos, esféricos y miden 40 a 60 nm de diámetro. Se componen de una cadena simple de ARN compactado por una cápside proteica, rodeada por una membrana fosfolipídica con tres glucoproteínas ancladas a ella.⁴⁷

La *genotipificación* es el método aceptado para clasificar a los *Pestivirus*. Bajo este sistema de clasificación el virus de la DVB se agrupa en 2 genotipos: Genotipo 1 y Genotipo 2 del virus de la diarrea viral bovina ⁶⁰. El genotipo I del virus de la DVB puede ser dividido en al menos 11 genogrupos y es muy probable que nuevos genogrupos sean revelados en futuros análisis. ⁴⁶

1.3.3 Epidemiología

Para el 2007, en México, el SIVE notificó que de 5,695 muestras de bovinos remitidas para diagnóstico a nivel nacional, 1,202 fueron positivas a DVB, 4,257 negativos. Para un total de 21.1% de positivos.

Para el estado de Hidalgo de 138 muestras para diagnóstico de DVB, 116 fueron positivas, 14 negativas, para un total del 84% de seroprevalencia.

1.3.3.1 Distribución Mundial

Esta enfermedad tiene una distribución mundial y la infección tiende a ser endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas. La mayoría de las encuestas en los diferentes países alcanza niveles de 0,5 a 2% de bovinos persistentemente infectados (PI) y 60 a 80% de bovinos seropositivos. ⁴⁷

1.3.3.2 Factores predisponentes

El virus de 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 y estado inmune del hospedador, respuesta inmune inducida, factores estresantes y otros patógenos concurrentes. ⁴⁹

1.3.3.3 Impacto económico

El mayor impacto económico de la infección con el virus de la DVB es el ocasionado por los trastornos reproductivos.⁵⁰

1.3.3.4 Impacto en la producción

La infección aguda altera la función ovárica y reduce la fertilidad. Un programa de muestreo para el diagnóstico y/o monitoreo de la evolución e impacto en la reproducción de esta enfermedad en un hato, se puede realizar muestreando un número de vacas. Estas deben muestrearse antes de entrar en servicio y remuestrearlas con periodicidad de 3-4 meses durante la gestación. Una clara conversión serológica asociada a problema reproductivo es indicador de la presencia de esta enfermedad y permite evaluar su impacto sanitario.⁵⁰

1.3.3.5 Presentación clínica

Pueden presentarse varios cuadros que se explican a continuación.

- a) **Diarrea viral bovina aguda.** Es una infección post natal aguda, de severidad variable, en bovinos seronegativos e inmunocompetentes.⁴⁷

- b) **Infección subclínica.** 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 postinfección y consecuentemente la protección contra reinfecciones por cepas homólogas del virus es de por vida.⁵¹

- c) **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 virus de la DVB o simplemente a una sumatoria de efectos.⁵²

d) Infección aguda severa. Inicialmente se prestaba poco interés a las infecciones agudas, dada su baja mortalidad. Sin embargo, cada vez son más frecuentes los informes de infección aguda severa de elevada morbilidad y mortalidad asociada con virus de alta patogenicidad caracterizada por fiebre elevada, signos respiratorios, diarrea, tormenta de abortos, caída en la producción de leche y muerte súbita. En otros casos, la exposición a cepas de alta virulencia ocasiona una enfermedad con signos clínicos y lesiones anatomopatológicas similares a la forma de enfermedad mucosa.^{53,54}

e) Síndrome hemorrágico. Virus del genotipo 2 del virus de la DVB se asocian a una condición fatal denominada síndrome hemorrágico. 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. Esta signología se atribuye a trombocitopenia y alteración de la función plaquetaria⁵⁵. 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 de estos mecanismos: 1) 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); 2) el virus se aísla de trombocitos y una interacción virus–plaqueta directa puede afectar la respuesta plaquetaria a la agregación; 3) aumento en la producción de sustancias inhibitoras de la agregación plaquetaria; los bovinos infectados con el virus de la DVB presentan altas concentraciones de prostaglandina E y óxido nítrico. Hay una fuerte correlación entre la fase trombocitopénica y la 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 una alteración y consumo de los trombocitos periféricos, más que una alteración en su producción.⁵⁶

- f) Enfermedades respiratorias. El virus de la DVB origina inmunodepresión sistémica y pulmonar, aumentando la patogenicidad de los restantes agentes respiratorios. Además, se ha demostrado que ciertos virus de la diarrea viral bovina actúan como agentes primarios de neumonías.⁵⁷

- g) Trastornos reproductivos. El virus de la DVB causa ooforitis intersticial no purulenta, con necrosis de células de la granulosa y de oocitos. Es posible detectar el antígeno viral en los macrófagos y células del estroma ovárico, entre los días 6 a 60 post infección, y en células foliculares y oocitos en distintos estados de maduración. Además, las infecciones agudas ocasionan un retraso en el desarrollo de los folículos pre-ovulatorios durante dos ciclos estrales consecutivos, 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.⁵⁸

El impacto del virus de la DVB durante la preñez se divide en cuatro períodos, en base a las manifestaciones clínicas de la infección durante estos intervalos de tiempo específicos.⁵⁹

Etapa embrionaria (0–45 días): Las infecciones de hembras susceptibles próximas al momento del apareamiento ocasiona muerte embrionaria y repeticiones de servicio hasta que desarrollen respuesta inmune. Se desconoce cómo 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 puede ser citolítico o no. Ambos terminan en muerte embrionaria, aunque la infección no citolítica también puede causar daño cromosómico, resultando 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.⁶⁰

Día 45 a 125 de gestación: Este período comienza al finalizar la etapa embrionaria y culmina cuando el feto adquiere competencia inmunológica al virus de la 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 en el nacimiento de animales persistentemente infectados e inmunotolerantes. Durante este período también se produce muerte fetal con momificación o aborto meses después y un pequeño porcentaje de teratogénesis.⁶¹

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 más 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 de timo, cataratas, microftalmia, degeneración de retina, hipoplasia y neuritis del nervio óptico, alopecias, hipotricosis, hipoplasia pulmonar, braquignatismo, artrogriposis, 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 los bajos niveles de hormonas tiroideas afectan la concentración de la enzima 2',3'-nucleótido cíclico-3'-fosfodiesterasa, esencial para la mielinización y el normal desarrollo del sistema esquelético. Se desconoce si el virus de la DVB induce fetopatías por un mecanismo semejante^{21, 49}. La inmunohistoquímica reveló abundante cantidad de

antígeno en 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 hormonal fetal originando trastornos del desarrollo esquelético.⁶²

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 normales o débiles; mientras que los abortos son ocasionales.⁶¹

Infección persistente. Un animal persistentemente infectado es aquél 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 originó 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. Otros son clínicamente normales, siendo indispensable el laboratorio para su diagnóstico.⁶³

Enfermedad mucosa. Esta condición solo ocurre en animales PI que sufren sobreinfección con biotipos CP homólogos. En esta forma se aíslan ambos biotipos, que son antigénicamente similares. El biotipo CP surge de mutaciones del biotipo NCP, aunque no se descartan fuentes externas. Es una forma esporádica, fatal, de curso agudo o crónico y se caracteriza por severa leucopenia, diarrea profusa, erosiones y ulceraciones en el sistema digestivo.⁶⁴

1.3.4 Patogénesis / Patogenia

Especial importancia adquiere esta virosis cuando la infección ocurre en la etapa reproductiva, ya que puede interferir con la concepción y la infección trasplacentar dependiendo de la edad de la gestación y de las características biológicas de la

cepa viral, puede producir muerte embrionaria o fetal, aborto, momificación, malformaciones congénitas, mortalidad perinatal, retraso en el desarrollo, respuesta inmune protectora o reconocimiento del virus como propio sin capacidad de responder inmunológicamente al virus y en este caso, si el animal sobrevive, queda con una infección persistente comportándose en vida extrauterina como portador inmunotolerante al virus y expuesto a cursar la EM que es siempre de curso fatal.⁶⁵

No está claro de qué manera el virus de la DVB altera la función ovárica, aunque es posible que actúe por uno o más de los siguientes mecanismos: 1) inadecuado soporte gonadotrófico por infección de la glándula pituitaria; 2) 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; 3) la necrosis de las células de la granulosa de los folículos pre-ovulatorios, afecta negativamente la secreción de estradiol y, consecuentemente, suprime la liberación de hormona luteinizante y retrasa o impide la ovulación; 4) la disfunción ovárica puede ser el resultado de la ooforitis y de los cambios en la concentración de citoquinas ováricas; 5) 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.⁶⁶

La transmisión puede ser vertical u horizontal, por contacto directo o indirecto.

Transmisión vertical. La infección transplacentaria ocurre en hembras susceptibles infectadas durante la preñez. Si el feto es infectado por biotipos NCP antes de adquirir competencia inmunológica (antes del día 125 de gestación, aproximadamente) desarrollará una infección persistente. Pese a la elevada tasa de mortalidad de los animales PI en su primer año de vida (más de 50%), muchos alcanzan la madurez sexual y se reproducen². Hembras PI siempre dan terneros PI. La transmisión vertical también ocurre luego de la transferencia embrionaria si

el recipiente es PI, o la vaca donante es PI y no se realiza el correcto lavado del embrión.⁶⁷

Transmisión horizontal. El *contacto directo* con animales PI, especialmente contacto nariz–nariz, es el modo más eficiente de transmisión en condiciones naturales. El contacto directo con animales que cursan una infección aguda también puede transmitir el virus.⁶⁷

Se ha demostrado experimentalmente la transmisión por vía aérea a corta distancia entre bovinos persistentemente infectados a bovinos centinelas. Aunque la transmisión aerógena no es la principal ruta de transmisión, puede tener consecuencias graves cuando cepas de alta virulencia afectan a poblaciones susceptibles y con alta densidad animal.⁶⁸

El semen crudo o criopreservado de toros PI o con infección aguda es una importante vía de transmisión horizontal. Para evitar el uso de estos animales, en los centros de inseminación se debe recurrir al aislamiento viral y a un período de cuarentena que supere la fase aguda de la infección. Sin embargo, un toro con infección aguda puede escapar al aislamiento viral en sangre, superar el período de cuarentena y seguir siendo una amenaza. El virus puede eliminarse en semen por un corto período más allá del último día de viremia y se han detectado toros fuertemente seropositivos no virémicos que eliminan persistentemente el virus por semen. Esta última situación se presenta cuando la infección ocurre en la pubertad, durante la formación de la barrera inmunológica hemato–testicular, permitiendo al virus replicarse dentro del testículo y evadir la respuesta inmune. Por lo tanto, es esencial un examen del eyaculado antes que el semen sea distribuido.⁶⁶

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 transferencia embrionaria

pueden estar contaminados. Los embriones producidos *in vivo*, con zona pelúcida intacta, recolectados de vacas infectadas natural o artificialmente, no actuarían como vectores para la transmisión de la enfermedad si se cumple con los procedimientos de lavado o lavado y tratamiento con tripsina recomendados por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria. Sin embargo, la presencia de una zona pelúcida intacta y los procedimientos de lavado, no garantizan que los embriones estén libres del virus, ya que pueden desarrollarse de oocitos infectados. Se ha demostrado que los oocitos soportan la replicación del virus de la DVB, pudiendo ingresar al oocito en forma directa o a través de las células del cumulus, las cuales son susceptibles al virus y están en estrecho contacto con el oocito por medio de procesos citoplasmáticos. Pese a que no se ha demostrado si estos oocitos infectados son capaces de desarrollarse hasta la ovulación, no debe descartarse el potencial de las células germinales para transmitir al virus de la DVB. Los embriones producidos *in vitro* son una fuente potencial de introducción del virus de la DVB. La zona pelúcida de embriones producidos *in vitro* presenta alteraciones estructurales y bioquímicas permitiendo al virus penetrar hasta aproximadamente 50% de su espesor, de manera que los procedimientos de lavado y tratamiento con tripsina no eliminan el virus. Sin embargo, no se ha determinado si la cantidad de virus asociado a estos embriones podría constituir una dosis infectiva para recipientes susceptibles vía intrauterina.⁶⁹

Experimentalmente se han demostrado varias vías *de transmisión indirecta* como el uso de agujas, palpación rectal y la acción de insectos hematófagos, minutos después de haber estado en contacto con animales PI. Sin embargo, su importancia práctica aún no está clarificada, ya que es un virus que se inactiva fácilmente. Es rápidamente inactivado por el calor, desecación, luz ultravioleta, detergentes, solventes orgánicos y pH que exceda el rango de 5,7 a 9,3. Otro modo importante de transmisión es el uso de vacunas a virus vivo modificado o vacunas contaminadas.⁶⁷

Transmisión entre rebaños. La principal forma de introducir el virus a un rebaño susceptible es a través de la *adquisición de bovinos PI* o hembras que transportan fetos PI. Otras vías de introducción son: el uso de vacunas vivas, semen contaminado, cohabitación con ovinos, transferencia embrionaria y el contacto con bovinos con infección aguda.⁶⁷

Transmisión dentro del rebaño. La tasa de transmisión dentro del rebaño depende de la forma de introducción del virus al mismo. Cuando un animal PI es introducido a un rebaño, la transmisión a animales susceptibles ocurre rápidamente a la mayoría de los animales del rebaño. Por el contrario, cuando la infección se inicia por 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 rebaño antes que la transmisión cese. El sistema de producción y la virulencia de la cepa también participan en la tasa de transmisión. La diseminación es más eficiente en sistemas de producción que permiten un estrecho contacto entre animales y con cepas virulentas.⁶⁷

1.3.4.3 Diagnóstico clínico

Los cuadros severos de diarrea viral (producidos por el genotipo II) se diagnostican principalmente por las lesiones anatomopatológicas y el aislamiento y/o inmunofluorescencia directa sobre diferentes órganos (linfonódulos mesentéricos, bazo, placas de Peyer, pulmón, timo).⁷⁰

El diagnóstico, de infección por el virus de la DVB, también se basa en la identificación de antígenos virales, directamente en tejidos infectados o en aislados realizados en cultivos celulares, siendo estos dos procedimientos de mayor significancia que la medición de la respuesta inmune. El diagnóstico de este problema se construye con una meticulosa anamnesis tanto mejor cuando mayores registros reproductivos y sanitarios se cuente en el establecimiento, una observación clínica detallada, una adecuada selección y recolección de muestras

que debe recibir un laboratorio con capacidad técnica para analizar la presencia de antígeno viral y anticuerpos específicos.⁷⁰

Considerando que este virus tiene capacidad para generar una respuesta inmune fetal, es necesario examinar tejidos fetales para encontrar antígenos (inmunofluorescencia directa) y suero fetal para detectar anticuerpos específicos (generalmente por técnica de ELISA).⁷⁰

1.3.4.4 Diagnóstico diferencial⁷⁰

El diagnóstico diferencial de estos problemas se debe realizar con los cuadros de salmonelosis, coccidiosis, paratuberculosis y parasitosis gastrointestinal.

