



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



**CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA DIARREA VIRAL BOVINA
POR SUERONEUTRALIZACION, EN BOVINOS HOLSTEIN
SOSPECHOSOS DE PADECER LA ENFERMEDAD.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
GUERRERO JOSE ANTONIO

ASESORES: MVZ. LUIS ARTURO NAVARRO MORALES
MVZ. CARLOS GONZALEZ SILVA



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 está 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Contribución al estudio de la diarrea viral bovina por
sueroneutralización, en bovinos Molstein sospechosos de
padecer la enfermedad",
que presenta al pasante: Guerrero José Antonio
con número de cuenta: 8411896-3 para obtener el TITULO de:
Médico Veterinario Zootecnista ; en colaboración con :

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 20 de Abril de 1995

PRESIDENTE MVZ. Luis A. Navarro Morales
VOCAL MsC. Raúl Mar Cruz
SECRETARIO M. en C. Tonatiuh Cruz Sánchez
PRIMER SUPLENTE MVZ. Marco Antonio Mendoza Saavedra
SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Rodolfo Córdoba Ponce

DEDICATORIAS

A mi Señor y Salvador:



Juan 15:5.

**Te doy gracias Padre por la oportunidad de ayudarme a alcanzar este propósito,
sin ti no lo habría hecho, gracias por lo que me haz dado y lo que me darás.**

En Cristo Jesús mi Salvador. Amen

A mi mamá:

Gracias por todo el amor inmenso que has tenido para mi vida, gracias mamá por todo el apoyo brindado, este es nuestro triunfo, lo hemos logrado gracias a Dios.

Te amo mamá.



A la mujer que ha puesto ilusiones y deseos en mi corazón, a la ayuda idónea que el Señor me otorgado por amor, a la mujer con la que deseo pasar todo mi existir.



Te amo Inez.

AGRADECIMIENTOS

Mil gracias por todo el apoyo prestado para elaborar este humilde trabajo. Gracias por su paciencia y sus conocimientos brindados. Al Dr. Luis Arturo Navarro Morales y al Dr. Carlos González Silva.

CONTENIDO

	Pág.
1.- RESUMEN.....	1
2.- INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Epidemiología.....	3
2.2. Patogenia.....	5
2.3. Inmunidad.....	6
2.4. Signología.....	7
2.5. Diagnóstico.....	10
2.6. Control y Prevención.....	12
3.- JUSTIFICACIÓN.....	14
4.- HIPÓTESIS.....	15
5.- OBJETIVOS.....	16
6.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
6.1. Sueros.....	17
6.2. Material para la prueba de sueroneutralización por método B.....	18
6.3. Método.....	19
6.3.1. Control de virus y de células.....	20
6.4. Interpretación.....	22
7.- RESULTADOS.....	23
7.1. Cuadro # 1.....	23
7.2. Cuadro # 2.....	24
7.3. Cuadro # 3.....	25
8.- DISCUSIÓN.....	26
8.1. Medidas de control y prevención.....	27
9.- CONCLUSIÓN.....	32
10.- LITERATURA CITADA.....	33

RESUMEN

GUERRERO JOSE ANTONIO. La Diarrea viral bovina (DVB) es una enfermedad que afecta a algunos hatos de bovinos Holstein friesian productores de leche en México y es una de las causas más frecuentes de aborto. En hembras que han presentado signos de afección del aparato genital estando vacunadas contra Brucella spp., Leptospira spp. e IBR, se sospechó de infección con el virus de la DVB, lo que debía de confirmarse en cada uno de los hatos problema.

Con este propósito se llevaron a cabo pruebas de sueroneutralización con diluciones dobles hasta un máximo de 1:2048. Las pruebas se realizaron en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, SARH. Tecamac, Estado de México. (Bajo la dirección de: MVZ. Luis Arturo Navarro Morales y MVZ. Carlos González Silva).

Se estudiaron 8 hatos con signología sospechosa de diarrea viral bovina, los cuales están localizados en el Distrito Federal (delegación de Azcapotzalco: Rancho La Violeta), Estado de México (municipios de Tultitlán: Rancho San Miguel; Cuautitlán: Rancho La Virgen; Zumpango: Ranchos San Francisco, Palomares y Pirineos; Teotihuacán: Rancho San Marcos) y Querétaro (municipio Pedro Escobedo: Rancho La Asturiana). El 83.49% de las vacas muestreadas resultaron positivas a anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina con títulos de 1:2 a 1:2048; los resultados de las pruebas serológicas confirmaron la sospecha de infección con virus de la DVB; y en forma contigua, se describen medidas de control y prevención de la enfermedad.

INTRODUCCION

La diarrea viral bovina ó enfermedad de las mucosas (DVB/EM ó BVD/MD) es una enfermedad viral sistémica del ganado con una gran variedad de manifestaciones clínicas ^{1,8,38} que dependen del grado de virulencia de la cepa infectante y de la resistencia individual del animal ⁴².

El virus de la diarrea viral bovina está ampliamente distribuido en todo el mundo. Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Walker y Olafson en 1947 ⁸ ¹⁹ ²¹ ²⁴ ²⁹. En México en 1973 se detectaron anticuerpos contra esta enfermedad en muchas partes de la República, encontrándose animales positivos entre un 30 y 60 % ^{9,42}.

Correa ⁴² estudió 47 sueros bovinos procedentes de los edos. de Puebla, Yucatán, México, y Distrito Federal, con una historia clínica de problemas patológicos de los tractos respiratorios y reproductor. Se encontró que el 70 % de estos animales fueron positivos a la presencia de anticuerpos sueroneutralizantes específicos contra el VDVB.

Resultados de investigaciones serológicas similares conducidas por Suzán (1983), mostraron anticuerpos positivos a DVB en un 63% a un 71% en 903 muestras colectadas en 19 estados de la República Mexicana. Estudios similares fueron realizados por Tenorio (1982), hallando 69% de sueros positivos a DVB en 19 estados de México; Cortese, Cravens y Dominguez (1991) encontraron datos similares en ganado lechero de Tizayuca Edo. de Hidalgo de un 31% a 60% ¹⁰; además Hernández Jáuregui en 1991 aisló e identificó el virus a partir de becerros con diarrea procedentes de la cuenca lechera de Tizayuca, Edo. de Hidalgo ¹⁶.

Por todo lo anteriormente mencionado se puede decir que la DVB está ampliamente difundida en México y es factible que su intervención en los problemas reproductivos, digestivos y respiratorios del ganado de México (de leche y carne) sea muy importante.

El agente causal de la DVB es un virus que tiene una forma tendiente a lo esférico cubierto por una membrana y contiene una banda de RNA en un solo sentido y está clasificado dentro de la familia Togaviridae, genero Pestivirus ^{3,5,7,12,20,29,38,42}. Otras investigaciones han evidenciado la similitud en la organización del genoma y la estrategia de replicación de los flavivirus con el virus de la DVB, por lo que ha sido necesario reclasificarlo dentro de la familia Flaviviridae ¹⁵. Dentro de este género están incluidos antigénicamente el virus de la fiebre porcina clásica y el del virus de la sheep border disease (enfermedad de la frontera) ^{15,38,42}.

El virus de diarrea viral bovina (VDVB) puede ser caracterizado como un biotipo citopatogénico y un biotipo no citopatogénico, (el biotipo se refiere a las diferencias biológicas

medibles y reales existentes entre los virus)³⁶, éstos pueden ser distinguibles con base en los efectos en los cultivos celulares. El VDVb citopatogénico induce una citopatogénia visible en un monoestrato infectado mientras la presencia del no citopatogénico causa una citopatogénia no visible que se detecta solo por las técnicas de inmunofluorescencia e interferencia. Hay evidencias de que algunos VDVb tienen la tendencia de no permanecer estables como un biotipo sino que pueden cambiar de un biotipo a otro^{12,15,36,31}.

Existe la teoría que el origen del virus citopatogénico puede ser por mutación del virus no citopatogénico persistente en los animales infectados, esto surgió porque la antigenicidad es muy similar entre ambos^{6, 8,12,31,33,34}.

Con respecto al biotipo presente en animales infectados se comprende el significado clínico y es como sigue: ^{37,38}

- 1.- Ambos biotipos pueden causar la enfermedad en ganado adulto y en jóvenes.
- 2.- Ambos biotipos pueden causar abortos o malformaciones fetales.
- 3.- En la infección persistente, secuela de la infección en útero, parece estar solamente involucrado el biotipo no citopatogénico.
- 4.- La infección con ambos biotipos es necesaria para el desarrollo de la enfermedad de las mucosas (DVB crónica).
- 5.- Antigenicamente no hay una dependencia de los biotipos³⁶.

De esto se desprende que las posibles manifestaciones clínicas en bovinos infectados sean diferentes en función de la antigenicidad de los virus³³.

Entre las cepas que producen efecto citopatogénico en los cultivos celulares están: Singer, NADL (National Animal Disease Laboratory), Draper, 4611-2, 1285, T20, Oregon C24-V, CP-TVM-2, y Nose, etc. Entre las no citopatogénicas se encuentran la Nueva York (NY-1), No. 12, KS86-1, OS86-1, BD, 604-2, Indiana 46, Saunders, CG-1220, WV313 y SAN ^{8,9,19,27,32,33,42}, etc.