El diagnóstico diferencial de los problemas reproductivos que produce la Diarrea Viral debe efectuarse con todas las enfermedades que producen infertilidad, repeticiones irregulares de celo, abortos y muerte perinatal.

El diagnóstico del cuadro de Enfermedad de las Mucosas es necesario dado la importancia que tiene esta enfermedad dentro del diagnóstico diferencial de Fiebre Aftosa. Ante una sospecha clínica y/o anatomopatológica de esta enfermedad, es conveniente comunicarse con el CENASA para que colecten las muestras necesarias como indican los protocolos ante cualquier sospecha, aunque sea remota, de Fiebre Aftosa u otra/s enfermedades exóticas como la Lengua Azul. Además, clínicamente puede confundirse con Fotosensibilización Hepatogena, Fiebre Catarral Bovina e IBR.

1.3.5 Inmunología

El virus de la DVB ocasiona leucopenia y altera las funciones de los leucocitos, aumentando la patogenicidad de microorganismos coinfectantes. Tiene una fuerte afinidad por el tejido linforreticular, ocasionando necrosis y atrofia de dichos

tejidos. En el tejido linfoide el virus se localiza principalmente en las células del estroma, incluyendo macrófagos y células de soporte. Estas células elaboran citoquinas esenciales para el normal desarrollo y maduración de 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. ⁵⁷

1.3.6 Tratamiento, vacunas y manejo preventivo

La erradicación de la diarrea viral bovina a nivel de rebaño es posible y, manteniendo el rebaño cerrado, mejora sustancialmente su salud y productividad. Las estrategias de erradicación dependen de la seroprevalencia, uso de vacuna, densidad poblacional y prácticas de manejo. ⁷¹

Erradicación sin vacunación. En regiones donde la seroprevalencia y la densidad poblacional es baja y no se emplean vacunas, la erradicación se basa en: 1) identificación de los rebaños con infección activa; 2) eliminación de animales PI del rebaño; y 3) medidas de bioseguridad o mantener rebaños cerrados para evitar la infección de rebaños libres. ⁷²

Erradicación con vacunación. En poblaciones bovinas con alta prevalencia de la enfermedad, donde no es posible mantener un rebaño cerrado o con estrictas medidas de bioseguridad, las estrategias de control deben incluir: 1) identificación de rebaños con infección activa; 2) eliminación de animales PI y 3) programa de vacunación en vacas y vaquillas. La vacunación por sí sola no elimina el virus del rebaño y su finalidad es proveer protección contra infecciones transplacentarias que den origen a terneros PI. ^{12, 72}

Experiencia europea. El impacto económico que causa el virus de la DVB ha llevado a numerosos países europeos a iniciar programas de erradicación. La isla de Shetland fue la primera región libre de diarrea viral bovina. ⁷³

El plan de erradicación a nivel nacional que implementaron Noruega, Finlandia, Suecia y Dinamarca provee un marco regulatorio para el control de las rutas de infección, determinación del estatus infeccioso de cada rebaño por examen serológico, por ELISA indirecto, de muestras de leche de tanque y/o de sangre de terneros entre 8 y 12 meses de edad, detección y eliminación de animales PI positivos a un ELISA basado en anticuerpos policlonales para la detección de antígeno en sangre, así como examen serológico anual para mantener el estatus libre de infección.⁷⁴

Los suecos iniciaron su plan de erradicación en el año 1993 y demostraron que ésta es posible aún sin vacunación. Aunque la participación en el programa es voluntaria y los productores pagan los costos del muestreo y las pruebas, el 100% de los productores lecheros (11.735 rebaños) y más del 99% de los productores de carne (13.834 rebaños) se encontraban afiliados en el año 2001. Ese año se declararon libres de virus de la DVB el 92.5% de los rebaños lecheros y el 88% de los establos de carne, en tanto que número de rebaños positivos continúa disminuyendo.⁷³

La experiencia danesa 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 rebaños de una región, ya que la principal vía de reintroducción del virus a un rebaño libre es a través del contacto directo o indirecto con rebaños PI.⁷⁴

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 testeo 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 rebaños no continúan con el programa luego del testeo inicial y eliminación de los bovinos PI.⁷³

1.3.7 Métodos diagnósticos

Debido al amplio tipo y severidad de lesiones inespecíficas, en ocasiones solo evidenciadas por microscopía, 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.⁴⁹

1.3.7.1 Directos

1.3.7.1.1 Serología

La distribución de anticuerpos en los distintos grupos de edades de rebaños con animales PI y sin animales PI, determina que existan 5 fases en el ciclo de infección⁷²:

- a) Fase A: Rebaños con infección aguda sin animales PI. Solo un pequeño porcentaje del rebaño será seropositivo.
- b) Fase B: Rebaños 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.
- c) Fase C: Rebaños infectados con animales PI mayores de 3–4 meses de edad. Usualmente, más del 90% del rebaño es seropositivo.
- d) Fase D: Rebaños 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. Los animales adultos permanecen seropositivos.

e) Fase E: Rebaño previamente infectado, donde los animales PI han sido removidos hace varios años. Todos los animales jóvenes serán seronegativos (excepto algunos terneros con anticuerpos calostrales). Eventualmente el rebaño se volverá seronegativo.

Estos estudios epidemiológicos han permitido desarrollar diferentes métodos serológicos para la detección de rebaños con infección activa (con bovinos PI) de manera simple, eficaz y económica.

El análisis serológico de una pequeña muestra de sangre tomada al azar de terneros de 6 a 12 meses de edad permite distinguir rebaños con infección activa, de rebaños sin bovinos PI, con un alto grado de seguridad. Se pueden cometer errores de clasificación cuando los rebaños poseen animales PI muy jóvenes, que no han tenido tiempo de infectar a los animales seronegativos remanentes, 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.⁷⁵

Medir el nivel de anticuerpos en leche almacenada en tanques también permite determinar el status infeccioso del rebaño y es ampliamente empleado en países que están controlando la enfermedad. Sin embargo, este método no distingue entre rebaños con animales PI y rebaños donde dichos animales han sido recientemente eliminados, debido a que los títulos de anticuerpos en la leche declinan lentamente. Se recomienda el uso de este método en las fases finales de un programa de erradicación y en la vigilancia de rebaños libres.⁷⁴

Una vez identificados los rebaños con infección activa, se debe probar individualmente a los animales para detectar a los bovinos PI. Para ello contamos con métodos diferentes.

1.3.7.1.2 Aislamiento viral

El aislamiento viral es el método de referencia, es 100% específico y altamente sensible. Sin embargo, es económicamente prohibitivo para ser usado en el diagnóstico de animales PI en un programa de control y erradicación. El cultivo celular se ha optimizado con el sistema *microtitre multi-well*, donde células cultivadas en placas con múltiples pocillos son inoculadas con 10 a 50 µl de suero problema e incubadas por 4 días; la presencia de biotipos NCP se detecta con el empleo de anticuerpos anti-virus de la DVB marcados con peroxidasa o fluorocromos.⁷⁶

1.3.7.1.3 Inmunohistoquímica

La IHQ se realiza, rutinariamente, en tejido fijado en formalina y embebido en parafina; aventajando a otras técnicas en términos de conveniencia en la remisión de las muestras, posibilita el estudio retrospectivo de muestras enviadas para examen histopatológico y permite una precisa asociación entre el antígeno viral con tipos celulares y lesiones histológicas.⁷⁶

La IHQ de tejidos fijados en formalina es el método diagnóstico más conveniente para la detección del virus de la DVB en fetos. Hay un significativo número de resultados falsos positivos y falsos negativos con la inmunofluorescencia (sensibilidad: 77%, especificidad: 83%), y significativo número de falsos negativos 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 de antígeno por ELISA.⁷⁷

La presencia del antígeno del virus de la DVB 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 colección 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, y los anticuerpos calostrales no interfieren con la técnica, permitiendo analizar terneros neonatos.⁷⁸

La inmunoreacción en piel de bovinos PI permite visualizar al virus de la 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 virus de la DVB 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 empleo de muestras de pelo para el diagnóstico rutinario de estos animales, ya que pese a ser sumamente 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. Se recomienda la utilización de anticuerpos policlonales para el diagnóstico inmunohistoquímico del virus de la DVB en tejidos fijados en formalina al 10%.⁷⁹

1.3.7.1.4 PCR y RT-PCR

Detección del ácido nucleico viral. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método rápido, sensible, que detecta diversos virus de la DVB 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.⁸⁰

Para detectar anticuerpos se utiliza la técnica de ELISA, al igual que para detectar antígeno viral en PI. Para la detección de estos animales también puede intentarse un aislamiento viral.

1.3.7.2 Indirectos

1.3.7.2.1 ELISA

Detección de antígenos mediante inmunoensayo enzimático (ELISA). La prueba de ELISA utiliza anticuerpos monoclonales o policlonales para “capturar” antígenos del virus de la DVB en muestras de sangre.

Comparado con el aislamiento viral, es un método rápido y económico, por lo tanto, es el método de preferencia para la detección a gran escala de animales PI.

⁸²

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 virus de la DVB. 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 epitope específico son cuestionables, debido a que su estrecho rango de especificidad puede fallar en detectar algunas cepas del virus de la DVB.⁸³

1.4 Virus Parainfluenza 3 (PI3)

1.4.1 Taxonomía

Este agente pertenece al género de los paramixovirus, que tienen una amplia distribución en el hombre y los animales. Los parainfluenza virus se asocian a procesos respiratorios que se complican con infecciones bacterianas. Existen tres tipos que afectan a los mamíferos, de los cuales el tipo 3 es el que afecta a los bovinos.⁸⁴

Pertenece a la familia Paramyxoviridae, género Paramyxovirus. Es un virus de RNA. Es hemoaglutinante, hemoadsorbente. Se destruye a pH ácido (<3), así como por desinfectantes comunes (fenol, isopropanol, éter, cloroformo, etc.).⁸⁴

1.4.2 Epidemiología

Se ha demostrado en algunos países la prevalencia de este virus es hasta un 90% en animales clínicamente sanos y se ha detectado que el virus por sí solo, (sin infección bacteriana secundaria) es capaz de producir enfermedad, sobre todo en becerros, provocando: fiebre, lagrimeo, secreción nasal serosa, depresión, disnea, tos. En adultos se presenta inmunidad adquirida por exposición al virus. Tiene amplia distribución. La morbilidad es de moderada a alta. La letalidad es baja (5-10%) si se produce sólo el proceso vírico. En complicación bacteriana puede llegar al 50%.¹⁰

La transmisión del virus es fundamentalmente aerógena, es decir, se elimina por descargas nasales y se introduce mediante la inhalación. Se han detectado anticuerpos en porcinos y equinos, pero nunca enfermedad por lo que se consideran reservorios.⁸⁵

1.4.3 Cuadro clínico

Se puede manifestar un cuadro clínico de 3 formas: proceso agudo, forma subaguda o forma leve. La forma leve se produce cuando hay ciertas tasas de anticuerpos que no protegen pero neutralizan la acción del virus. Suele darse en animales entre 6 y 7 meses.⁸⁶

La forma aguda es más intensa que la subaguda: animales con hipertermia de 41-42°C, inapetencia, cansancio, fuerte patología respiratoria (disnea, lagrimeo, secreción nasal, taquipnea, tos) de forma intensa. En el curso de 3-5 días se produce la muerte.⁸⁶

En la forma subaguda se observan temperaturas de 40-41°C, diarrea menos marcada, secreción nasal serosa o seromucosa que puede llegar a ser mucopurulenta.

Las lesiones son intensas en las dos formas porque el curso es más lento. En general produce cuadros sobreagudos en casos de más de 24 horas. En los casos sobreagudos no se observan tantas lesiones.⁸⁷

1.4.3.1 Patogenia

Hay células epiteliales de vías respiratorias altas y bajas que multiplican el virus. Esto produce fiebre y viremia, posteriormente el virus se multiplica en el parénquima pulmonar de bronquios y alvéolos. Muchos animales presentan signos leves de la enfermedad, pero desarrollan neumonía intersticial, a raíz de la cual se observan zonas de consolidación en los lóbulos anteriores y cardiacos. También puede haber enfisema e inflamación de nódulos linfáticos mediastínicos.⁸⁷

Normalmente la infección tiene un curso de 3 a 4 días y los animales se recuperan si no se presenta una infección bacteriana secundaria. Cuando hay infecciones

bacterianas secundarias, frecuentemente ocurren por *Pasteurella multocida* o *M. hemolytica*, en cuyo caso se desarrolla un cuadro corrientemente referido como fiebre de embarque. De otra manera, es común encontrar coinfección con los virus de la IBR, DVB y con el virus respiratorio sincitial.⁸⁸

1.4.4 Prevención y control

Para la prevención y control de la PI-3, es necesario mantener un buen estado inmunitario de los rebaños, lo cual se logra mediante la aplicación de vacunas contra estas enfermedades.⁸⁹

En el mercado existen vacunas monovalentes que inducen inmunidad contra una enfermedad y vacunas polivalentes que inducen inmunidad contra dos o tres de estas enfermedades. Algunas vacunas son a virus activo modificado (VVM) y otras son a virus inactivado.⁹⁰

1.4.5 Diagnóstico de Laboratorio

Su confirmación requiere del aislamiento del agente etiológico y de la comprobación serológica. Esto es, la detección de la aparición de anticuerpos contra el virus o el incremento significativo de los niveles de anticuerpo contra ese virus cuando se analizan dos muestras de suero de un mismo animal recolectadas, en forma consecutiva, una al inicio de los signos clínicos y la segunda tres o cuatro semanas después. Razón por la cual ambas muestras de suero tienen que ser recolectadas, preferiblemente en tubos vacutainer estériles y conservadas congeladas o refrigeradas. De igual manera, deben incluirse sueros de animales aparentemente sanos y de animales recuperados. Todas las muestras deben enviarse al laboratorio lo antes posible y conservadas en hielo.⁹¹

Para el aislamiento viral se requiere recolectar, en la fase inicial de la enfermedad, muestras de secreciones nasales, oculares, genitales o de heces y conservarlas

congeladas o refrigeradas en 1 o 2 ml de solución de Hanks o PBS, con doble concentración de antibióticos. De no ser posible, en suero fisiológico estéril.⁹¹

En forma similar muestras de sangre con anticoagulantes (conservada refrigerada), así como fetos o trozos de órganos de necropsias (pulmón, riñón, bazo, ganglios mesentéricos, etc.) mantenidos en envases con suero fisiológico-glicerinado 50% v/v; en congelación preferiblemente o en refrigeración a 4°C. En forma general, para mejores resultados, las muestras deben llegar al laboratorio dentro de 6 a 12 horas después de la recolección.⁹¹

Como todos los paramixovirus, el PI-3 tiene las proteínas externas que hemoaglutinan, por lo que la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI) permite realizar en el suero la presencia de anticuerpos contra el virus, las pruebas inmunoenzimáticas de ELISA y SN, también detecta presencia de anticuerpos circulante con mayor especificidad que la HI. Ambas pruebas se requieren realizar en condiciones controladas de laboratorio con especialización en virología. El aislamiento del virus a partir de tejidos infectados, su identificación por métodos como la microscopía electrónica, o indirectos como la inmufluorescencia, son los métodos más eficientes, sin embargo de alto costo y de mucha labor de los laboratorios.⁹²

1.5 Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB)

1.5.1 Taxonomía

Pertenece a la familia Paramyxoviridae, al género Neumovirus. Es un virus de RNA. También es lábil en pH ácidos y se inactivan por desinfectantes como el isopropanol, fenoles, éter, cloroformo, etc. No es hemoaglutinante a diferencia del virus de PI3.⁹³

Mediante microscopía electrónica, la morfología de los viriones es pleomórfica, redondeada y con un diámetro entre 150 y 35 nm; también se puede observar en filamentos con una longitud que puede alcanzar 5 µm y un diámetro entre 60 y 100 nm ⁹⁴. A pesar de dicha estructura, cada partícula infecciosa contiene una copia funcional del genoma.

1.5.2 Epidemiología

Se distribuye ampliamente. Las especies a las que afecta son los bovinos, ovinos y caprinos. ⁹⁵

Afecta principalmente a becerros, particularmente cuando estos se encuentran confinados en invierno. El rango más frecuente es de 2-4½ meses. Los animales mayores de 3 meses tienen un cuadro menos grave que en los más jóvenes. ⁹⁶

La transmisión es aerógena por inhalación del virus y se elimina por secreción nasal. La morbilidad es de moderada a alta. La letalidad es como mínimo del 12%, generalmente en los mejor nutridos. Se eleva si hay complicación bacteriana o por otro agente vírico. ^{92,97}

1.5.3 Presentación clínica

El periodo de incubación se da entre 2 y 5 días. La infección puede ser asintomática, limitada a las vías respiratorias altas o puede involucrar tanto las vías respiratorias altas como las bajas. Hay dos posibles manifestaciones: forma aguda y forma atenuada. Cuando hay primoinfección, suele darse la forma aguda. ⁹⁸

La forma aguda se manifiesta por un cuadro gripal: hipotermia hasta 42°C, decaimiento, inapetencia, lagrimeo, secreción nasal serosa, tos y disnea. Parece que mejoran y, a los 3 días ó 1 semana, se presenta tos y disnea más intensas. A

la auscultación de los campos pulmonares se escuchan sonidos anormales debido a la bronconeumonía y se puede detectar bronquiolitis. La forma atenuada se suele presentar en animales que ya experimentaron el proceso y vuelven a presentarlo de nuevo. Presenta una sintomatología parecida a la anterior pero en menor grado.⁹⁹

A la necropsia, se observa neumonía bronco-intersticial. Diversas áreas craneoventrales están consolidadas con contenido mucopurulento en bronquios y bronquiolos. La porción dorso caudal de los pulmones se observa distendida debido a las lesiones enfisematosas lobulares, interlobulares y subpleurales. Los linfonodos traqueobronquiales y mediastínicos pueden estar agrandados, edematosos y algunas veces hemorrágicos. Con infección bacteriana, el parénquima está más inflamado, consolidado y con fibrina o bronconeumonía supurativa.¹⁰⁰

Las lesiones microscópicas se caracterizan por una bronquiolitis proliferativa y exudativa acompañada por colapso alveolar e infiltración de células mononucleares peribronquiales. Se puede observar necrosis epitelial y células epiteliales apoptóticas que pueden ser fagocitadas por células vecinas formando sincitios o células gigantes, que también pueden observarse en el lumen y epitelio bronquiolar y en las paredes alveolares y alveolos.¹⁰¹

1.5.4 Patogenia

No está tan conocida. Se asume que puede estar relacionada con la reacción de hipersensibilidad retardada. El epitelio no es la diana, porque no se inhiben los cilios de la célula del epitelio y la presencia antigénica es abundante en el tejido conectivo peri traqueal.¹⁰²

Las principales lesiones que induce este virus se ubican en la pared alveolar, así mismo los cilios de los bronquios se encuentran afectados. Además, se asocian

lesiones en el pulmón, mediadas por la activación de aminas vasoactivas como: serotonina, histamina-bradiquinina de las células ubicadas en la pared de los alvéolos. La liberación de estos compuestos producen enfisema y edema del parénquima pulmonar, la activación del complemento, también participa en los cambios descritos.¹⁰³

Los macrófagos alveolares aparentemente no son infectados por el virus en forma natural. Experimentalmente se logra la infección de macrófagos alveolares bajo determinadas circunstancias. Tal parece ser que el principal mecanismo de patogenicidad es la cilioestasis y ciliolisis del epitelio bronquial, aunado a las lesiones de neumocitos I y II de los alvéolos.¹⁰³

El VRSB se replica en la lámina superficial del epitelio respiratorio ciliado así como en los neumocitos tipo II. La infección por el virus en células epiteliales y macrófagos alveolares resulta en la activación de NF-κB lo que conduce a la inducción de quimiocinas y citocinas inflamatorias tales como RANTES (CCL5), MIP-1α (CCL3), MCP-1 (CCL2), eotaxina (CCL11), IL-8 (CXCL8), TNF-α, interleucinas (IL)IL-6, IL-1, etc, esto contribuye al reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y linfocitos a las vías respiratorias.¹⁰⁴

1.5.5 Prevención y Control

Debido a que el pico de incidencia de la enfermedad por VRSB ocurre entre los 2 y 6 meses, la vacuna más efectiva será aquella capaz de estimular una respuesta inmune en los primeros meses de vida; sin embargo, la presencia de anticuerpos maternos es el principal obstáculo para la vacunación exitosa en esta etapa. Además existe la evidencia de estudios en el humano en los que la vacunación exacerbó la enfermedad.¹⁰³

Es posible que una vacuna parenteral de virus inactivado no pueda ser efectiva para inducir una respuesta de anticuerpos IgA, lo que ayudaría a limitar la

infección del tracto respiratorio, así como tampoco sería efectiva en la generación de células TCD8+ específicas, lo que es muy importante para eliminar el virus. Por lo tanto, la ausencia de una suficiente respuesta inmune protectora sistémica y de las mucosas aunado a la vacunación permite la infección natural por el virus. Pero sí se genera una respuesta inmunopatogénica mediada por la deposición de complejos inmunes y activación del complemento en los pulmones y /o la inducción de respuesta inmune basada en Th-2 lo que resulta en un reclutamiento exagerado de otras células inflamatorias hacia los pulmones. ¹⁰⁵

Se ha propuesto que la infección natural del VRSB no predispone a una enfermedad severa hasta las subsecuentes exposiciones al virus. Una vacuna de virus vivo atenuado podría inducir la respuesta inmune más protectora. Así mismo, la ruta de vacunación en mucosas es más resistente a los efectos inmunosupresores de los anticuerpos maternos en comparación con la ruta de administración parenteral. ¹⁰⁶

1.5.6 Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la infección de BRSV por lo general ha sido realizada a través del aislamiento del virus, inmunofluorescencia de antígenos virales en las secreciones y tejidos y / o demostración de seroconversión. Así mismo, se han reportado estudios diagnósticos mediante ELISA y fijación del complemento. ¹⁰⁷

II. HIPOTESIS

Los virus del complejo respiratorio bovino están presentes en todas las etapas productivas en hatos bovinos lecheros y de engorda, impactando de manera importante las prevalencias.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar la dinámica de infección, en las diferentes etapas de producción lechera y fin zootécnico, de los virus del Complejo Respiratorio Bovino (DVB, HBV-1, VRSB y PI-3) en bovinos de la cuenca lechera de Ixmiquilpan Hidalgo, mediante ELISA y comparación de seroprevalencia con el hato lechero de CEPIPSA-FMVZ (Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal), ubicado en el sur de la Ciudad de México.

3.2 Objetivos Particulares

1. Determinar la seroprevalencia de los virus del Complejo Respiratorio Bovino en una explotación lechera de Hidalgo.
2. Determinar la presencia de anticuerpos en las diferentes etapas productivas de dichos bovinos contra los virus del Complejo Respiratorio Bovino.
3. Determinar la dinámica de infección de los virus del Complejo Respiratorio Bovino, en las diferentes etapas productivas y fin zootécnico de los bovinos.
4. Determinar la respuesta serológica a la vacunación con la vacuna pentavalente en un hato con seroprevalencia de 18 a 22% de virus de HVB-1 y DVB.
5. Comparar las seroprevalencias obtenidas con otro centro de producción de ganado bovino lechero en otra área geográfica diferente.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Seroprevalencia y dinámica de los virus

Para determinar la seroprevalencia y dinámica de la infección de los virus de HVB-1, DVB, VRSB y PI-3, se realizó un muestreo aleatorio en ganaderías de engorda y establos lecheros, sin historia de vacunación, de la cuenca del Valle del Mezquital, Hidalgo (Localización: 20° 27'23" N 99° 11'48" Altitud 1745 msnm).

Se obtuvieron muestras de sangre, por punción de la vena coccigea en tubos tipo vacutainer de 229 animales provenientes de 8 establos: 50 becerras, 32 vaquillas, 67 vacas y 80 toretes mediante muestreo aleatorio simple.

Con el fin de comparar las seroprevalencias con otro centro de producción se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena coccigea en tubos tipo vacutainer, de todo el hato de CEPIPSA-FMVZ, ubicado en San Miguel Topilejo Distrito Federal (Localización: 19° 12' 33.31" N 99° 9' 11.75" W) con un total de 84 muestras que corresponden a vacas productoras de leche de la raza Holstein.

Se realizó la detección de anticuerpos séricos para cada uno de los virus mediante la utilización de inmunoensayos enzimáticos comerciales (IDEXX y Pourquier) indirectas y competitivas correspondientes de cada virus.

Respuesta a la vacunación:

Para evaluar la respuesta a la vacunación se formaron 4 grupos de 7 animales de 6 meses de edad, de raza cebú con peso promedio de 300 kg seronegativos a virus HVB-1 y DVB, donde este número es suficiente para probar una diferencia de 0.5 al 98 entre grupos con un $\alpha=0.05$ (confianza 95%) y una potencia estadística del 80% ($\beta=0.2$) cálculos basados en Snedecar y Cochran, statistical methods, 8va. ed. 1989, pag 69(power Calculator Epicenter Masserg Univ. (<http://epicenter.masseg.ac.nz>)).

En el cuadro 1 se señalan los grupos de animales el producto en prueba, la vía, régimen y dosis administrados.

En el cuadro 2 se observan los muestreos realizados. Se realizaron muestreos en los 4 grupos de 7 animales negativos a los 7, 14, 21 y 28 días posteriores a la vacunación para analizar en el suero los niveles de anticuerpos contra los virus del Complejo Respiratorio Bovino (DVB y HBV-1). Se probaron 2 vacunas

comerciales (Titanium 5 ®¹ y Pyramid 5 MLV ®²)³; así mismo, se determinó el tiempo de seroconversión mediante ELISA.

Cuadro 1. Administración de productos

Grupos	Numero animales	Producto en prueba	Vía de admon.	Régimen	Dosis
Grupo A	7	Titanium®	SC	Dosis única	Una dosis comercial
Grupo B	7	Titanium® mas Ultracorn®	SC	Dosis única Dosis única	Una dosis comercial 2ml/100kg
Grupo C	7	Bovishield Gold FP 5 L5®	IM	Dosis única	Una dosis comercial
Grupo D	7	Testigo, solución salina	SC	Dosis única	2ml

Cuadro 2. Muestreo y vacunación

DIAS	0 (120408)	7 (100408)	14(260408)	21(030508)	28(090508)
SANGRADO	X	X	X	X	X
ELISA	X	X	X	X	X
VACUNACION	X				

¹ Laboratorio Virbac

² Laboratorio Fort Dodge

³ Ambas vacunas contienen los siguientes virus: Virus de la DVB tipo 1; Virus de la DVB tipo 2; Herpesvirus tipo 1 (HVB-1), también llamado Virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR); Virus de la Parainfluenza-3 (PI3); y Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB).

Análisis estadístico.

Los tratamientos se compararon por análisis de varianza factorial, seguido de comparación múltiple de Tukey por cada tiempo de muestreo (JMP v5.0.1 para Windows, SAS Institute) Los valores se expresarán como media y desviación estándar de la media. Valores de $P < 0.05$ se consideran significativos.

V. RESULTADOS

5.1 Seroprevalencias

La seroprevalencia promedio en el Valle del Mezquital para los virus del Complejo Respiratorio Bovino fue para IBR de 18.77 %, para DVB del 22.27%, VRSB 83.33% y para PI-3 58.33% (cuadro 3).

Cuadro 3. Seroprevalencia en el Valle del Mezquital, Hgo.