Epidemiología

Se han detectado anticuerpos contra DVB adquiridos en forma natural en diferentes especies de ciervos, en borrego de las montañas Rocallosas, cabras, kudú, antilope (sudafricano y negro), jirafa, oryx, ruano, ñu, wallabies, alces, búfalos, ovinos australianos y cerdos. Se desconoce la importancia de éstas especies como origen de la infección para los bovinos, pero es probable que actúen como huéspedes portadores^{3, 7,11, 42}.

La transmisión del VDVb puede ser directa por contacto con animales enfermos con sus secreciones y excreciones así como por fomites. El aborto, fetos, placentas y descargas uterinas son focos importantes de la transmisión^{20,21,36,42}. Recientemente se ha encontrado

otro factor preponderante para la transmisión y es el apareamiento natural, seguido de la inseminación artificial con semen de toros con infección persistente ^{1,29}. La infección no parece afectar las cualidades del semen, la excreción en el semen continúa después del final del período de viremia y parece ser como consecuencia de su replicación en el tracto reproductor ²²⁻²⁹. La vía más común de difusión de la enfermedad dentro de un hato es por la introducción de animales infectados los cuales parecen estar sanos ⁴². Otros factores adicionales tales como el alojamiento, hacinamiento, transporte, alimentación irregular, pobre higiene, stress, además de factores medio ambientales (ventilación, temperatura y humedad) juegan un importante papel para la introducción e inicio de la enfermedad ^{20,38}. Por lo anteriormente mencionado se puede decir que, en los sistemas intensivos es ligeramente más alto la prevalencia en comparación de los sistemas extensivos ²⁹.

Se ha encontrado recientemente que varias moscas hematofagas son vectores potenciales de transmitir el VDVB a bovinos susceptibles, entre estas están: Stomoxys calcitrans, Hamatopota pluvialis y Hydrotaea irritans ³⁹.

La DVB es mucho menos frecuente en granjas separadas geográficamente que en granjas con un contacto más estrecho con otros animales ¹⁸. Cuando el VDVB invade una granja o área con una baja inmunidad de hato, el virus se extiende rápidamente y provoca serios problemas en el ganado preñado. La relación entre los días de gestación y el resultado de la infección en los fetos es de gran interés e indica claras variaciones de secuelas con la maduración fetal. En el cuadro siguiente se puede apreciar lo anteriormente mencionado:

Fig.2-1

**Anomalías congénitas causadas por el VDVB
en ganado lechero.**

Infección en días de gestación ^a	# de animales preñado	Resultado (# de animales) ^b			
		Normal	AB	IP	ACN
< 90	14	3	5	4	2
90 - 150	14	0	0	0	14
> 150	4	4	0	0	0
Total	32	7	5	4	16

a) Estimada epidemiológicamente.

b) AB: Aborto

IP: Ganado infectado persistentemente.

ACN: Anomalías congénitas neurológicas ³²

No se conoce que tanto tiempo el virus puede permanecer viable en el medio ambiente, particularmente cuando es protegido por detritus orgánicos ³⁸.

El período de incubación es de alrededor de 10 días ²¹; Callis ⁷ en 1982, menciona que es de 1 a 3 semanas.

La mortalidad y la morbilidad pueden ser variables, hallándose hatos con morbilidad elevada y baja mortalidad o hatos con alta mortalidad y baja morbilidad ⁴². Esto dependerá de la inmunidad del hato, la edad, el tiempo a la exposición, la idiosincrasia del individuo, la raza, etc. En ocasiones se observa que en los adultos hay morbilidad elevada y mortalidad baja; mientras que en los jóvenes habrá morbilidad baja, pero alta mortalidad ⁹. Por ende la mortalidad y morbilidad suelen ser variables siendo que la primera llega a alcanzar cifras de un 30 % y la última hasta un 90 % ²⁰.

Los animales de todas las edades son susceptibles, aunque la forma aguda ataca con mayor frecuencia a los animales jóvenes que tienen entre 8 meses y 2 años. Las vacas que están en las últimas etapas de la preñez se infectan, pudiéndose infectar también el feto ³. Por ende la prevalencia de anticuerpos contra el VDVB es baja en animales de 4 a 10 meses, incrementándose considerablemente de 1 - 2 años ascendiendo gradualmente ¹³. Por lo cual la proporción de animales seropositivos se incrementan con la edad ^{19,42}.

En contraste los Holstein adultos parecen tener alta prevalencia de anticuerpos virales contra DVB, posiblemente como resultado de un manejo más intensivo ¹⁹, esto comparado con ganado adulto de otras razas ^{9,18,42}. Otro dato descubierto en relación con el sexo, es la prevalencia de anticuerpos, ésta es relativamente más baja en machos en comparación con las hembras ^{13,42}.

La DVB aparece en todas las estaciones del año, pero con mayor frecuencia en los meses de otoño e invierno ²⁰.

Patogenia

El virus al entrar por vía aerógena, conjuntiva y/o vía oral, penetra en los aparatos respiratorio y digestivo ^{18,20}. Las células epiteliales de las mucosas de la nariz, senos paranasales, laringe, faringe, tonsilas, boca, abomaso e intestinos son colonizadas. En estas células el virus se reproduce y se concentra. El virus pasa a la sangre y se une a los leucocitos. La viremia persiste durante el estadio febril y termina cuando se forman los anticuerpos neutralizantes. El virus penetra al tejido linfoide por vasos linfáticos aferentes o desde la sangre, e incluso pueden ser llevados a estos tejidos por células fagocitarias. En los ganglios linfáticos, bazo y placas de Peyer, las células son destruidas y los centros germinales

desaparecen. La necrosis, especialmente en las placas de Peyer pueden ser muy extensa. Los granulocitos son también reprimidos y se producen temporalmente una leucopenia generalizada. El fuerte estímulo al sistema reticulo endotelial resulta en la producción de nuevos leucocitos mononucleares, que se acumulan alrededor de los capilares cerca de las cubiertas epiteliales de la boca, faringe, estómagos anteriores, abomaso, intestinos, nariz y laringe. En consecuencia algunas células epiteliales se degeneran y necrosan, su desprendimiento de la membrana provoca las numerosas erosiones que caracterizan la DVB. El virus es excretado con las secreciones de los aparatos respiratorio y digestivo ²⁰ (descargas nasales, saliva y en menor grado por orina y heces) ¹⁸.

La infección de las células linfocitarias resulta en una leucopenia, necrosis de los folículos linfoides e inmunodepresión. Este es el tiempo en que el hospedero es más susceptible a infecciones bacterianas secundarias. Los múltiples signos de atonía ruminal, anorexia, fiebre y depresión son manifestaciones indirectas de la infección de los linfocitos con una subsecuente liberación de interteucinas. Como los anticuerpos humorales son producidos, neutralizan a los virus libres, eliminándose células asociadas a los virus (Cels.epiteliales, linfocitos y monocitos), lo que ocurre por medio de anticuerpos citotóxicos dependientes ⁴².

En la infección de vacas preñadas puede presentarse la infección fetal. La patogenia fetal depende de la etapa de gestación y del biotipo de virus. la infección del feto durante el primer trimestre puede dar lugar a la reabsorción y repetición de calor. El aborto puede ocurrir en algún tiempo de la gestación, sin embargo es más común desde los 150 días. El desarrollo de anomalías congénitas, ocurre durante el período de organogénesis. La infección después de los 150 días usualmente no afecta al crecimiento del feto. Solo la infección con el biotipo no citopatogénico da resultados de inmunotolerancia e infección persistente, esto sucede cuando el feto es infectado antes de 90 a 125 días de gestación, por lo que el feto será inmunocompetente. En los becerros infectados persistentemente habrá una viremia constante y por ende serán reservorios del virus de por vida, constituyendo la principal ruta de infección horizontal y vertical en el hato ^{5,6,38}. La infección de becerros normales con un biotipo citopatogénico causará una infección subclínica o bien diarrea ⁴⁰.

En el feto el VDVB puede replicarse en ciertos tejidos no necesariamente linfoides ni epiteliales, incluyendo entre éstos al sistema nervioso central, entre los sitios de predilección están la corteza cerebral y el hipocampo, en ambas áreas cerca del 90% de neuronas serán positivas ¹⁷.

Inmunidad

Ya se ha mencionado que en los animales infectados, los centros germinales de los tejidos linfoides son destruidos, además de infectar a los propios leucocitos por lo cual la

inmunodepresión es el resultado parcial de la disminución del número de linfocitos, de neutrófilos, de la mitogénesis linfocitaria, de la quimiotaxis de los monocitos, del decremento de la ingestión de los neutrófilos y de anticuerpos celulares dependientes de citotoxicidad por neutrófilos. Los mecanismos básicos de la inducción viral para la inmunodepresión no son claros ^{5,28}.

Cuando aparece algún caso agudo en un animal, es común que muchos animales del mismo hato sufran una infección leve. Estos con el tiempo, muestran una leve tasa de anticuerpos neutralizantes mientras que los animales gravemente afectados no tienen anticuerpos ²¹. Estos últimos al parecer son incapaces de desarrollar una respuesta de anticuerpos humorales después de la infección por el virus. Esto tal vez explique el alto índice de mortalidad de la forma clínica aguda y la naturaleza duradera de la forma crónica de la enfermedad. Esta es una observación muy importante pues tal vez indique que una cepa del virus distinta de la que se somete a prueba serológica causa la enfermedad aguda o que el animal de hecho no reacciona a la cepa que causa la enfermedad, o tal vez tampoco reaccionó a vacunas de virus vivo modificado. Se desconoce la causa de esta parálisis inmunológica. Una hipótesis plausible es que la infección del feto puede causar tolerancia inmunológica ³.

Se ha informado de infecciones persistentes y no manifiestas en bovinos clínicamente sanos, sin anticuerpos neutralizantes séricos, lo que sugiere un tipo de tolerancia inmunológica al virus ³. La detección de animales clínicamente sanos con infección persistente, explica el alto porcentaje de seropositivos en el hato y la ocurrencia clínica dentro del mismo ¹¹, los animales con infección persistente pueden constituir solo del 1 al 2% de toda la población, los porcentajes antes mencionados pueden aumentar en áreas con recientes historias de infección con VDVB ^{4,33}. También debe de tomarse en cuenta que si un animal infectado persistentemente está afectado con un biotipo determinado y es sobreinfectado por otro biotipo diferente este animal será inmunocompetente al biotipo que sobreinfectó pero no al primero ^{18,36}. Los animales que se recuperan desarrollan una sólida y larga inmunidad específica ^{20,42}.

Se ha demostrado que hay correlación entre los títulos altos de los anticuerpos seroneutralizantes y el porcentaje de protección conferida ⁴².

En los terneros los niveles de anticuerpos adquiridos a través del calostro persisten de 105 a 230 días dependiendo del título inicial de anticuerpos ⁴².

Signología

La infección aguda del ganado inmunocompetente tiene tres posibles resultados:

1.- La mayoría del ganado experimenta una infección sistémica aunque inaparente, es manifiesta por la anorexia, fiebre y leucopenia (1-3 días). La presencia de anticuerpos neutralizantes confieren protección contra la enfermedad por largo tiempo (presumiblemente años) ³⁶.

2.- La infección aguda puede presentarse como DVB clásica. La gastroenteritis es predominante. La diarrea es usualmente explosiva y aguda que contiene sangre y moco; la motilidad ruminal se abate en varios casos: hay dilatación intestinal con fluidos, fiebre (41°C), depresión y anorexia. La descarga ocular es rara y la nasal es el resultado de la acumulación de las secreciones del tracto respiratorio en la depresión del animal. La salivación estará presente si existen erosiones extensivas en orofaringe y esófago. Es más frecuente encontrar las erosiones en la gingiva rostral y caudal de los incisivos, en paladar, en lengua incluyendo su parte ventral de su superficie y en la mucosa oral ^{24,36}.

Los casos fatales son generalmente pocos. La prolongación de las enfermedades o muerte esta asociada con infecciones bacterianas en la mayoría de los casos ³⁶.

3.- En la tercera predominan la fiebre (41.6 °C) y taquipnea en forma continua o intermitente.

El examen del tracto respiratorio revela descarga nasal e incremento de la intensidad de la respiración a la auscultación. La anorexia y depresión también están presentes en grados variables.

El signo de gastroenteritis está presente incluyendo hipomotilidad ruminal con poca diarrea. Un diagnóstico presuntivo de neumonía puede presentarse, sin embargo la ausencia de sonidos anormales en pulmones y la pobre respuesta a la terapia de antibióticos en más de un animal alerta al clínico de la posibilidad de DVB ³⁶.

Recientes descripciones de la DVB aguda en sus comienzos, reporta una diátesis sangrante como un signo común en adultos y becerros. Además se observan petequias y equimosis en todas las mucosas, epistaxis bilateral, diarrea hemorrágica, pérdida de sangre uterina y retardo en la coagulación después de una venopunción. La trombocitopenia es un hallazgo consistente de esta forma ³⁶.

La infección fetal es considerada como una posible secuela de DVB en hembras adultas preñadas seronegativas. Los posibles resultados incluyen aborto y reabsorción en el primero y segundo trimestre de gestación, además infección persistente en becerros aparentemente sanos, mortinatos, momificados, becerros sanos seropositivos, terneros débiles y nacimientos a término, así como anomalías congénitas ^{19,42,28,29,42}, aunque algunas podrían mostrar debilidad y baja estatura ³³.

Los defectos congénitos pueden ocurrir si el feto es infectado con un biotipo no citopatogénico, los defectos congénitos más comunes incluyen: hipoplasia cerebral,

hidrocefalia, catarata lenticular, aplasia e hipoplasia de timo, desmielinización de la médula espinal, braquignatia, retardo de crecimiento intrauterino, atrofia de retina, microftalmia, neuritis óptica, dismaturia, alopecia, hipotricosis, microencefalitis, hidranencefalia, hidrocefalo e hipoplasia pulmonar ^{1,19,25,33,36}.

Las becerras nacidas con infección persistente pueden ser indistinguibles de las becerras sanas normales ³⁶.

Jubb y Kennedy ²¹ en 1978, mencionan que el aborto puede presentarse en la etapa febril o durante la convalecencia.

La enfermedad de las mucosas (DVB crónica) es inducida por un mecanismo único, que requiere la infección persistente con el biotipo no citopatogénico de DVB, seguido por la sobreinfección con un virus apropiado citopatogénico de DVB (debe existir una homología antigénica entre el virus persistente y el virus que sobreinfecte) y por ende no toda la combinación de citopatogénico y no citopatogénico resulta en la enfermedad fatal ^{5,8,9,31}. En todo ganado la enfermedad de las mucosas puede ocurrir espontáneamente, después de una vacunación con virus vivo modificado de DVB, además de poder ser inducida y reproducida experimentalmente ³¹. La enfermedad de las mucosas tiene una sola patogenia y manifestación clínica.

El ganado con enfermedad de las mucosas son siempre positivos al virus y típicamente hay remanentes de anticuerpos negativos hasta el final del curso de la enfermedad. La mayoría de los casos descritos en la literatura ocurren entre los 6 meses a los 2 años de edad, pero puede ocurrir en otras edades. La morbilidad es baja pero virtualmente el 100 % de los casos son fatales en contraste con el curso clínico de DVB. En la exploración se caracteriza por encontrar depresión, fiebre intermitente, diarrea, descarga oculonasal mucopurulenta, así como extensas y persistentes erosiones orales. En la mayoría de los casos los animales viven largo tiempo. La persistente descarga nasocular resulta en grietas y en despigmentación de los ollares y de los bordes de los ojos ³⁶.

En los ollares se desarrollan úlceras recubiertas por detritus mucopurulentos secos. Puede aparecer la laminitis, como coronitis y úlceras interdigitales que pueden desarrollarse durante el curso de la enfermedad. La existencia de anorexia total y la pérdida de interés en el alimento son características predominantes en la enfermedad. El animal baja rápidamente su condición y desarrolla caquexia. El enoftalmos desarrollado es por la pérdida retrobulbar de la grasa y no por la severa deshidratación. Sin embargo la deshidratación existente, es usualmente leve a moderada en acorde con la severidad de la diarrea. Esta diarrea puede ser severa y persistente en la cual los animales mueren rápidamente. En los casos crónicos (6 días) la diarrea es intermitente y acompañada por un moderado a severo tenesmo. En la enfermedad de las mucosas las erosiones orales se vuelven confluentes y ulcerantes, los

restos son áreas grandes sin epitelio y dolorosas. Estas úlceras a menudo desarrollan membranas diftéricas de color blanquecino-gris a amarillo. La mayoría de los pacientes mueren dentro de 2 meses pero varios sobreviven por un largo período ³⁸. El período más largo descrito alcanza 17 meses. Tales casos no suelen mostrar complicaciones, permiten el aislamiento del virus en cualquier tiempo, y no producen anticuerpos específicos detectables frente al virus. Este fracaso de la respuesta inmunológica puede ser por una falla de ella misma, y es un índice de infección progresiva y finalmente fatal ²¹.

Como se ha mencionado en varias de las presentaciones de la DVB puede haber complicaciones lo cual agrava el cuadro, entre los agentes involucrados se pueden mencionar: el herpesvirus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), virus sincitial bovino (BRSV), paramyxovirus de la parainfluenza 3 (PI-3), Pasteurella spp, Coxiella burnetii, Escherichia coli, Commebacterium pyogenes, Acholeplasma laidlawii, Salmonella spp. etc. 1,13,20,28,38.

Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo de DVB ó Enfermedad de las mucosas puede hacerse a menudo con base en la exploración así como, con los hallazgos encontrados durante la necropsia e histopatología ^{1,2,24,38,42}. La situación es tan peligrosa que si hay duda respecto a la identidad del padecimiento, debe procederse a la práctica de pruebas de laboratorio ³. Las pruebas de laboratorio disponibles para la detección incluyen: serología, aislamiento viral y detección de antígeno ³⁸.

La detección del antígeno en tejidos frescos y congelados es muy rápido, el procedimiento requiere de pocas horas ³⁸. Entre las cuales están; la inmunofluorescencia ¹⁸ e inmunoperoxidasa indirecta a partir de tonsilas (Dr. Felipe de la O. comunicación personal).