VIRUS	SEROPREVALENCIA
IBR	18.77%
DVB	22.27%
VRSB	83.33%
PI-3	58.33%

La dinámica de infección por edades, para IBR fue de 4% en becerras, 6.25% en vaquillas, 25.37% en vacas; en bovinos de engorda 27.5%. Para DVB fue de 8% en becerras, vaquillas 3.12%, vacas 14.92% y en bovinos de engorda 45%. Para VRSB fue de 33.33% en becerras, vaquillas, vacas y bovinos de engorda del 100%. Y para PI-3 fue, becerras 25%, vaquillas 100%, vacas 50% y bovinos de engorda de 58.33% como se observa en la Cuadro 4.

**Cuadro 4. Desglose de seroprevalencia por enfermedad y finalidad
zootécnica**

Etapa	IBR	DVB	VRSB	PI-3
Becerra	4%	8%	33.33%	25%
Vaquilla	6.25%	3.12%	100%	100%
Vaca	25.37%	14.92%	100%	50%
Torete	27.5%	45%	100%	58.33%

Las seroprevalencias para IBR y DVB fueron diferentes entre cada establo

Cuenta de ESTABLO	DVB		
ESTABLO	0	1	Total general
1	68	7	75
2	21	1	22
3	6	3	9
4	7	1	8
5	4	2	6
6	9		9
7	1	28	29
8	34	8	42
9	28	1	29
Total general	178	51	229

Cuenta de ESTABLO	IBR		
ESTABLO	0	1	Total general
1	64	11	75
2	20	2	22
3	5	4	9
4	5	3	8
5	6		6
6	6	3	9
7	18	11	29
8	34	8	42
9	28	1	29
Total general	186	43	229

ESTABLO	RIB	DVB		
1	9.3	14.7	6.6	8.0
2	4.5	9.1	8.7	12.0
3	33.3	44.4	30.8	32.5
4	12.5	37.5	22.9	33.5
5	33.3	0.0	37.7	0.0
6	0.0	33.3	0.0	30.8
7	96.6	37.9	6.6	17.7
8	19.0	19.0	11.9	11.9
9	3.4	3.4	6.6	6.6
Total general	22.3	18.8	5.4	5.1

5.2 Respuesta a la vacunación

Los animales vacunados mostraron niveles de anticuerpos específicos para el virus de IBR, a partir de los 7-14 días posvacunación (Figura 1) y al día 28 para virus de DVB (Figura 2).

De los controles sin vacunar y expuestos al desafío natural, 14 % seroconvirtieron a los 7 días en el caso del virus de IBR y a los 28 días para el virus de DVB.

En las Figuras 3 a 6 se observan los niveles de anticuerpos séricos a través del tiempo para IBR en el grupo control, el tratamiento 1 (Titanium 5 ®), tratamiento 2 (Titanium 5 ® + inmunoestimulante) y tratamiento 3 (Pyramid 5 MLV ®), respectivamente.

En las Figuras 7 a 10 se observan los niveles de anticuerpos séricos a través del tiempo para DVB en el grupo control, el tratamiento 1 (Titanium 5 ®), tratamiento 2 (Titanium 5 ® + inmunoestimulante) y tratamiento 3 (Pyramid 5 MLV ®), respectivamente.

VI. DISCUSION

La asociación de virus herpes bovino -1 (HVB-1), virus de la diarrea viral bovina (DVB), virus de la parainfluenza tipo 3 y virus respiratorio sincital bovino, se ha demostrado en bovinos lecheros y de engorda, su control se basa en la combinación del manejo de las condiciones ambientales y la prevención de la infección por medio de la vacunación.

A pesar de las pérdidas económicas que ocasionan los virus del CRB, no existen datos concretos de su prevalencia en bovinos del valle del Mezquital y por lo tanto, se dificulta la propuesta de medidas de prevención y control.

La seroprevalencia encontrada en la zona para estos virus es de 18.77% y 22.27% para IBR y DVB respectivamente, muy similar a lo encontrado en un hato localizado en la zona sur de la Ciudad de México (CEPIPSA) 18.75% y 22% respectivamente, a nivel nacional se reporta una seroprevalencia de 49.15% para HVB-1 y 21.1% para DVB y el Sistema de Vigilancia Epidemiológica (SIVE) reporta para el estado de Hidalgo una seroprevalencia de 83.12% para HVB-1 y de 84% para DVB estos datos pueden tener un sesgo debido a que provienen de muestras de animales sospechosos, remitidas a los laboratorios de diagnóstico por lo que no corresponde a un muestreo aleatorio.

Los virus se distribuyen en las 4 etapas de la vida productiva de los bovinos: becerras, vaquillas, toretes y vacas, encontrándose en mayor proporción de seroprevalencia de los virus HVB-1, DVB, VRSB y PI-3 en los bovinos de engorda. Las seroprevalencias fueron diferentes entre cada estable lo cual nos indica que la variación puede deberse al manejo y no a la zona en que se encuentran dichos animales.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo no coinciden con lo que se ha venido reportando a lo largo del tiempo en México, a saber:

- Correa G P, et al. (1975), encuentran en muestras remitidas de Yucatán y D.F. el 38% positivas a IBR y el 70% positivas a DVB.
- Villareal - Tenorio V, et al. (1979), encuentran en muestras provenientes de 16 estados de la República, el 57% positivo a DVB.
- Suzan V M, et al. (1983), reportan en sueros de 19 estados de la República, el 57% positivos a IBR y el 70.5% positivos a DVB.
- SmithKline Beecham (1994), analiza las muestras de 54 hatos mexicanos, encontrando el 54.91% de animales positivos a IBR (n = 621) y el 55.99% positivos a DVB (n = 634).
- Pfizer (2000), evalúa 1,179 muestras para IBR y 1,165 para DVB, provenientes de 120 ranchos de los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Chiapas y Yucatán, obteniendo el 53.35% de animales positivos a IBR (n = 1,179) y el 54.42% positivos a DVB (n = 1,165).
- Reyes J M, et al. (2003), reportan que se muestrearon 3,126 animales para IBR y 3,142 para DVB, de los estados de: Veracruz, Tabasco, Campeche, Chiapas, Aguascalientes, Yucatán, Tamaulipas, Querétaro, Sinaloa, Chihuahua, Durango, Jalisco, Baja California Norte y Michoacán, resultando positivos a la prueba de ELISA el 57% y el 65% respectivamente

Podemos inferir que tanto IBR como DVB se encuentran conviviendo con los bovinos de México desde hace varios años en menor o mayor grado repercutiendo de manera importante en los parámetros productivos y reproductivos.

Para los virus de VRSB y PI-3, este estudio reporta una seroprevalencia de 83.33% y 58.33% respectivamente, comparados con lo encontrado en un estudio epidemiológico realizado en 12 estados de la República Mexicana en el que se analizaron 634 sueros de bovinos no vacunados, las prevalencias de anticuerpos a VRSB y a PI-3 fueron: de 66.3% y 73.1% respectivamente. En el estado de

Jalisco se reportó una frecuencia de anticuerpos a PI-3 de 96.2% y en Tamaulipas en hatos lecheros una frecuencia de anticuerpos a PI-3 de 94.6%.

Para el VRSB se reportan prevalencias de anticuerpos en los estados de Puebla, Hidalgo, Jalisco y Baja California de 98%, 100%, 82% y 80%, respectivamente, en animales no vacunados contra las enfermedades, indicando que la prevalencia de VRSB es alta en México como en otros países del mundo, explicando en parte las razones por la que las enfermedades respiratorias se manifiestan en la población bovina especializada en la producción de carne y leche.

El objetivo de incorporar una vacuna polivalente contra el Complejo Respiratorio Bovino (CRB) a un programa de prevención sanitario es generar resistencia en el hato de modo tal que se disminuyan las pérdidas por enfermedad respiratoria, abortos, mortalidad perinatal, etc.

En especial, cuando se trata de bovinos que se reciben para mantener en confinamiento en corral de engorda o de leche, resulta esencial proveer de protección inmunitaria ante agentes virales comunes lo más rápido posible, ya que la presión de infección se incrementa drásticamente ante dichas situaciones de hacinamiento y, generalmente, los animales se encuentran en condiciones de estrés debido al transporte y a los cambios de alojamiento y alimentación, además de que muchas veces tienen una mala condición corporal que se relaciona con una condición inmunitaria deficiente para hacer frente a casi cualquier enfermedad.

Muchos Veterinarios y ganaderos se cuestionan si al vacunar con virus activo a la llegada al corral de engorda no se corre el riesgo de afectar negativamente el desempeño productivo de los bovinos, debido a los efectos colaterales de algunos productos de este tipo. Incluso se menciona que se puede presentar un “brote” de Complejo Respiratorio Bovino a causa de dicha vacunación.

Lo cierto es que se ha estudiado el tema desde distintos puntos de vista y las conclusiones señalan que, aunque una buena inmunización depende de varios factores, como estado nutricional, condición corporal, nivel de estrés, interferencia pasiva, entre otros, la utilización de una vacuna de calidad a virus activo es mejor opción que otro tipo de preparados, debido a que poseen la ventaja de inducir inmunidad celular y humoral, lo que significa que los animales adquieren la capacidad de no sólo evitar la enfermedad, sino incluso la infección.¹⁰⁸

Cabe mencionar que los productos biológicos que tienen buen respaldo científico, cuentan con estudios que evalúan su impacto en los parámetros productivos y de salud que afectan a la ganadería, como consumo de alimento, producción de leche, eliminación viral y fiebre.¹⁰⁹

Se ha demostrado que mediante la vacunación a la recepción se reducen los signos clínicos de enfermedad respiratoria, la fiebre y los títulos virales, además de que en casi todos los casos se observa una mayor ganancia de peso. Estudios recientes sugieren que es conveniente esperar unos 14 días para vacunar a los animales recibidos en corrales de engorda, con lo que se lograría un mejor desempeño, tanto inmunológico, como productivo.¹¹⁰

Cuando se han comparado esquemas de vacunación con virus activos contra virus inactivos o bacterinas en corrales de engorda, se han observado menores incidencias de CRB que van del 8 al 30% menos, lo cual nos da una idea de que la vacunación polivalente a virus activo es la opción más conveniente de inmunización contra el CRB. .¹¹¹

El tiempo que tarda en producirse un nivel aceptable de protección inmunitaria humoral por la aplicación de una vacuna, puede relacionarse con la calidad de los diferentes productos disponibles en el mercado. Una vacuna con un adecuado procedimiento de “Aseguramiento de la Calidad”, cumple de manera consistente con parámetros establecidos de pureza, potencia, seguridad y eficacia.¹¹²

El promedio nacional de seroprevalencia para estas enfermedades es mayor del 50%, y se reporta a nivel mundial seroprevalencias del 60 al 80% ¹¹³. En el presente estudio la seroprevalencia fue menor a lo reportado.

En el ganado lechero las becerras no muestran títulos contra estos virus o estos son bajos, conforme van creciendo muestran seroconversión, en el ganado lechero, las vacas presentan la mayor seroprevalencia, observándose una mayor frecuencia para virus de IBR. En comparación, en el ganado de engorda, la mayor frecuencia se presenta para virus de DVB. Los animales vacunados se mostraron clínicamente sanos en el desafío natural. Por lo cual, se concluye que la prevalencia mostrada es menor a la media nacional.

La prevalencia en ganado lechero es baja debido a que los animales se mantienen en la zona y los reemplazos son de los mismos hatos, en comparación con las engordas, donde los animales pueden adquirirse de zonas con altas prevalencias, en particular para este estudio el ganado cebú para la engorda provenía de la Huasteca. Se recomienda vacunar a las becerras y al ganado de engorda al llegar a los corrales y con esto prevenir las pérdidas económicas provocadas por estas enfermedades.

Debido a que los animales que se reciben en corrales de engorda y las becerras de reemplazo están en alto riesgo de infectarse desde el momento en que ingresan a la explotación, la mayor rapidez para producir anticuerpos podría tener ventajas a nivel de campo, en este estudio, en la evaluación de los inmunógenos, la vacuna Titanium 5 ® mostró una seroconversión en menor tiempo comparado con la vacuna Bovishield Gold FP 5 L5®

VII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio ejemplifican lo mencionado en varias publicaciones que establecen que, luego de la vacunación con virus activo modificado, la protección se establece en unas 2 a 3 semanas, mediante la inmunidad humoral, con lo que se obtiene una protección generalizada (sistémica) y en mucosas (oral, nasal, genital, etc.) por períodos prolongados de tiempo, de meses y hasta años. Cabe mencionar que las vacunas a virus activo tienen gran capacidad para estimular la inmunidad celular. Hay algunas vacunas que demuestran una protección inmunitaria celular adecuada desde los días 3 a 5 posteriores a su aplicación en corrales de engorda.¹⁰⁹

Este trabajo nos da una pauta para evaluar la respuesta inmunitaria humoral inducida por diferentes vacunas disponibles en el mercado.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Salt, J.S., Thevasagayam S.J., Wiseman A., Peters A.R. (2007). Efficacy of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3, BVDV and RSV in experimentally infected calves. *Vet J.* 174: 616-626.
2. Thiry J, et al. (2006). Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet Res.* 37:169-190
3. Pidone, H.; C. Galosi; M. Etcheverrigaray. (1999). Herpes bovinos 1 y 5. *An Argent.* 19: 40-50.
4. Allen, J.; Viel, L.; Bateman, K.; Nagy, E.; Rosendal, S.; Shewen, P. (1992). Serological Titers to Bovine Herpesvirus 1, Bovine Viral Diarrhea Virus, Parainfluenza 3 Virus, Bovine Respiratory Syncytial Virus and *Pasteurella haemolytica* in Feedlot Calves with