En las pruebas más relevantes para el diagnóstico de DVB es el aislamiento viral de especímenes clínicos ¹. El aislamiento e identificación del virus se puede hacer a partir de muestras confiables como: sangre, orina, heces, fluidos frescos de útero, vagina, descargas nasales, oculares y exudados faríngeos, colectadas de animales en el período agudo de la enfermedad, así como de bazo, ileon, ganglios mesentéricos, intestino, pulmón, cerebro, líoides, médula ósea, placas de Peyer y fetos abortados ^{1,4,7,8,16,20,26,28,34,35,42,44}. En infecciones agudas y crónicas de la DVB se puede hacer el aislamiento a partir de cola y cabeza de epidídimo, células epiteliales glandulares de la próstata y vesículas seminales ²³. El virus citopatopatógeno (CP) puede ser recuperado más frecuentemente de intestino delgado y tejidos linfoides, mientras que el virus no citopatopatógeno (NCP) puede ser aislado de otros tejidos; esto sugiere que existe un tropismo de los virus NCP y CP a diferentes tejidos

³⁴. En casos de aborto el virus podría ser aislado, aun cuando el aborto fuera causado por otro agente ^{9,42}. El diagnóstico etiológico por aislamiento viral es costoso y difícil de conseguir ². El aislamiento del virus puede hacerse en células libres de DVB, porque si no están libres, habrá interferencia. Entre los cultivos utilizados están las células de piel, músculo fetal bovino (BFM) y riñón fetal bovino (BK), comete de bovino (BT) línea celular Aorta ^{9,16}.

La demostración de la infección por serología es también altamente relevante, pero los resultados pueden ser indispuestos por 3 - 4 semanas después de iniciada la enfermedad ¹. Dentro de las pruebas serológicas están las de: inmunoperoxidasa directa e indirecta ^{2,39}, inmunodifusión en agar ²³, radioinmunoprecipitación ³⁸, fijación de complemento ^{20,42}, ELISA ^{13,23,26}, interferencia ⁹, la reacción en cadena de la polimerasa ⁴⁰, virus neutralización y sueroneutralización ^{1,8,9,12,13,19,20,21,24,26,28,29,38,42}, todas están constituyen buenos métodos de diagnóstico, pero en la práctica, se prefiere a la última ⁴².

La presencia de anticuerpos seroneutralizantes contra el VDVB en vacas que hayan abortado y en otros animales de un hato previamente conocidos como negativos a estos anticuerpos contra la DVB en 2 muestras de suero (tomadas una durante o poco después de observarse los signos clínicos y la segunda entre 15 y 21 días después) indicará la diferencia de títulos de anticuerpos entre la fase aguda y convaleciente ^{1,38,42}. Los sueros pareados adquiridos de las madres en el tiempo de aborto son a menudo infructuosos pero se puede intentar ³⁸. El demostrar la presencia de anticuerpos seroneutralizantes activos específicos de DVB en el suero de recién nacidos que no han tomado calostro o en fetos abortados mayores de 120 días indicará infección en útero ^{18,33,35,40,42}. El diagnóstico en fetos abortados se puede realizar mediante aislamiento viral a partir del SNC, pulmón, hígado, etc. así como de la detección de anticuerpos en fluido peritoneal ²⁸.

En animales con infección persistente con el VDVB es exitoso el diagnóstico porque el ganado elimina el virus en cada fluido corporal y en todas las superficies de las mucosas, además el virus también puede ser aislado del suero y en sangre, éstos animales pueden ser muestreados nuevamente para asegurar que la seroconversión no haya ocurrido ^{1,20,26,38}.

Generalmente cuando la vaca ya abortó, es cuando es llamado el médico veterinario zootecnista y es precisamente en esos días cuando se debe de tomar la primera muestra de suero y de 2 - 3 semanas después el segundo muestreo, a las mismas vacas; porque ya para entonces en caso de que las vacas sean positivas, los títulos de anticuerpos habrán subido ^{1,3,7,9,20,24,38,42}, y de ahí en adelante empezaran a bajar durante varios meses antes de desaparecer, esos son los 2 sueros que interesan para hacer el diagnóstico serológico basado en el muestreo doble. Tal vez en la primera muestra haya un título de 1:10 o tal vez sea completamente negativo, en la segunda muestra tal vez se observe un título de 1:250 (seroconversión) ⁹. Tanto en animales jóvenes como en adultos, pueden bajar el título de

anticuerpos rápidamente por stress, enfermedades o mala nutrición, tratamientos con glucocorticoides, etc. y esto debe tomarse en cuenta para un mejor diagnóstico ⁴¹. En la primera semana los anticuerpos sueroneutralizantes (SN) no son detectables, en la segunda semana los títulos varían entre 1:80 y 1:280. En la cuarta semana varían entre 1:210 y 1:2500 ^{9,13,29}.

Los anticuerpos fijadores del complemento se forman antes de los SN y duran 15 semanas; ésta prueba es buena, pero un poco difícil de ejecutar ^{9,20}.

Al hacer el diagnóstico por medio de pruebas de sueroneutralización debemos tener en cuenta que la mayoría del ganado que desarrolla la enfermedad de las mucosas, no detectándose anticuerpos neutralizantes, por lo que el no desarrollo no desecha la posibilidad de que hayan tenido contacto con el virus o sea responsable de la enfermedad ^{3,38,42}. Además deben de recordarse la existencia de animales incapaces de desarrollar una respuesta humoral después de la infección desconociéndose la causa de esta parálisis inmunológica ^{3,7}.

En el caso de la enfermedad de las mucosas donde no se detectan anticuerpos neutralizantes contra el VDVB, puede recurrirse al aislamiento viral ^{1,26,42}.

La forma de llegar a un diagnóstico concluyente de la enfermedad, sería por aislamiento e identificación del virus y reproduciendo la enfermedad. Este procedimiento sería difícil de llevar a cabo, además de costoso y tardado. Por lo cual se recomienda realizar pruebas de sueroneutralización con sueros pares, que aunque es una técnica difícil, cara y laboriosa, presenta un alto índice de seguridad para llegar a un diagnóstico confirmativo de la infección ⁴².

En los virus existen las partes antigénicas (epitopes) y en base a éstos se puede diferenciar que cepa viral es la involucrada en el problema, esto se puede realizar mediante el uso de los anticuerpos monoclonales ^{12,15,27,33}.

Por otra parte la variedad de signos clínicos que se pueden observar en esta enfermedad hace difícil su diferenciación de otras enfermedades tales como: fiebre catarral maligna, estomatitis papular bovina, fiebre aftosa, peste bovina, paratuberculosis, salmonelosis, y algunas parasitosis e intoxicaciones ^{7,9,20,42}.

Control y prevención

Las prácticas de manejo recomendadas para el control de la DVB, así como otras enfermedades causantes de aborto son las siguientes:

- 1.- Vacunación con virus vivo modificado en las hembras antes del empadre para evitar la infección fetal.
- 2.- Limitar el movimiento de ganado al mínimo esencial y mantener el hato cerrado.

- 3.- Aislar y checar serológicamente el ganado nuevo y el enfermo.
- 4.- Evitar la sobrepoblación, el estrés y la mezcla de ganado de diferentes edades y orígenes.
- 5.- Identificar y sacrificar el ganado persistentemente infectado.¹⁴

Cada uno de los puntos antes mencionados, serán discutidos en el capítulo 8.

JUSTIFICACION

A través de este estudio serológico se determinó la presencia de animales con anticuerpos contra el virus de la DVB con el fin de sugerir medidas de control y prevención de la enfermedad.

HIPOTESIS

Si en los animales que han presentado signología de enfermedad del aparato reproductor se encuentran seropositivos al VDVB sin haber sido vacunados contra la DVB con anterioridad, entonces se puede inferir la presencia del antígeno viral en los hatos muestreados.

OBJETIVOS

General:

Confirmar la sospecha clínica a través de estudios de laboratorio (sueroneutralización) que el antígeno viral está presente en algunos hatos de bovinos lecheros Holstein friesian en los Edos. de México, Querétaro y Distrito Federal.

Particulares:

- 1.- Detectar los anticuerpos en las muestras de suero de vacas que habían presentado problemas de tipo reproductivo.
- 2.- Cuantificar los niveles de anticuerpos presentes en las muestras de sueros positivos.
- 3.- Sugerir medidas de control y prevención para la enfermedad

MATERIAL Y METODOS

Sueros:

Se colectaron 103 muestras de sangre sin anticoagulante (10 ml.) de 103 bovinos Holstein friesian en estabulación intensiva (hembras adultas de 2 a 4 años de edad) con problemas reproductivos (repetición de calores y abortos), para así obtener 5 ml. de suero de cada una de ellas.

Los animales que se estudiaron para fines de este trabajo se organizaron en 8 lotes de acuerdo al lugar de procedencia ó localización. La siguiente figura menciona su procedencia y el número de animales muestreados:

Fig. 4-1
Distribución de hatos muestreados

Rancho	Procedencia	Animales muestreados
La Violeta	Azcapotzalco, D. F.	8
La Virgen	Cuautitlán, Edo. Méx.	15
San Miguel	Tuttitlán, Edo. Méx.	13
San Francisco	Zumpango, Edo. Méx.	7
Palomares	Zumpango, Edo. Mex.	15
Pirineos	Zumpango, Edo. Méx.	6
San Marcos	Teotihuacán, Edo. Méx.	7
La Asturiana	Pedro Escobedo, Gro.	32
Total:		103

La técnica de sueroneutralización se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, bajo la dirección de los MVZ. Margarita Hernández y Felipe de la O., en el Laboratorio de Virología.

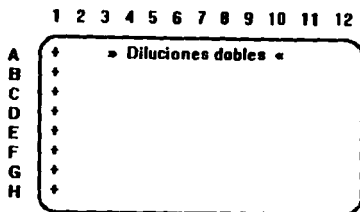
Sueroneutralización en cultivo celular para la detección de anticuerpos contra el virus de la DVB por el método beta. ³⁵

Materiales:

- 1.- Medio mínimo esencial (MEM F15 o F17).
- 2.- Antibióticos: penicilina-estreptomicina (100 UI y 100 mcg/ml respectivamente).
- 3.- Antimicótico (fungizona 100 UI/ml) 1 ml/100ml de medio.
- 4.- Solución de bicarbonato de sodio estéril al 7.5%
- 5.- Virus de la DVB: cepa "NOSE" previamente titulado conteniendo 100-200 TCID₅₀/0.05 ml.
- 6.- Suspensión celular de la línea Aorta con 300x10⁴ células/ml., en MEM con suero 10%
- 7.- Sueros testigos: positivo (animales vacunados a DVB) y negativo (suero fetal bovino).
- 8.- Sueros de prueba.
- 9.- Soluciones desinfectantes de hipoclorito y alcohol etílico al 70%
- 10.- Microplacas de 96 pozos de fondo plano.
- 11.- Multipipeta.
- 12.- Micropipeta.
- 13.- Pipeta gotero graduada en 0.05 ml de plástico.
- 14.- Puntas de plástico para multipipeta y tripipeta.
- 15.- Botellas graduadas en 100 y 150 ml.
- 16.- Tina de plástico con hielo picado para mantener el virus y sus diluciones.
- 17.- Gradilla.
- 18.- Tubos de ensayo de vidrio con capacidad de 5ml.
- 19.- Pipetas de vidrio de 1,2,5,10, y 25 ml. graduadas en decimas y centesimal.
- 20.- Agitador para tubos.
- 21.- Vibrador para microplacas.
- 22.- Indicador de pH.
- 23.- Estufa para cultivo celular a 37 °C con inyección de CO₂ al 5%

Método:

- 1.- Agregar antibióticos y antimicóticos al MEM.
- 2.- Agregar 2% de bicarbonato de sodio al 7.5%
- 3.- Identificar los pozos de la microplaca de la siguiente manera:



(+) Control de sueros

De A-2 a A-12 serán diluciones dobles de un suero problema [1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 y 1:2048] y así se realizará con los sueros restantes en cada línea

- 4.- Servir 0.05 ml. de MEM en todos los pozos, utilizando la multipipeta.
- 5.- Colocar los sueros de prueba en la hilera 1 y 2 con la micropipeta.
- 6.- Realizar diluciones dobles seriadas de todos los sueros, de 1:2 hasta 1:2048. Utilizando la multipipeta de la hilera 1 a la 12, empezando en la hilera 2.

Los pasos 7 y 8 se realizarán siempre manteniendo el virus y el medio en baño de hielo.

- 7.- Realizar la dilución necesaria de virus que contenga 200 TCID₅₀ en 0.05 ml, con MEM.
- 8.- Colocar en las diluciones de todos los sueros 0.05 ml. en cada pozo, excepto en el testigo de cada suero, utilizar la pipeta gotero, de la hilera 2 a la hilera ó línea 12.
- 9.- Incubar las microplacas durante 1 hra. en la estufa a 37 °C en presencia de 5% de CO₂.
- 10.- Retirar de la estufa y servir en todos los pozos de la microplaca 0.1 ml de la suspensión celular.
- 11.- Colocar la microplaca en el vibrador durante 30 segundos a velocidad media.
- 12.- Incubar la microplacas durante 5 días en la estufa a 37 °C en atmosfera de CO₂ al 5%

CONTROL DE VIRUS Y DE CELULAS

1.- Realizar diluciones logarítmicas decimales del virus de 10^{-1} a 10^{-3} , utilizando el siguiente cuadro:

Este paso se realizará siempre manteniendo el virus y el medio en baño de hielo.

DILUCION OBTENIDA	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
M E M	1.8 ml.	1.8 ml.	1.8 ml.
V I R U S			
PREVIAMENTE DILUIDO	0.2 ml.		
VOLUMEN DE TRANSFERENCIA	0.2 ml.	0.2 ml.	0.2 ml.

Para las diluciones utilizar pipetas y cambiar la pipeta al momento de la transferencia; antes de transferir someter el tubo al agitador mecánico un mínimo de 30 segundos o absorber con la pipeta un mínimo de 7 veces.

2.- Servir cada una de las diluciones de virus en cada pozo con 0.05 ml., empezando, por la dilución 10^{-3} en la hilera C, 10^{-2} en la hilera B y 10^{-1} en la hilera A; de la hilera 1 a la hilera 12.

3.- Incubar 1 hora a 37°C en presencia de CO_2 al 5%

4.- Seguir el mismo método para sueros problema para los sueros testigo.

5.- Servir 0.1 ml. de suspensión celular en toda la microplaca dejando las hileras ó líneas A,B y C, como control de virus y las líneas D,E y F como control celular.

El siguiente cuadro representa la distribución de los controles celular y de virus:

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Control de virus	A												
	B												
	C												
Control de célula	D												
	E												
	F												
	G												
	H												

De A-1 a A-10 dilución 10-1
 De B-1 a B-10 dilución 10-2
 De C-1 a C-10 dilución 10-3
 toda la línea D, E y F se
 llenaran todos los pozos
 con células

6.- Realizar la lectura de la microplaca utilizando un microscopio de luz invertida y establecer la diferencia entre la presencia y la ausencia de efecto citopatogénico (ECP), de acuerdo a lo esperado, en el siguiente orden:

- Las diluciones del virus (testigo de virus).
- El testigo de células.
- Los sueros testigo: positivo y negativo.

7.- Evaluar si todos los testigos son satisfactorios. En caso contrario la prueba deberá repetirse.

8.- Leer la microplaca iniciando por el testigo del suero y de la dilución más baja a la más alta.

Si el testigo del suero es insatisfactorio la prueba no es concluyente y se solicitará una nueva muestra de suero.

9.- Registrar los resultados obtenidos tanto de los sueros en la prueba como en los testigos.

10.- Considerar los resultados como:

- Positivo: donde no se observe ECP sobre las células.
- Negativo: donde se observe efecto citopatogénico producido por el VDVB, que no haya sido neutralizado.

11.- Realizar lectura como indica el siguiente cuadro:

(Representación de dos microplacas)

Microplaca: 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Interpretación
A	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	neg
B	+	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1:2
C	+	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1:4
D	+	-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	1:8
E	+	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	1:16
F	+	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*	1:32
G	+	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	1:64
H	+	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	1:128

Microplaca: 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Interpretación
A	+	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	1:256
B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	1:512
C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	1:1024
D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:2048
E													
F													
G													
H													

- (+) Control del suero
- (*) Efecto citopatogénico
- (-) Sueroneutralización

Nota: Los pozos de E,F,G y H no se trabajaron por no tener títulos mayores de 1:2048, por lo que en cada microplaca se trabajaron 8 sueros.

RESULTADOS

En el cuadro # 1 se observa que la mayoría de los sueros fueron positivos, 83.49%. Mientras que sólo las vacas del rancho San Marcos no poseían anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina, lo cual puede asociarse con la zona geográfica donde se ubica (Teotihuacán Edo. de México) y la procedencia de animales de remplazo; (Canadá ó Estados Unidos).

De los resultados obtenidos, sobresalen los títulos de anticuerpos que van de 1:8, 1:16, 1:64 y 1:1024. Los dos primeros títulos fueron detectados con mayor frecuencia. Además, se pueden observar las variaciones en los títulos de anticuerpos que fueron obtenidos por la prueba de sueroneutralización. Los títulos variaron de 1:2 en cinco sueros, hasta el título máximo detectado de 1:2048, que se halló en un sólo suero perteneciente al rancho La Asturiana. Por el contrario el título de anticuerpos de mayor frecuencia observado fue el de 1:16, repitiéndose en 12 ocasiones. Sin embargo 61 muestras tenían títulos que fluctuaron de un rango de 1:4 a 1:1048. Esto puede ser observado en los cuadros # 2 y # 3.

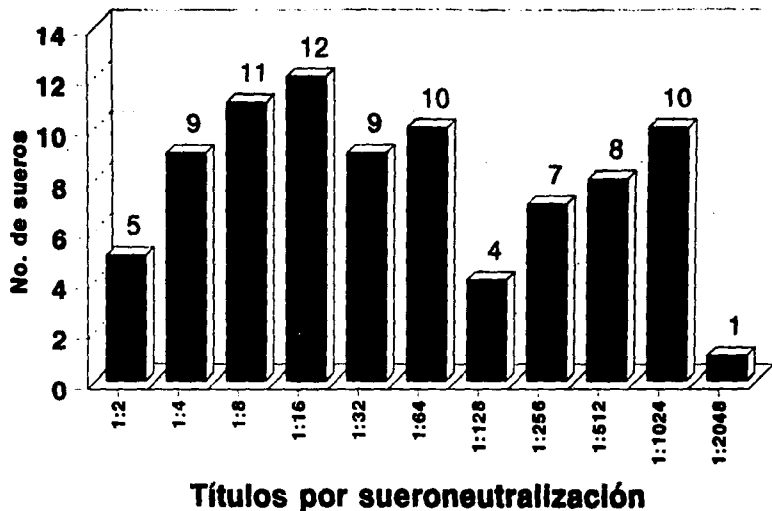
Nuestra hipótesis y objetivos fueron confirmados en cada uno de los hatos muestreados a excepción del rancho San Marcos, en el que se tendrán que hacer muestreos pareados para otras enfermedades de tipo reproductivo.