5. Respiratory Disease: Associations with Bacteriological and Pulmonary Cytological Variables. *Can J Vet Res.* 56: 281-288.
6. Juárez, B.F; Trigo, F; Chávez, G.; Vargas, R. (2004) Identificación de agentes virales por inmunohistoquímica en enfermedades respiratorias de bovinos en corral de engorda. *Vet. Mex.* 34:1, 1-12.
7. Snowden, G. D., Van Vlek, L. D., Cundiff, L. V. & Bennett, G. L. (2006). Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. *J Anim Sci.* 84: 1999–2008.
8. Griffin, D.: Economic Impact Associated with Respiratory Disease in Beef Cattle. (1997). *Bovine Respiratory Disease Update. The Vet. Clin. North America Food Animal Practice:* 367-378.
9. Ames, T.: Dairy Calf Pneumonia. In: *Bovine Respiratory Disease Update. (1997). The Vet. Clin. North America Food Animal Practice:* 379-392.
10. Trigo FJ. (1991). Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelisis pulmonar bovina. *Vet Mex.* 2:131-135.
11. Wohlgemuth, K., Domínguez, J., López-León, A. (1994). El complejo respiratorio bovino. Etiología viral. In: *Proceedings of the XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Guerrero, México, Octubre 9–15:* 553–554.
12. Hägglund, S., Svensson, C., Emanuelson, U., Valarcher, J.F., Alenius, S. (2006). Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. *Vet. J.* 172: 320–328.
13. Autio, T.; Phjanvirta, T.; Holopainen, R.; Rikula, U.; Pentikäinen, J.; Huovilainen, A.; Rusanen, H.; Soveri, T.; Sihvonen, L.; Pelkonen, S. (2007). Etiology of respiratory

- disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds. *Vet Microbiol.* 119: 256–265.
14. Hammerschmidt W, Lurz R, Ludwig H, Buhk HJ. (1999). Recombination of genomic terminus of bovine herpesvirus-1 with cellular DNA. *J Gen Virol.* 71: 2043-2051.
 15. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. (2000). *Veterinary Medicine: A textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*, 9th.W.B. Saunders Company Ltda. p.1173-1184.
 16. Ackermann M, Engels M. Pro and contra IBR-eradication. (2006). *Vet Microbiol.* 113: 293-302.
 17. Aguilar S. (1993). Recomendaciones para la prevención contra la rinotraqueitis infecciosa bovina (Bovis herpesvirus 1, BHV-1). *Memorias del V curso Internacional de reproducción Bovina*; mayo 11-13; México D.F.: Academia de la investigación en biología de la reproducción: 253:260.
 18. Organización Panamericana de la Salud-Organización Mundial de la Salud. Programa de adiestramiento en salud animal para América Latina, Cuarentena Animal. México (DF): OPS, 1986.
 19. Pastoret PP, Thiry E, Brochier B, Derboven G. (1992). Bovid herpes virus infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann Rech Vet.*13: 221-235.
 20. George LW. (1991). Understanding the encephalitic form of infectious bovine rinotracheitis. *Food Anim Pract.* 335-337.
 21. Oficina Internacional de Epizootias. Manual of recommended diagnostic techniques and requirements for biological products for list A and B diseases. 1990; Vol.II.

22. Magaña-Urbina, A.; Solorio,R.JL.; Segura-Correa,C.J. (2005). Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Hatos Lecheros de la region Cotzio-Téjaro, Michoacán, México. Tec Pecu Méx. 43(1):27-37.
23. Barr BC, BonDurant RH. (2000). Viral Diseases of the fetus. En: Bovine Theriogenology. Youngquist RS, editor. Philadelphia. W:B. Sauders Company:373-381.
24. Baker, J.C. (1990). Clinical aspects of bovine virus diarrhoea virus infection, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 9: 25-41.
25. Straub OC. (1990). Infection bovine rhinotracheitis virus. Virus Inf Ruminant. 3: 71-108.
26. Favoreel, H.; H. Nauwgnck; M. Pensaert. (2000). Immunological hiding of herpesvirus-infected cells. Arch. Virol. 145: 1269-1290.
27. Baker JC, Steven RR, Walter DR. (1989). Transmission of a vaccinal strain of infectious bovine rhinotracheitis virus from intranasally vaccinated steers commingled with nonvaccinated steers. Am J Vet Res. 50: 814-816.
28. Van Oirschot J. (1995). Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. Vet Q. 17: 29-33.
29. Whetstone CA, Miller JM, Bortner DM, Vander Maaten MJ. (1989). Changes in the bovine herpesvirus 1 genome during acute infection, after reactivation from latency and after superinfection in the host animal. Arch Virol. 106: 261-279.
30. Oficina Internacional de Epizootias. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Organismo Internacional de Epizootias (1995): 322-328.
31. Perrin B, Calvo T, Cordioli P, Edwards S, Eloit M, Guerin B, et al. (1994). Selection of European Union standard reference sera for use in the serological diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 13:947-960.

32. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Oficina regional para América Latina y el Caribe. Red de Cooperación Técnica Entre: Laboratorios de investigación y diagnóstico veterinario. Manual de técnicas para diagnóstico virológico. FAO Centro de investigaciones de ciencias veterinarias INTA, Argentina., (1987).
33. Babiuk LA, Van Drunen S, Tikoo SK. (1996). Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol.* 53: 31-42.
34. Aguilar AS. (1987). El virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (Bovine herpesvirus 1): propiedades y vacunación. *Cienc Vet.* 4:161-202.
35. Brock K, Potgieter N. (1989). Rapid fluorescence detection of in situ hybridization with biotinylated bovine herpesvirus-1 DNA probes. *J Vet Diagn Invest.* 1:34-38.
36. Baxi, M.; McRae, D.; Baxi, S.; Greiser-Wilke, I.; Vilcek, S.; Amoako, K.; Dirk. (2006). A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses. *Vet Microbiol.* 116 (1-3):37-44.
37. Bratanich A, Sardi S, Smitsaar E, Estevez M, Schudel A. (1990). Comparison of three serological techniques for the diagnosis of bovine herpesvirus type 1: serum neutralization, enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence. *Rev Argent. Microbiol.* 22: 192-198.
38. Delgado I, Barrera M, Tuero C, Rodríguez N. (1992). Comparación de tres métodos de detección de antígeno para el diagnóstico de herpes bovino tipo 1. *Salud Animal.* 14: 143-148.
39. Trapp S, Beer M, Mettenleiter TC. (2003). Biology of bovine herpesviruses. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 116: 171-178.

40. Galen R S. Use of predictive value theory in clinical immunology. En: Manual of clinical laboratory immunology. 3a ed. Washington DC : A Soc Micro (1986).
41. Theodoris A. (1985). Studies on bovine herpesviruses. Part 1. Isolation and characterization of viruses isolated from the genital tract of cattle. Onderstepoort J Vet Res. 52:239-254.
42. Reed DE, Bicknell EJ, Larson CA, Knudtson WU, Kikbride CA. (1971). Infectious bovine rhinotracheitis virus-induced abortion: rapid diagnosis by fluorescent antibody technique. J Vet Res. 32: 1423-1426.
43. Smith GH, Collins KJ, Carman J. (1989). Use of immunoperoxidase test for the detection of bovine herpesvirus-1 in aborted fetal tissue. J Vet Diagn Invest. 1:39-44.
44. Gimeno E, Belak K, Massone A, Echeverria M, Ibagoryen G. (1988). Técnicas inmunohistoquímicas en patología Veterinaria: Aspectos Teóricos y Prácticos. Vet Argent. 5: 332-338.
45. Chimeno,S.;Taboga,O. (2006) .Multiple recombinant ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus antibodies in cattle sera. J Vir Methds. 138(1-2):99-108.
46. Boulanger, D., B. Mignon, S. Waxmeiler, P.P. Pastoret. (1992). Données récentes sur la biologie moléculaire du pestivirus responsable de la maladie des muqueuses (BVD/MD), Ann. Méd. Vét. 136: 33-38.
47. Xue, W., F. Blecha, C. Minoccha. (1990). Antigenic variations in bovine viral diarrhea viruses detected by monoclonal antibodies, J. Cli. Microbiol. 28: 1688-1693.
48. Baker, J.C. (1987). Bovine viral diarrhea virus: A review, J. Am. Vet. Med. Assoc. 190: 1449-1458.
49. Domínguez, J., López, I.A., Hernández, J.P. (1994). The presence of IBR, BVD, BRSV and PI3 in non-vaccinated beef and dairy cattle in Mexico detected by an ELISA method. Bovine Practitioner. 28, 33–34.

50. Bielefeldt Ohmann H. (1995). The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection. *Food Anim. Pract.* 11: 447–476.
51. Dubovi EJ. (1994). Impact of bovine viral diarrhoea virus on reproductive performance in cattle. *Food Anim. Pract.* 10: 503–514.
52. Fredriksen B, Sandvik T, Loken T, Odegaard SA. (1999). Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 144: 111–114.
53. De Verdier Klingenberg K. (2000). Enhancement of clinical signs in experimentally rotavirus infected calves by combined viral infections. *Vet. Rec.* 147: 717–719
54. Drake TR, Moore DA, Whitlock RH, Castro AE, Hattel AL, Reams R, Stoffregen W. (1996). An outbreak of acute BVD in Pennsylvania cattle. *International Symposium Bovine Viral Diarrhoea Virus a 50 Year Review*, Cornell University, USA: 208.
55. Sockett D, Bolin D, Ridpath J, Bolin S. (1996). Outbreak of acute bovine viral diarrhoea (BVD) in Wisconsin. *International Symposium Bovine Viral Diarrhoea Virus A 50 Year Review*, Cornell University, USA: 207.
56. Bolin SR, Ridpath JF. (1992). Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in calves. *Am. J. Vet. Res.* 53: 2157–2163.
57. Hamers C, Couvreur B, Dehan P, Letellier C, Lewalle P, Pastoret P, Kerkhofs P. (2000). Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea virus strains isolated from hemorrhagic syndromes. *Vet. J.* 160: 250–258.
58. Brodersen BW, Kelling CL. (1998). Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus infections on respiratory tract and enteric diseases in calves. *Am. J. Vet. Res.* 59: 1423–1430.

59. McGowan MR, Kafi M, Kirkland PD, Kelly R, Bielefeldt Ohmann H, Occhio MD, Jillella D. (2003). Studies of the pathogenesis of bovine Pestivirus-induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology* 59: 1051–1066
60. Fray MD, Mann GE, Clarke MC, Charleston B. (1999). Bovine viral diarrhea virus: its effects on estradiol, progesterone and prostaglandin secretion in the cow. *Theriogenology* 51: 1533–1546.
61. Vanroose G, De Kruif A, Van Soom A. (2000). Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61: 131–143.
62. Moennig V, Liess B. (1995). Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. *Food Anim. Pract.* 11: 477–487.
63. Constable PD, Hull BL, Wicks JR, Myer W. (1993). Femoral and tibial fractures in a newborn calf after transplacental infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 132: 383–385.
64. Taylor LF, Janzen ED, Ellis JA, Van Den Hurk JV, Ward P. (1997). Performance, survival, necropsy, and virological findings from calves infected with the bovine viral diarrhea virus originating from a single Saskatchewan beef herd. *Can. Vet. J.* 38: 29–37.
65. Ames TR. (1986). The causative agent of BVD: its epidemiology and pathogenesis. *Vet. Med.* 81: 848–869.
66. Woodard, L.F. (1994). BVD virus associated with outbreaks of abortion, stillbirths, and weak calves, *Vet. Med.* 98: 379-384.
67. Fray MD, Paton DJ, Alenius S. (2000). The effects of bovine viral diarrhea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61: 615–627.

68. Houe H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64: 89–107.
69. Mars MH, Brusckhe CJ, Van Oirschot JT. (1999). Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Vet. Microbiol.* 66: 197–207.
70. Stringfellow DA, Givens MD. (2000). Epidemiologic concerns relative to in vivo and in vitro production of livestock embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61: 629–642.
71. Edwards, S. (1990). The diagnosis of bovine virus diarrhoeamucosal disease in cattle, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9: 115-130.
72. De Verdier Klingenberg K, Vagsholm I, Alenius S. (1999). Incidence of diarrhea among calves after strict closure and eradication of bovine viral diarrhea virus infection in a dairy herd. *JAVMA* 214: 1824–1828.
73. Brownlie J, Thompson I, Curwen A. (2000). Bovine virus diarrhoea virus—strategic decisions for diagnosis and control. *In Practice* 22: 176–187.
74. Wilke GI, Grummer B, Moennig. (2003). Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals* 31: 113–118.
75. Bitsch V, Hansen KEL, Ronsholt L. (2000). Experiences from the Danish programme for eradication of bovine virus diarrhoea (BVD) 1994–1998 with special reference to legislation and causes of infection. *Vet. Microbiol.* 77: 137–143.
76. Reinhardt G, Riedemann S, Tadich N. (2002). Muestreo predial pequeño para predecir una infección activa por virus diarrea viral bovina (VDVB) en plantales lecheros de la Xª Región, Chile. *Arch. Med. Vet.* 34: 97–101.
77. Sandvik T. (1999). Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet. Microbiol.* 64: 123–134.

78. Thür B, Hilber M, Strasser M, Ehrensperger F. (1997). Immunohistochemical diagnosis of Pestivirus infections associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. *Am. J. Vet. Res.* 58: 1371–1375.
79. Grooms DL, Keilen ED. (2002). Scening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clin. Diagn. Lab. Imm.* 9: 898–900.
80. Lertora WJ. (2002). Inmunohistoquímica en biopsias de piel y en bulbos pilosos, para el diagnóstico de bovinos persistentemente infectados con el virus diarrea viral bovina. Tesis de Maestría, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, p. 61–90.
81. Renshaw RW, Ray R, Dubovi EJ. (2000). Comparison of virus isolations and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhea virus in bulk milk tank samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 184–186.
82. Vilcek S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmanith W, Vega S, Scicluna MT, Paifi V. (2001). Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 146: 99–115.
83. Ronsholt L, Nylin B, Bitsch V. (1997). A BVDV antigen- and antibody blocking ELISA (DVIV) system used in a Danish voluntary eradication program, Proceedings of the 3er Symposium on Pestiviruses, sept. 1996, Lelystad, Netherlands. *ESVV*: 150–153.
84. Graham DA, McLaren IE, German A. (1998). Evaluation of the suitability of a commercial bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA for diagnostic testing. *Vet. J.* 157: 149–154.
85. Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, A. W., Mayo, M. A. & Summers, M. D. (editors) (1995). *Virus Taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Wien, New York: Springer-Verlag.