Cuadro # 1

Pruebas de sueroneutralización en sueros de animales sospechosos de padecer DVB

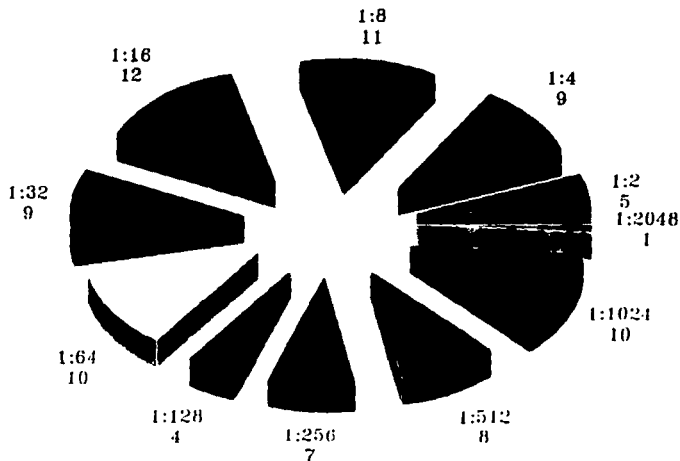
Ranchos	Animales muestreados	Positivos	Negativos	% Positividad
La Virgen	15	15	0	100%
La Violeta	8	8	0	100%
San Miguel	13	12	1	92%
San Francisco	7	7	0	100%
Palomares	15	11	4	73%
Pirineos	6	6	0	100%
San Marcos	7	0	7	0%
La Asturiana	32	27	5	84%
Totales:	103	86	17	

Títulos por sueroneutralización en sueros de animales sospechosos de padecer DVB



CUADRO # 3

Título de anticuerpos contra el virus de la DVB



86 positivas / 103 sueros

DISCUSION

Desafortunadamente las causas de más de la mitad de los abortos en el ganado bovino no son diagnosticadas, por lo tanto, la prevalencia de muchas enfermedades causantes de aborto es desconocida. Dentro de los agentes causantes de aborto de tipo infeccioso están las siguientes: Brucella abortus, Corynebacterium pyogenes, Leptospira spp., Listeria monocitogenes, Campylobacter fetus subespecie fetus, Aspergillus spp., Mucor spp., Abeidia spp. y Rhizopus spp., virus de la rinitraqueítis viral bovina (IBR) así como el virus de la diarrea viral bovina (DVB) ¹⁴.

En México, recientemente la DVB ha cobrado mayor importancia en la industria bovina lechera, ya que ha aumentado la frecuencia con que se detectan anticuerpos contra DVB, lo anteriormente mencionado está basado en los hallazgos serológicos encontrados por Correa en 1975 (70% a 75%), Tenorio en 1982 (88%), Suzan en 1983 (83% - 71%), y Cortese, Cravens y Domínguez en 1991 (31% a 60%). En el presente estudio se identificó un 83.49%, en animales con problemas reproductivos. Además de esto, Hernández Jáuregui (1991) fue quien aisló el VDVB, a partir de leucocitos pertenecientes de animales con signología sospechosa a DVB ^{10,16,42}.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, sobresalen los títulos de anticuerpos que van de 1:8, 1:16, 1:64 y 1:1024. Los dos primeros títulos fueron detectados con mayor frecuencia. Ver cuadro 2, en el que se pueden observar las variaciones en los títulos de anticuerpos, que fueron obtenidos por la prueba de sueroneutralización. Los títulos variaron de 1:2, en cinco sueros, hasta el título máximo detectado: 1:2048 que se halló en un sólo suero. Sin embargo 61 (59.22%) muestras tenían títulos que fluctuaron de 1:4 hasta 1:1024. Sesenta y un muestras (59.22%), presentaron títulos de anticuerpos que pueden atribuirse a la presentación clínica de la DVB, los cuales son de 1:16 hasta 1:2048. La afirmación anterior obedece a que en las vacas que tuvieron esos títulos, habían abortado o eran repetidoras o ambas cosas a la vez, además de que eran rectoras negativas a Brucella spp, Leptospira spp e IBR por pruebas serológicas que se efectuaron simultáneamente.

En el cuadro 1 se observa que la mayoría de los sueros son positivos 83.49%. Mientras que sólo las vacas del rancho San Marcos no tenían anticuerpos contra el virus de la DVB, lo cual puede asociarse con la zona geográfica donde se ubica (Teotihuacán, Edo. de México) y la procedencia de animales de reemplazo; (Canadá ó Estados Unidos) por el contrario el mayor título repetido fue el de 1:1024 en el rancho Pirineos, reiterándose en cinco ocasiones; ubicado en Zumpango Edo. de México.

Se debe de mencionar que se intentó hacer el aislamiento del virus de la DVB a partir de 2 fetos (7 a 8 meses de edad promedio) procedentes del rancho Pirineos, sin tener un resultado favorable.

Según Msollia ²⁴, las poblaciones con una alta prevalencia de anticuerpos contra la DVB están constituidas por individuos que no han tenido contacto previo con el virus, es debido a lo siguiente: el sistema inmunológico reconoce al virus como extraño y por ende la producción de anticuerpos será elevada, en cambio los animales que han tenido contacto con el virus en forma previa, su prevalencia de anticuerpos será baja, ya que, su sistema inmunológico ha estado en contacto con él con anterioridad. De lo anterior se puede mencionar que los títulos de 1:16 a 1:2048 son muy importantes, ya que un ganado sin previo reconocimiento del antígeno exhibirá altos títulos de anticuerpos como se evidenciaron en estos sueros problema, la observación anterior puede ser reforzada por el hecho de que los hatos fueron vacunados contra la DVB deteniéndose el brote; ésto fue realizado en cada una de los de los ranchos muestreados a excepción del rancho San Marcos, en el que se observaron nulos títulos de anticuerpos a DVB.

En los ranchos muestreados con problemas reproductivos se pudo observar que la mayoría de los animales poseían anticuerpos en contra de la DVB sin que estos previamente hayan sido vacunados, por lo que nos llevó a confirmar la presencia de la enfermedad en los mismos; lo cual nos llevaría a cuestionar el ¿cómo?, ¿cuándo?, y ¿por qué? de la enfermedad dentro de los ranchos que años anteriores no habían presentado dichos problemas. De lo anterior mencionado se desprende que el dar la respuesta a cada una de esas preguntas dará un apoyo más al control y prevención de la DVB en el rancho.

En el presente trabajo no se muestreo a los animales en forma pareada, debido a que uno de los objetivos era la detección de anticuerpos en los animales sospechosos de padecer la DVB (Dr. Hernández Jáuregui, P. comunicación personal).

La diarrea viral bovina esta presente en los hatos lecheros provocando problemas reproductivos, y tal vez las fallas reproductivas no solo se deban a esta enfermedad, pues se tendrían que tener en cuenta el resto de las enfermedades infectocontagiosas y no infecciosas para dar un mejor panorama real de la situación prevalente en los hatos y así implementar el control y prevención más adecuados a la situación; y por lo tanto se deben realizar muestreos en forma más general (involucrado otras enfermedades) y no particularizando en una sola.

Medidas de control y prevención.

Las recomendaciones para cada uno de los ranchos son en general las mismas, debido, a que el tipo de manejo de cada uno de los hatos es muy similar en todos, además de presentar un microclima y macroclima muy parecido.

1.- La detección y eliminación de los animales infectados persistentemente es esencial para el control de la infección ^{1,4,18,26}, ya que juegan un rol importante en la transmisión y mantenimiento de la enfermedad para ganado susceptible ^{4,33,43}. Sin embargo esta práctica no se lleva en los hatos que se seleccionaron para este estudio.

2.- Además, la vacunación de todo el ganado es otra medida para el control y prevención ^{1,32}. Como antecedente se debe de tomar en cuenta que el ganado infectado persistentemente no responderá a la vacunación o bien lo hará pobremente; Por lo que los títulos de sueroneutralización deben ser determinados en todos los animales; y el ganado con bajos títulos o nulos títulos deberán ser seleccionados para el aislamiento viral. Las vacunas de virus activo modificado pueden inducir la enfermedad de las mucosas en ganado infectado persistentemente, además de que puede inducir una respuesta de anticuerpos a la cepa viral vacunal y no a la persistente en el animal ¹.

Las vacunas de virus activo modificado (VAM) y las vacunas de virus inactivado (VVI) están disponibles en el mercado; cada una tiene ventajas y desventajas inherentes. Las VVI no son inmunosupresivas; sin embargo, la corta duración de la inmunidad y la baja producción de anticuerpos están asociadas con su uso ²¹. Las vacunas que tienen virus inactivados son más seguras pero requieren refuerzos vacunales para obtener niveles de inmunidad satisfactorios, éstas podrían aplicarse en cualquier etapa de gestación sin riesgo de aborto ^{16,36}. En vacas lecheras se recomienda vacunarlas en período seco pues la vacuna hace que la producción de leche disminuya. El protocolo recomendado es de 2 dosis primeras (2-4 semanas de intervalo) con revacunaciones anuales. Se recomienda vacunar cuando los niveles de anticuerpos maternos van disminuyendo (promedio a los 6 meses de edad) ^{24,36}. Las VVM estimulan fuertemente la respuesta serológica, pero el virus es fetopatogénico ²², además de sobreinfectar a los animales infectados persistentemente dando como resultado la Enfermedad de las Mucosas ^{28,37,38}; a esto se puede agregar que pueden provocar una mayor inmunodepresión que las VVI (por breves períodos), lo que puede precipitar a otras infecciones secundarias. Las ventajas de las vacunas VAM serían: a) son menos costosas, b) las reacciones postvacunales ocurren menos frecuentemente, c) la inmunidad es producida más rápidamente (dentro de 7 - 10 días postvacunación), d) éstas son efectivas contra un gran número de cepas virales, e) inmunidad de mayor duración (de por vida al menos contra cepas homólogas de DVVB). ^{26,36}.

Cuando se presenta un brote severo de DVB de forma entérica en vacas gestantes; la toma de decisiones podría ser muy difícil ya que, el virus de campo de DVB y el virus vacunal vivo modificado pueden cruzar la placenta e infectar al producto. Un control apropiado para un brote de la DVB podría ser vacunar las vacas y novillas gestantes menores de 150 días con

VVI y vacunar el hato restante con VAM. Varios autores han reportado que el ganado vacunado con virus activo no es eliminado ³⁶.

Si a la llegada al rancho, algunos animales muestran signos clínicos de la enfermedad, el hato deberá ser sometido a pruebas serológicas inmediatamente después de su llegada. En otros casos, la vacunación preventiva contra DVB deberá hacerse 3 ó 4 semanas después de su llegada al rancho ²⁰. Esto podría hacerse durante el período de cuarentena.

Las VAM podrían ser aplicadas en madres antes de la inseminación, desde entonces la transmisión transplacentaria del virus vacunal se estaría llevando ³³.

La duración de la inmunidad es buena, cuando la vacuna es administrada en el tiempo en que la inmunidad calostrual no interfiere con la inmunización activa. La falla de la inmunización podría resultar de una temprana vacunación, así como por una vacunación mucho después de lo conveniente, lo cual haría que los becerros fueran susceptibles a la enfermedad ¹⁸. Los anticuerpos pueden persistir hasta los 9 meses en los becerros. Una regla opcional sería vacunar a los animales a los 6 meses de edad y revacunarlos posteriormente ó bien después de ser destetados ⁴¹.

A la llegada de los animales podría vacunarse con VAM, pero esto aunado con el stress de los animales podría ayudar a presentar la enfermedad de DVB así como otras ³⁶.

El uso de vacunas de VAM es bueno si se sabe en que momento se debe aplicar. En el ganado gestante; se recomienda que estas sean aplicadas en el último tercio de la gestación ³⁶.

No se deben de vacunar animales desnutridos, enfermos, parasitados o inmunodeprimidos ⁴⁰.

3.- Las medidas de control de la DVB en un hato incluyen la aplicación de los principios higiénicos de aislamiento de los animales enfermos para limitar la difusión del virus a otros animales susceptibles. Los animales enfermos deben ser tratados en forma sintomática para prevenir infecciones secundarias ^{20,26,36}. Lo recomendable sería la eliminación de estos mismos.

4.- Los solventes orgánicos útiles para desinfectar las áreas contaminadas por estos animales son el éter, cloroformo ^{16,20}, hipoclorito de sodio, detergentes iodoforos, derivados de fenol y formaldehídos ³⁶.

5.- El mejoramiento de la nutrición, sanidad y del alojamiento, pueden ayudar a mejorar el sistema inmune del ganado; la atención a estos detalles de prevención es esencial en sistemas intensivos de producción. El estricto control de entrada y salida de personal y de animales en el rancho es muy importante para mantener el hato libre de DVB. El movimiento de personas especialmente de otros ranchos debe evitarse y además deberá tener una higiene escrupulosa antes de entrar en el rancho. En el rancho debe ser evitado el uso de

equipos como lo son: lazos, narigueros, botas, overoles, etc. de otros ranchos para así evitar la diseminación de dicha enfermedad ³⁸.

6.- Los tapetes y vados sanitarios juegan un importante papel en el control así como prevención de la enfermedad, por lo que su uso deberá ser establecido; se recomienda el uso de cualquiera de los desinfectantes ya mencionados.

Por lo tanto para el control y prevención de la DVB, se pueden aplicar las siguientes medidas:

- a) Vacunación, monitoreo serológico periódico y aislamiento viral.
- b) Mejoramiento nutricional.
- c) Manejo y mejoramiento del medio ambiente.
- d) Limitación de "tráfico" de animales, personas y equipos en el rancho.^{28,38}.

Por otra parte; los títulos por sueroneutralización deberán ser determinados en todo el ganado aproximadamente una semana después de la segunda revacunación (para observar la seroconversión).

Como se ha mencionado anteriormente el ganado restante que sea seronegativo o desarrolle bajos títulos (<1:16) deben reexaminarse para intentar el aislamiento del virus. Siguiendo este protocolo todo ganado infectado persistentemente es detectado y eliminado de el rancho.

Wentink y otros investigadores en 1991 ⁴⁴, observaron que el tratamiento de embriones antes de transferirlos a nuevas receptoras ha ayudado al mejoramiento del control y prevención de la transmisión del VDVB ya que este se adhiere a la zona pelúcida del embrión ⁴.

La mayor incidencia y prevalencia de la DVB se presenta en explotaciones intensivas o estabuladas, debido a la cercanía mayor que hay entre los animales ^{20,38}.

En los animales que evidencien una signología sospechosa a DVB (problemas respiratorios, digestivos ó reproductivos) y que no hayan sido vacunados contra ésta; son altas las posibilidades de que la enfermedad este presente en el rebaño por lo que se recomienda examen serológico periódico, con el fin de ver si hay seroconversión positiva o negativa, con intervalo de 15 días entre cada muestreo.

Las actividades de control de la enfermedad deben estar apoyadas en estudios epizootiológicos para rastrear el origen de la infección y así implementar medidas de control de la misma.

El VDVB es causante de fallas reproductivas en el ganado, teniendo un impacto en los parámetros reproductivos y hasta después del mismo nacimiento del animal^{22,23,32,42}; si esto se multiplica por el número de animales afectados dará como consecuencia pérdidas económicas para el ganadero sin mencionar las medicinas, vacunas, desinfectantes, etc., que se tendrán que utilizar para el control de la enfermedad.

Se sugiere identificar los distintos biotipos del virus de la DVB que existen en el país, lo cual permitirá contar con más elementos para una mejor comprensión de la epidemiología de la enfermedad, lo cual es importante para el control de la misma (recomendando el uso solamente del biotipo involucrado en la enfermedad y así evitar la entrada de un nuevo biotipo a nuestra explotación)^{12,15,27,33}.

Es importante notar que la DVB generalmente no se encuentra por sí sola en el animal^{1,13,20,28,38}, pues se puede presentar simultáneamente con otras enfermedades por su carácter inmunodepresor lo que puede enmascarar el diagnóstico clínico, que a su vez podría causar error en el control y prevención de la DVB. Por lo que es vital buscar el apoyo del laboratorio de diagnóstico.

Cabe mencionar que en México el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, Tecamac, algunos centros de salud animal regionales de la SARH, y otros laboratorios de pruebas en materia zoonosanitaria, tienen instaladas las técnicas de sueroneutralización, ELISA y aislamiento viral para el diagnóstico de la DVB.

CONCLUSION

1.- Se colectaron 103 muestras de suero sanguíneo (100%) de vacas con problemas reproductivos: abortos y repetición de calores; sin tener antecedentes de vacunación al VDVB. Los hatos están localizados en 3 estados de la República Mexicana: Distrito Federal, Edo. de México y Querétaro.

El 83.49% (86 muestras) fueron positivos a anticuerpos contra DVB. Sólo 17 sueros (16.50%) resultaron negativos, por la prueba de sueroneutralización. Los títulos de anticuerpos variaron de 1:2, en cinco sueros hasta 1:2048 que se halló en un solo suero. Sin embargo 61 muestras (59.22%) tenían títulos que fluctuaron de 1:4 hasta 1:1024.

Sesenta y una muestras presentaron títulos de anticuerpos que podrían estar asociados a la presentación clínica de la DVB, desde 1:16 hasta 1:2048. Es factible que estas vacas estaban infectadas por el virus de la DVB en el momento de haber sido colectada la muestra.

2.- Por lo anteriormente descrito puede afirmarse que el virus de la diarrea viral bovina está presente en los hatos lecheros muestreados.

3.- Los ganaderos explotan su ganado sin tener alguna norma zoonosaria a nivel nacional en contra de la DVB. Además, no se realiza ningún manejo para hallar los portadores sanos (infectados en forma persistente) para la prevención y control de la DVB.

4.- La DVB no es la única causa de aborto en los hatos bovinos. Por lo que es importante realizar un muestreo en conjunto de todas las enfermedades causantes de aborto en el hato, empezando por las más frecuentes: Brucelosis, Leptospirosis e IBR.

5.- La entrada de la diarrea viral bovina a nuestros hatos lecheros se debe en gran parte a que en los últimos años se ha incrementado la importación de ganado procedente de Canadá y Estados Unidos, donde la enfermedad está ampliamente distribuida.