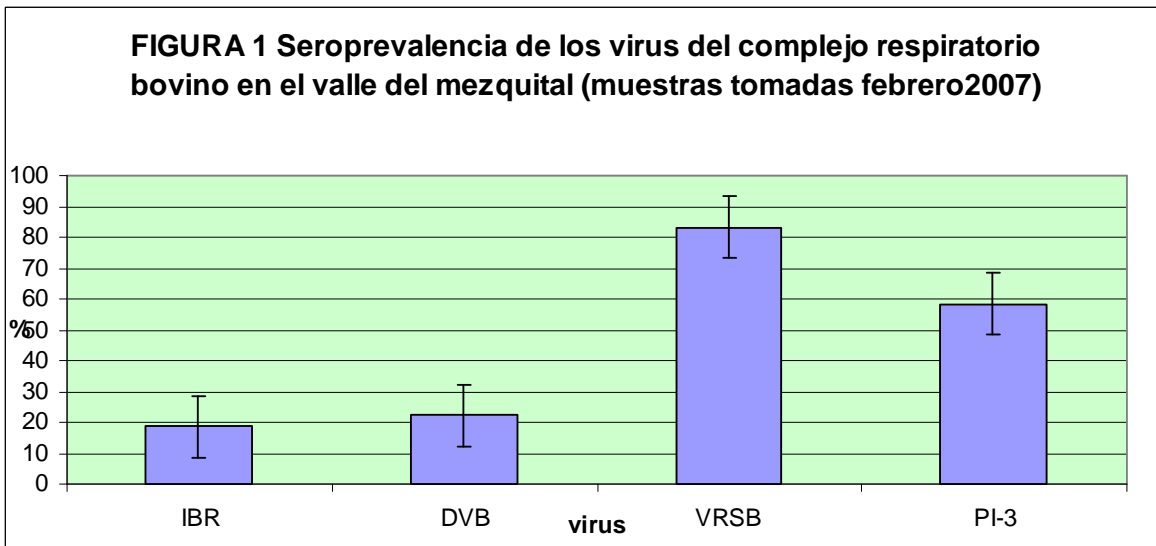
86. Dinter, Z. & Morein, D. (editors) (1990). *Virus Infections in Ruminants*. New York: Elsevier Science Publishers BV.
87. Kapil, S.; Basaraba, R. (1997). Infectious Bovine Rhinotracheitis, Parainfluenza-3, and Respiratory Coronavirus. En: *Bovine Respiratory Disease Update*. The Vet. Clin. North America Food Animal Practice: 455-470.
88. Stevenson, R. G. & Hore, D. E. (1970). Comparative pathology of lambs and calves infected with parainfluenza virus type 3. *J Comp Pathol*. 80: 613–618.
89. Solís, J.; Calderón, J.C.; Segura, J.C.; Aguilar, F., Segura, V.M. (2007). Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus-3 in beef cattle of Yucatan, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine* 82: 102–110
90. Babiuk, L.A. (2002). Immunization of cattle: current and future prospect. En: *Recent Development and Perspectives in Bovine Medicine*. XXI World Buiatrics Congress. Hannover, Germany. August: 76-85.
91. Obando, C.(2002). Prevención y Control de Enfermedades Virales del Bovino. En: *Avances en la Ganadería de Doble Propósito*. Fundación GIRARZ:. 217- 228.
92. Wellemans, G. (1977). Laboratory diagnosis methods for bovine respiratory syncytial virus. *Vet Sci Commun*. 1: 179-198. 167.
93. Elvander M. (1996). Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus, *Vet. Rec*. 138:101–105.
94. Bunt A.A., Milne R.G., Sayaya T., Verbeek M., Vetten H.J., Walsh J.A. (2005). Paramyxoviridae, in: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (Eds.), *Virus taxonomy*, Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier, Academic Press, London: 655–671.

95. Trudel M., Nadon F., Simard C., Belanger F., Alain R., Seguin C., Lussier G. (1989). Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus, *Arch. Virol.* 107:141–149.
96. Smith M.H., Frey M.L., Dierks R.E. (1974). Isolation and characterisation of a bovine syncytial virus, *Vet. Rec.* 94:599.
97. Stott E.J., Thomas L.H., Collins A.P., Crouch S., Jebbett J., Smith G.S., Luther P.D., Caswell R. (1980). A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease, *J. Hyg. (Lond.)* 85:257–270.
98. Baker J.C., Ames T.R., Markham R.J. (1986). Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd, *Am. J. Vet. Res.* 47:240–245.
99. Belknap E.B. (1993). Recognizing the clinical signs of BRSV infection, *Vet. Med.* 88:883–887.
100. Verhoeff J., Van der Ban M., van Nieuwstadt A.P. (1984). Bovine respiratory syncytial virus infections in young dairy cattle: clinical and haematological findings, *Vet. Rec.* 114:9–12.
101. Bryson D.E. (1993). Necroscopy findings associated with BRSV pneumonia, *Vet. Med.* 88:894–899.
102. Thomas L.H., Stott E.J., Collins A.P., Jebbett J. (1984). Experimental pneumonia in gnotobiotic calves produced by respiratory syncytial virus, *Br. J. Exp. Pathol.* 65:19–28.
103. Viuff B., Tjornehoj K., Larsen L.E., Rontved C.M., Uttenthal A., Ronsholt L., Alexandersen S. (2002). Replication and clearance of respiratory syncytial virus. Apoptosis is an important pathway of virus clearance after experimental infection with bovine respiratory syncytial virus, *Am. J. Pathol.* 161:2195–2207.

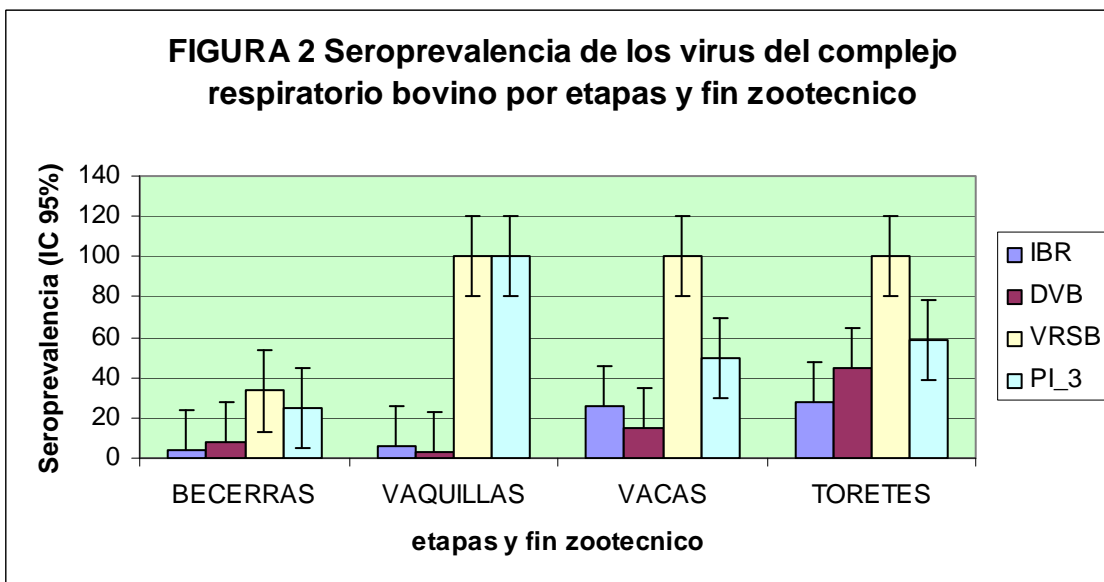
104. Valarcher, JF; Taylor, G. (2007). Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet. Res.* 38: 153–180.
105. Haeberle H.A., Casola A., Gatalica Z., Petronella S., Dieterich H.J., Ernst P.B., Brasier A.R., Garofalo R.P. (2004). IκB kinase is a critical regulator of chemokine expression and lung inflammation in respiratory syncytial virus infection, *J. Virol.* 78:2232–2241
106. Polack F.P., Teng M.N., Collins P.L., Prince G.A., Exner M., Regele H., Lirman D.D., Rabold R., Hoffman S.J., Karp C.L., Kleeberger S.R., Wills-Karp M., Karron R.A. (2002). A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease, *J. Exp. Med.* 196:859–865.
107. Crowe J.E. Jr., Bui P.T., Siber G.R., Elkins W.R., Chanock R.M., Murphy B.R. (1995). Cold-passaged, temperature-sensitive mutants of human respiratory syncytial virus (RSV) are highly attenuated, immunogenic, and protective in seronegative chimpanzees, even when RSV antibodies are infused shortly before immunization, *Vaccine.* 13:847–855.
108. Baker J. (1986). Bovine respiratory syncytial virus: immunopathogenesis, clinical signs, diagnosis and prevention. *Infect. Dis. Food. Anim. Practice.* 8:62-68.
109. Frey J. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine* Jul 26;25(30):5598-605. 2007
110. Brett Terhaar. Challenge with BVDV type 2 Study Test. Study No. TR-03, TR-10, TR-11 and TR-13. AgriLaboratories, Ltd. 1998-2000. Se pueden consultar en:<http://www.agrilabs.com/researchdata.html>
111. Richeson J, et al. Effects of on-arrival versus delayed modified live virus vaccination on health, performance, and serum infectious bovine rhinotracheitis titers of newly received beef calves. *Journal of Animal Science* Apr;86(4):999-1005. 2008.
112. Snowden G. *Journal of Animal Science* 84:1999-2008.

113. Milstien J. et al Vaccine quality—can a single standard be defined?. *Vaccine* Volume 20, Issues 7-8, 15. 1000-1003. 2002.
114. Baker, J.C. 1987. Bovine viral diarrhea virus: A review, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190: 1449-1458.

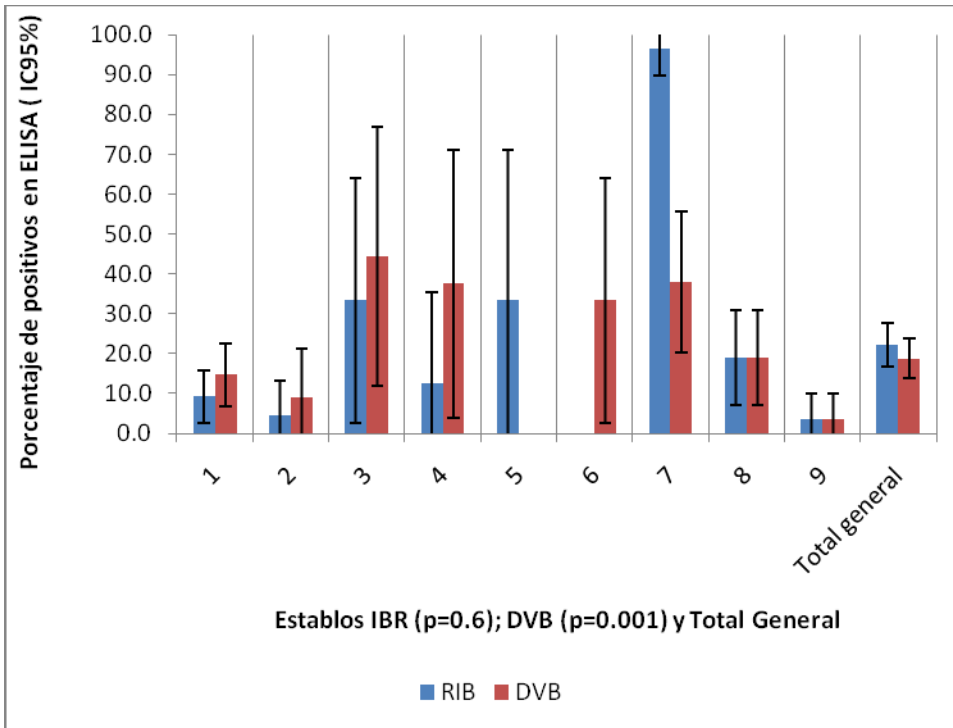
ANEXO 1. FIGURAS



IBR (virus de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina);DVB (virus de Diarrea Viral Bovina);VRSB (Virus Respiratorio Sincitial Bovino);PI-3 (virus de Parainfluenza tipo 3)



IBR (virus de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina);DVB (virus de Diarrea Viral Bovina);VRSB (Virus Respiratorio Sincitial Bovino);PI-3 (virus de Parainfluenza tipo 3)



DVB

Analysis of Deviance Section

Term	Omitted	DF	Deviance	Increase From Model Deviance (Chi Square)	Prob Level
All			242.88352	10.2713	0.00135
ESTABLO		1	242.88352	10.2713	0.00135
None(Model)		1	232.61222		

IBR

Analysis of Deviance Section

Term	Omitted	DF	Deviance	Increase From Model Deviance (Chi Square)	Prob Level
All			221.20371	0.15854	0.69051
ESTABLO		1	221.20371	0.15854	0.69051
None(Model)		1	221.04517		

IBR

Analysis of Deviance Section

Term	DF	Deviance	Increase From Model Deviance (Chi Square)	Prob Level
Omitted				
All	1	221.20371	16.16477	0.00006
etapa	1	221.20371	16.16477	0.00006
None(Model)	1	205.03894		

dvb

Analysis of Deviance Section

Term	DF	Deviance	Increase From Model Deviance (Chi Square)	Prob Level
Omitted				
All	1	242.88352	33.68206	0
etapa	1	242.88352	33.68206	0
None(Model)	1	209.20146		

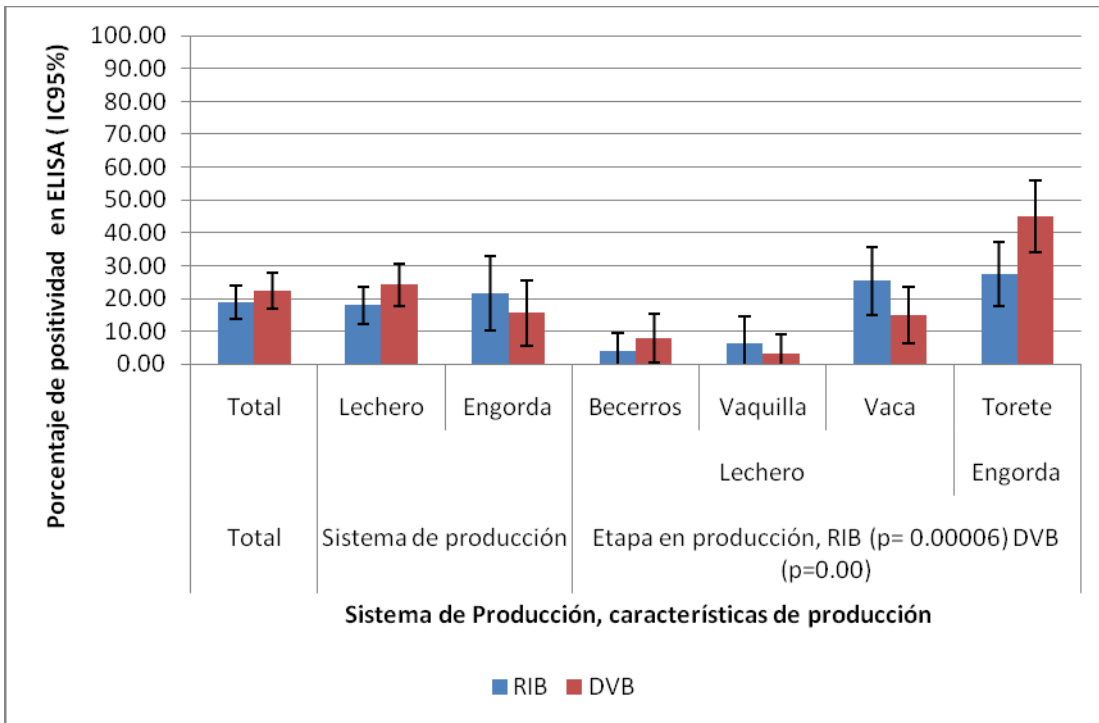
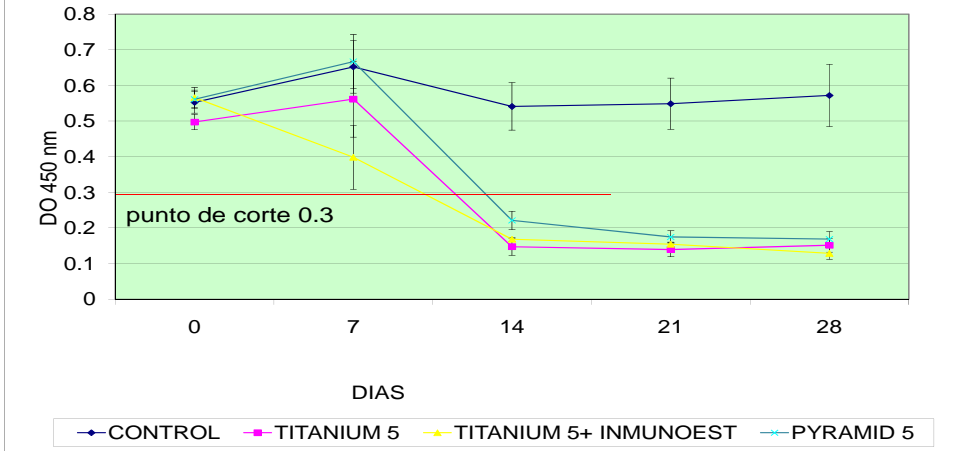


FIGURA 3. RESPUESTA SEROLOGICA EN LOS CUATRO GRUPOS PARA IBR



Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Grupo	4	0.9455922	0.236398	12.28	0.000000*	0.999979
B: Dia	4	2.019328	0.504832	26.23	0.000000*	1
AB	16	0.5173104	0.0323319	1.68	0.061045	0.89759
S	110	2.117311	1.92E-02			
Total (Adjusted)	134	7.733059				
Total	135					

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: IBR
Term A: Grupo

Alpha=0.050 Error Term=S DF=110 MSE=1.924829E-02 Critical Value=3.9224

Group	Count	Mean	Different From Groups
TITANIUM5	5	0.2792	Control
TITANIUM 5+ INMUNOEST	30	0.2828667	Control
TITANIUM 5	30	0.3025	Control
PYRAMID 5	35	0.3583714	Control
Control	35	0.5732	TITANIUM5, TITANIUM 5+ INMUNOEST TITANIUM 5, PYRAMID

FIGURA 3. RESPUESTA SEROLOGICA EN LOS CUATRO GRUPOS PARA IBR

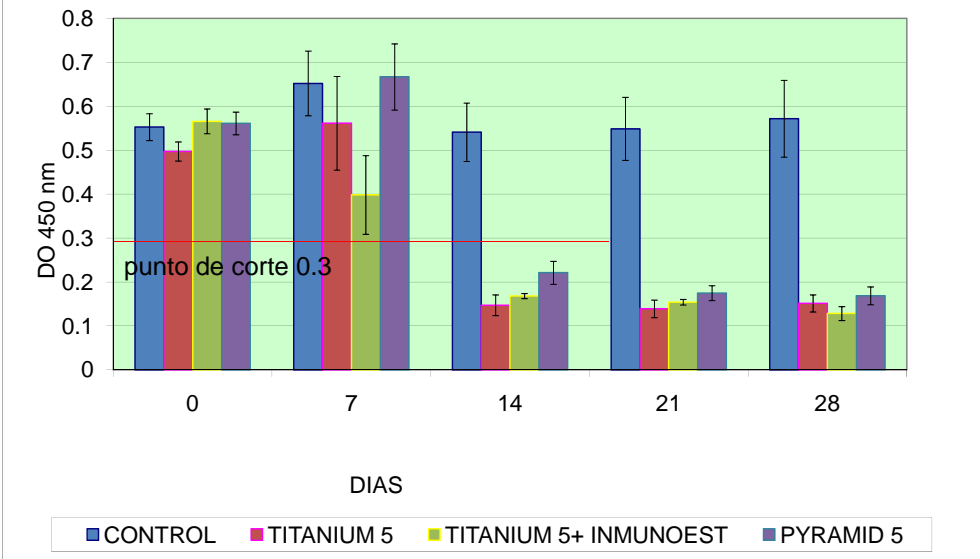
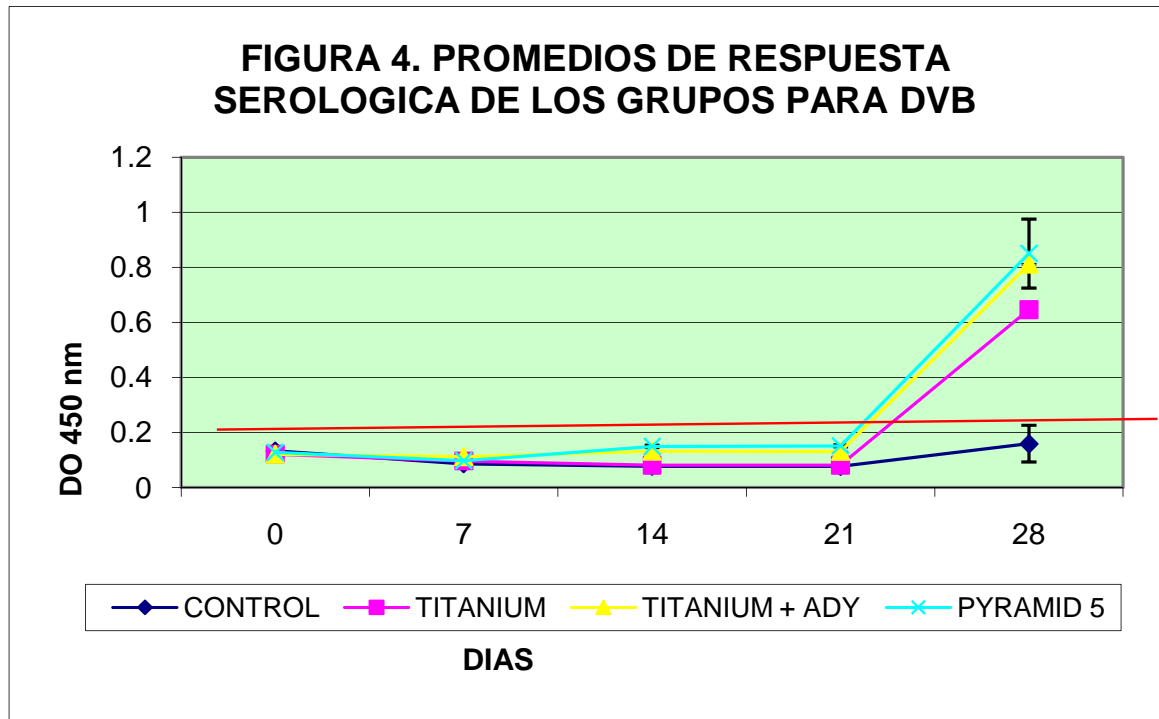


FIGURA 4. PROMEDIOS DE RESPUESTA SEROLOGICA DE LOS GRUPOS PARA DVB



Analisis de varianza

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Grupo	4	0.2829736	7.07E-02	8.02	0.000010*	0.997619
B: Dia	4	3.305276	0.8263191	93.63	0.000000*	1
AB	16	0.7046378	4.40E-02	4.99	0.000000*	0.999995
S	110	0.9708141	8.83E-03			
Total (Adjusted)	134	8.540381				
Total	135					

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: DVB

Term A: Grupo

Alpha=0.050 Error Term=S DF=110 MSE=8.825582E-03 Critical Value=3.9224

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	35	0.1060286	TITANIUM 5, TITANIUM 5+ INMUNOEST PYRAMID 5
TITANIUM5	5	0.1844	
TITANIUM 5	30	0.2085	Control, PYRAMID 5
TITANIUM 5+ INMUNOEST	30	0.2610333	Control
PYRAMID 5	35	0.2755429	Control, TITANIUM 5