LITERATURA CITADA

- 1.- Baam,K.H., Perry,B.D., Lessard,P., Dubovi,E.J.,Hunter, W.S., Epidemiology of Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease in Beef Cattle,Continuing Education Article # 10.,Vol.11, No 8: 1147-1156 Sept.1989.
- 2.- Balak.k., Demonstration of Bovine Viral Diarrhoea Virus Antigens in Cell Cultures and in Paraffin-embedded Tissue Sections by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) Technique Using Monoclonal Antibodies., Brief Communication., Acta Vet. scand. vol. 30 # 2: 231-234, 1989.
- 3.- Blood, Henderson., Medicina Veterinaria., Ed. 6ta., Ed. Interamericana., México D.F. 1987: 825-834
- 4.- Brock, K.V., Donal R. Redman, Mary L. Vickers, Nancy E. Irvine, Quantitation of viral diarrhea virus in embryo transfer flush fluids collected from a persistently infected heifer. J. Vet. Diagn Invest 3:99-100 (1991)
- 5.- Brown,G.B., Bolin,S.R., Frank,D.E.,Roth,J.A., Defective function of leukocytes from cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus, and the influence of recombinant cytokines. Am J Vet Res. Vol 52, No.3: 381-387, March 1991.
- 6.- Brownlie, J., Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. Vet. Microbiol., 23:371-382, 1990.
- 7.- Callis,J.J., Dardiñ,A.H., Manual ilustrado para el conocimiento y Diagnóstico de ciertas enfermedades de los animales. Comisión México-Americana para la prevención de la Fiebre Aftosa., 1982: 35-41
- 8.- Castrucci,G., Frigeri,F., Ferrari and Traldi.V., The vaccination and challenge with bovine viral diarrhea virus (BVDV) of calves previously infected with a non-cytopathic BVDV., Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. Vol.14 No 1: 31-38 (1991).
- 9.- Correa,G.P., Enfermedades virales de los animales domésticos poligástricos., 5ta. ed. Editorial Paradigmas. 73-83 (1988), México.

- 10.- Cortese, V.S., Cravens, L., Dominguez., The prevalence of bovine virus diarrhoea and bovine respiratory syncytial virus in México, Bovine Practitioner, September 1991, 159-161
- 11.- Depner, K. Hubschle, O. J. B. and Liess, B., Prevalence of ruminant pestivirus infections in Namibia, Ouderstepoort J. Vet. Res. 58, 107-109 (1991)
- 12.- Deregt, D., Saad, A. Cho, H. J., Monoclonal Antibodies to the p80/125 and gp53 proteins of bovine viral diarrhoea virus: Their potential use as diagnostic reagents., Can J. Vet Res. 54: 343-348., September 27, 1989.
- 13.- Durham, P.K., Hassard, L.E., Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhoea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta., Can Vet J Volumen 31: 815-820., December 1990.
- 14.- González, S., C., Principales causas de aborto en ganado bovino de doble propósito., Curso de actualización en reproducción bovina, Villahermosa, Tab. Septiembre 8 y 9 de 1994.
- 15.- Greiser, W., Dittmar, K.E., Liess, B., Moennig V., Immunofluorescence studies of biotype-specific expression of bovine viral diarrhoea virus epitopes in infected cells., Journal of General Virology (72) 2015-2019., 1991.
- 16.- Hernández Jáuregui Pablo., Informe de resultados, becerras de cría/complejo agroindustrial, Tizayuca Hgo. 1991 y comunicación Personal.
- 17.- Hewicker, M., W, hrmann, T., Fernandez, A., Trautwein, G., Liess, B. and Moennig, V., Immunohistological detection of bovine viral diarrhoea virus antigen in the central nervous system of persistently infected cattle using monoclonal antibodies. Vet. Microbiol., 23:203-210. (1991).
- 18.- Horzinek, C. M. Liess, B., Virus infections of vertebrates, Bovine viral diarrhoea virus Elsevier Science Publishers B.V. (3) 245-268., 1980.

- 19.- Houe,H., Meyling,A., Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy Herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy., Preventive Veterinary Medicine, 11: 9-16., 1991.
- 20.- Jensen,R., Enfermedades de los bovinos en los corrales de engorda., 1ra.edicion, Ed. Hispano-Americana: 51-59 Méx. 1973.
- 21.- Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Patología de los animales domésticos., Tomo II., 1era. Reimpresión., Ed. Agropecuario Hemisferio Sur: 17-27., España, 1978.
- 22.- Kelling, C.L., Kennedy,J.A., Rump,K., Stine,L.C., Paul,P.S. Partridge,J.E., Monitoring bovine viral diarrhoea virus vaccines for adventitious virus, using T1 ribonuclease viral RNA oligonucleotide fingerprinting., Am. J. Vet. Res. Vol. 52 No.8: 1237-1244., august 1991.
- 23.- Kirkland, P. D., Richards, S. G., Rothwell, J.T., Stanley, D. F., Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections., Vet. Rec. 128, 587-590, (1991).
- 24.- Msolla.p., Sinclair, J.A. Nettleton, P., Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus in Tanzanian cattle., Anim. Hlth prod. 20: 114-116., 1988.
- 25.- Narita, M., Fukunaga, N., Inui, S., Congenital cerebellar hypoplasia in newborn calves, Nat. Inst. Anim. Hlth Quart. 19, 114-120 (1979).
- 26.- Office International des epizooties., Manual of standards for diagnostic test and vaccines 2da. Ed., Paris France., 1992.
- 27.- Onisk, D.V., Srikumaran, S., Kelling, C. L. Frey, M. L. Bovine viral diarrhoea virus-specific bovine monoclonal antibody., Arch virol. 121:219-225., (1991).
- 28.- Pritchard, G. C., Borland, E. D., Wood, L., Pritchard D.G., Severe disease in a dairy herd associated with acute infection with bovine virus diarrhoea virus, Leptospira hardjo and Coxiella burnetii., Veterinary Record, 124, 625-629, June 17, (1989).

- 29.- Reed, D. E., Langpap, T. J., and Bergeland, E., Bovine abortion associated with mixed morar 33/63 type herpesvirus and bovine, Viral diarrhea virus infection., Cornell Vet. 69:54-66. (1979).
- 30.- Reinhardt,G., Riedemann,S., Ernst,S., Aguilar,M., Enriquez,R., Gallardo,J., Seroprevalence of bovine diarrhea/mucosal disease in southern Chile., Preventive Veterinary Medicine, 10: 73-78 1990.
- 31.- Ridpath,J.F., Lewis,T.L., Bolin,S.R., Berry,E.S., Antigenic and genomic comparison between non-cytopathic bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle that had spontaneous mucosal disease., Journal of General Virology, 72: 725-729., 1991.
- 32.- Roberts, K. L., Collins, J. K., Carman, J., Blair, C. D., Detection of cattle infected with bovine viral diarrhea virus using nucleic acid hybridization, J. Vet. Diagn Invest 3:10-15 (1991).
- 33.- Shimizu, M., Current situation of bovine virus diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD) virus infections and their antigenic diversity in Hokkaido, Japan, Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz., 9 (1). 181-194. (1990).
- 34.- Shimizu, M., Murakami, S., Satou, K., Serological comparison of cytopathogenic and non-cytopathogenic bovine viral diarrhoea-mucosal disease viruses isolated from cattle with mucosal disease, Jpn. J. Vet. Sci. 51 (1):157-162, 1989.
- 35.- Shimizu, M., Satou, K., Frequency of persistent infection of cattle with bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in epidemic areas, Jpn. J. Vet. Sci. 49(8):1045-1051, 1987.
- 36.- Shimizu, M., Satou, K., Nishioka, N., Yoshino, T., Momotani, E., Ishikawa, Y., Serological characterization of viruses isolated from experimental mucosal disease. Veterinary Microbiology, 19:13-21, (1989).
- 37.- Shimizu, M., Watanabe, H., Satou, K., Murakami, S., Antigenic diversity of bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD) viruses recently isolated from persistently infected cattle and mucosal disease, and serologic survey on bovine sera using antigenically different BVD-MD viruses, Jpn. J. Vet. Sci. 51(8):1115-1122, 1989.

- 38.- Smith, B.P., Perdrize, J. A., Hjerpe, C., Large Animal Internal Medicine., Bovine virus diarrhea (BVD; Mucosal disease; BVD/MD), Preventive and therapeutic strategies., The C.V. Mosby Company: 731-737, 1486-1507. USA 1990.
- 39.- Steven, R. B., Matthews, P.J., Ridpath, J. F., Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhea virus and antibodies against bovine viral diarrhea virus, J. Vet. Diagn Invest. 3:199-203 (1991).
- 40.- Tarry, D. W., Bernal, L., Edwards, S., Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies., Veterinary Record 128, 82-84, (1991).
- 41.- Tizard Ian., Veterinary immunology: An introduction. Fourth edition, W.B. Saunders Company, printed in México, 1992, 248-259.
- 42.- Villareal T., V.G. Comejo L., Correa G., Estudio serológico de la diarrea viral bovina en diferentes áreas de México. Reunión anual de investigación en Medicina Veterinaria, Inst. Nal. de Investigaciones Pecuarias, SARH, y ENEP-Cuautitlan, UNAM, Diciembre 1978.
- 43.- Ward, P., Misra, V., Detection of bovine viral diarrhea virus, using degenerate oligonucleotide primers and the polymerase chain reaction, Am. J. Vet. Res. Vol 52, No. 8, 1231-1235, August 1991.
- 44.- Wentink, G. H., Exsel A. C., Goey, I., Lieshout, J. A., Spread of bovine virus diarrhoea virus in a heifer calves, The Veterinary Quarterly, Vol. 13, No. 4, 233-236, October 1991.
- 45.- Wentink, G. H., Aarts, T., Mirck, M. H., Exsel, A. C., Calf from a persistently infected heifer born after embryo transfer with normal immunity to BVDV, Veterinary Record, 129, 449-450, (1991).
- 46.- Wilhelmsen, C. L., Steven, R., Ridpath, J. F., Chevillie, N. F., Kluge, J. P., Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhea, Am. J. Vet. Res. Vol. 52, No. 2, 269-275, February 1991.