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

FIGURA 4. PROMEDIOS DE RESPUESTA SEROLOGICA DE LOS GRUPOS PA

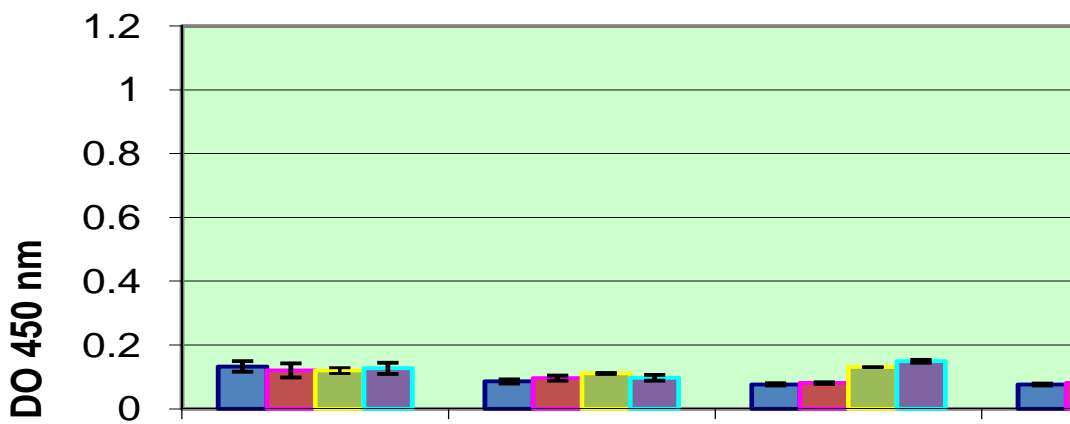


FIGURA 5. COMPORTAMIENTO SEROLOGICO DEL GRUPO DE ANIMALES CONTROL PARA IBR

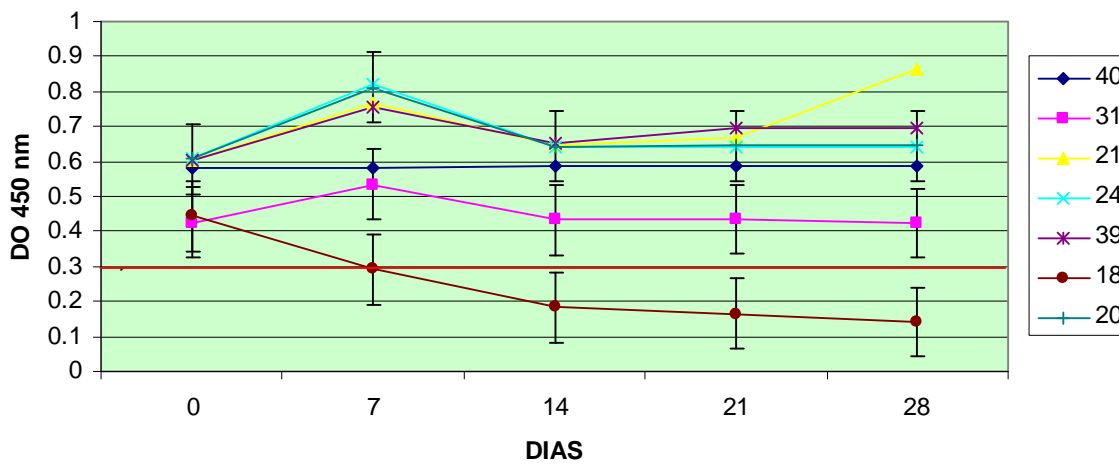


FIGURA 6. RESPUESTA SEROLOGICA A LA VACUNA TITANIUM PARA IBR

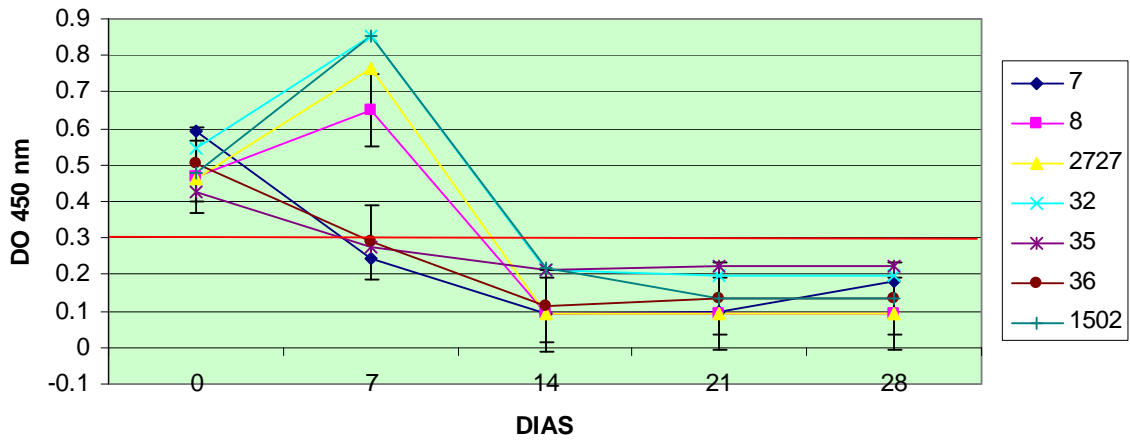


FIGURA 7. RESPUESTA SEROLOGICA A LA VACUNA TITANIUM MAS INMUNOESTIMULANTE PARA EL VIRUS IBR

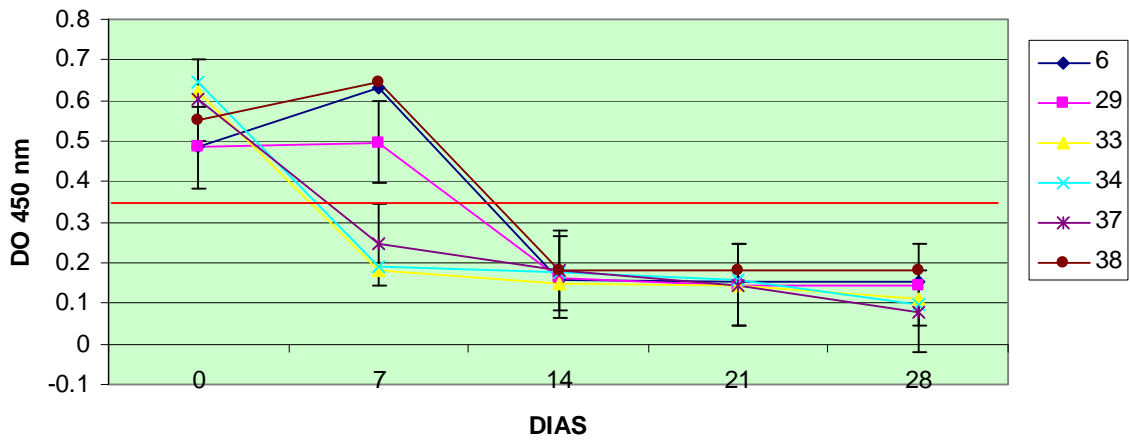


FIGURA 8. RESPUESTA SEROLOGICA A LA VACUNA PYRAMID 5 MLV PARA IBR

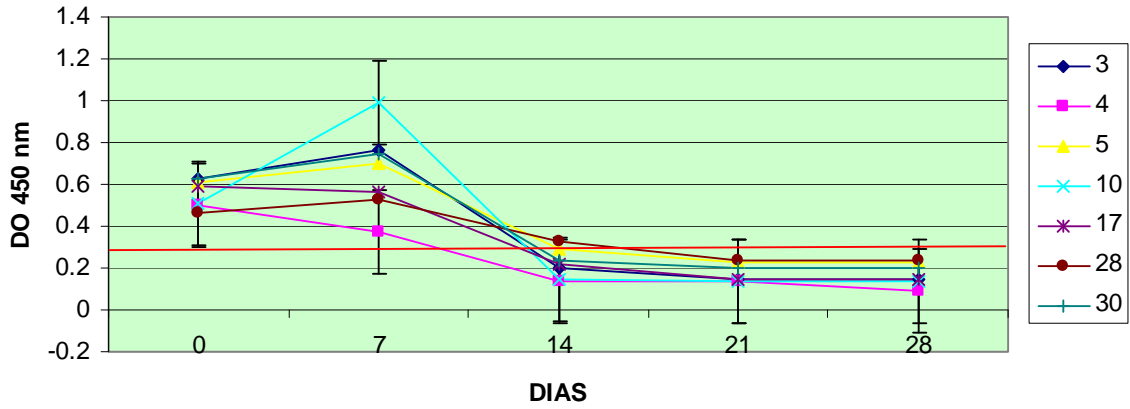


FIGURA 9. COMPORTAMIENTO SEROLOGICO DEL GRUPO CONTROL PARA DVB

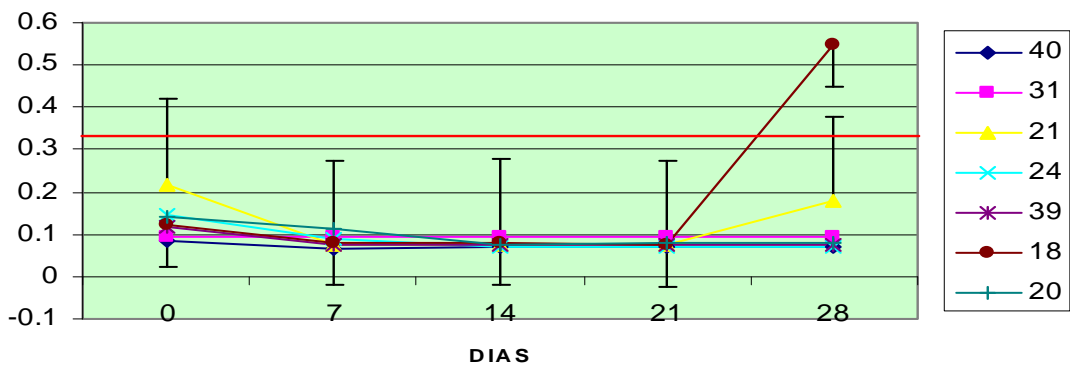


FIGURA 10. RESPUESTA SEROLOGICA A LA VACUNACION CON TITANIUM 5 PARA DVB

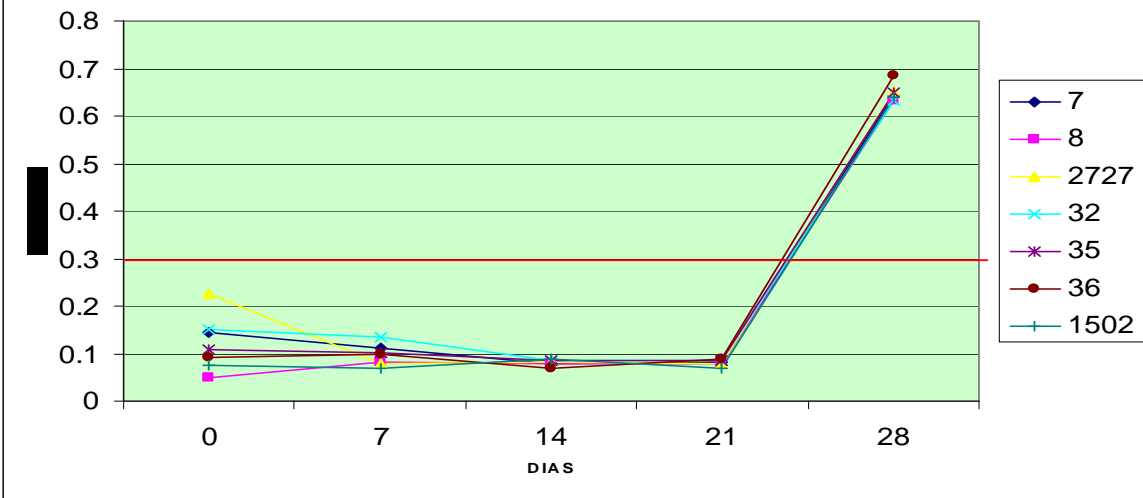


FIGURA 11. RESPUESTA SEROLOGICA A LA VACUNA TITANIUM MAS INMUNOESTIMULANTE PARA DVB

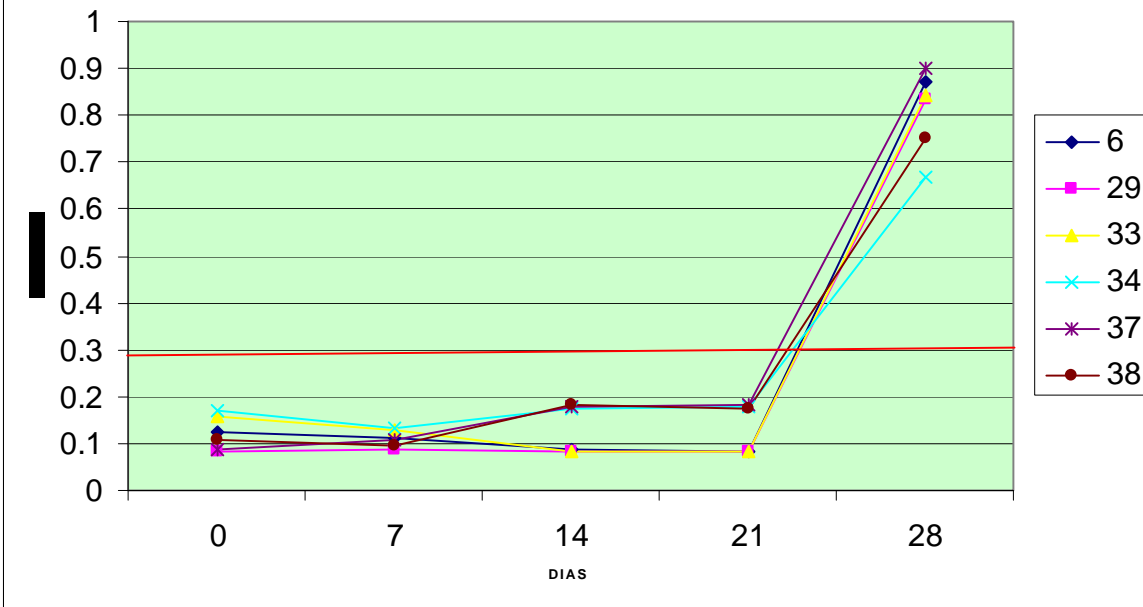


FIGURA 12. RESPUESTA SEROLOGICA A LA VACUNA PYRAMID 5 PARA DVB

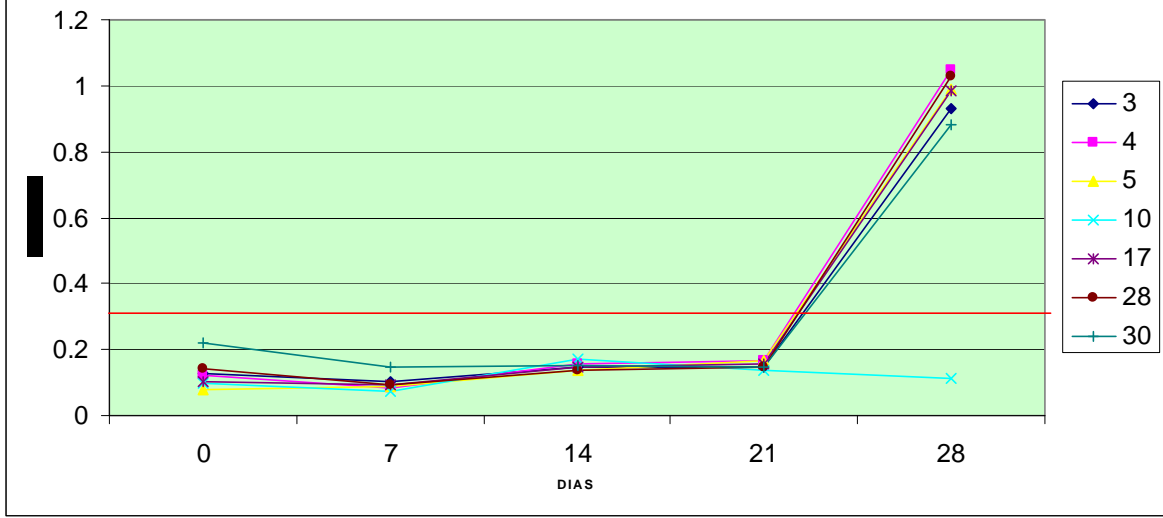


FIGURA 13. RESPUESTA A LA VACUNACION Y GRUPO CONTROL PARA VRSB

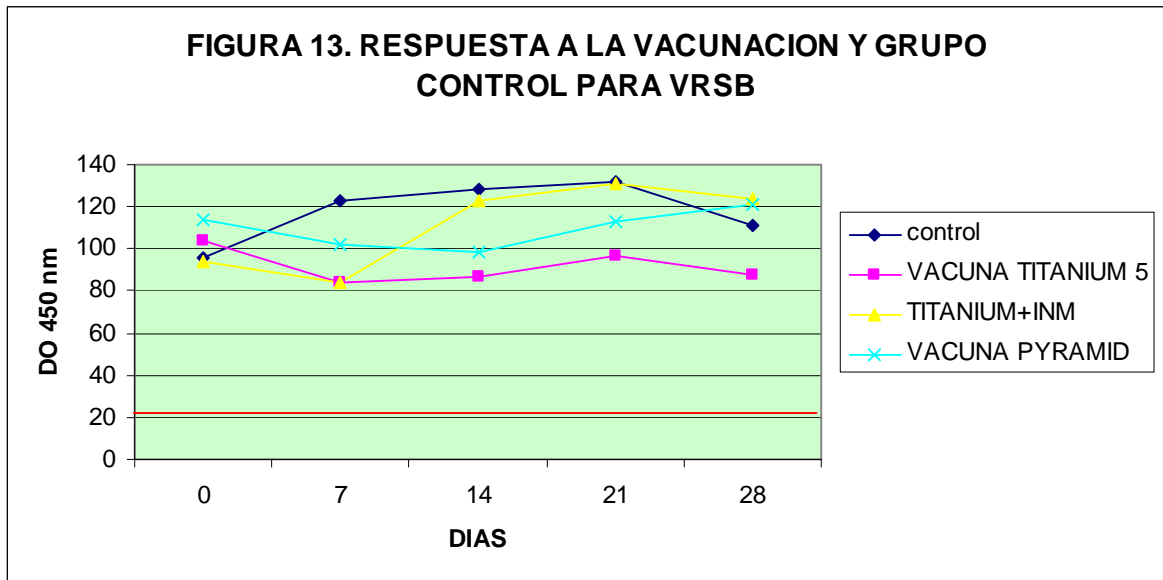


FIGURA 14. RESPUESTA A LA VACUNACION Y GRUPO CONTROL PARA PARAINFLUENZA-3

