

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal)



**TESIS DOCTORAL**

**Diarrea vírica bovina: caracterización de aislados españoles  
con anticuerpos monoclonales y seroprevalencia en la  
Comunidad Autónoma de Madrid**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Santiago Vega García**

Directores

**Ricardo de la Fuente López**  
**José Antonio Orden Gutiérrez.**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL I  
(SANIDAD ANIMAL)

**TESIS DOCTORAL**

**DIARREA VIRICA BOVINA: CARACTERIZACIÓN DE  
AISLADOS ESPAÑOLES CON ANTICUERPOS  
MONOCLONALES Y SEROPREVALENCIA EN LA  
COMUNIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

SANTIAGO VEGA GARCIA

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO  
DE  
DOCTOR EN VETERINARIA

Directores de la Tesis:

Dr. D. Ricardo de la Fuente López  
Dr. D. José Antonio Orden Gutiérrez

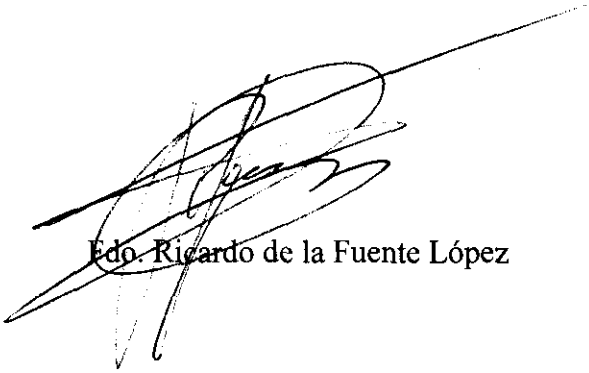
MADRID, 1998.

**D. RICARDO DE LA FUENTE LÓPEZ y D. JOSÉ ANTONIO ORDEN GUTIÉRREZ**, Profesores Titulares del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

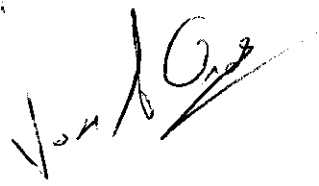
**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada **“Diarrea vírica bovina: caracterización de aislados españoles con anticuerpos monoclonales y seroprevalencia en la Comunidad Autónoma de Madrid”**, que presenta el Licenciado en Veterinaria, por la Universidad Complutense de Madrid **D. Santiago Vega García** para optar al grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al Título de Doctor en Veterinaria.

Y para que conste, a todos los efectos, firmamos el presente en Madrid, a 1 de Septiembre de 1998.



Fdo. Ricardo de la Fuente López



Fdo. José Antonio Orden Gutiérrez

*Santiago Vega García ha sido beneficiario de una beca de Formación y Especialización para Licenciados en Veterinaria de la Comunidad Autónoma de Madrid.*

*A mis padres  
A mi hijo Marcos  
A Yolanda*

- Adiós – dijo.
- Adiós – dijo el zorro -. He aquí mi secreto.  
Es muy simple: no se ve bien sino con el corazón.  
Lo esencial es invisible a los ojos.
- Lo esencial es invisible a los ojos - repitió el principito, a fin de acordarse.
- El tiempo que perdiste por tu rosa hace que tu rosa sea tan importante.
- *El tiempo que perdí por mi rosa... – dijo el principito, a fin de acordarse.*
- Los hombres han olvidado esta verdad – dijo el zorro -. Pero tú no debes olvidarla. Eres responsable para siempre de lo que has domesticado. Eres responsable de tu rosa...
- Soy responsable de mi rosa... – repitió el principito, a fin de acordarse.

Antoine de Saint - Exupéry

## AGRADECIMIENTOS

---

Quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos sin cuya participación esta tesis no hubiera llegado a su fin.

A Ricardo de la Fuente, al que debo algo más que este sincero agradecimiento, por la dirección de este trabajo, por su apoyo y paciencia al soportar todos mis tropiezos y dilaciones en la realización de la tesis. Por su ejemplo profesional y personal que nunca olvidare.

A José Antonio Orden por su impulso para que este trabajo llegara a buen puerto.

A Rosa Rosell del Laboratorio de Sanidad Agraria, Unidad Ganadera, de la Generalitat de Catalunya, por su hospitalidad, su ayuda y sus enseñanzas que tan útiles me han sido, y porque sin su colaboración desinteresada parte del estudio no se hubiera podido realizar. Gracias también por la cesión de muchas de las cepas del virus de la diarrea vírica bovina utilizadas en este trabajo, por permitirme realizar en su unidad la técnica de la inmunoperoxida y utilizar los reactivos necesarios.

A David Paton y, en general a todos los miembros de la sección de pestivirus del Departamento de Virología del Central Veterinary Laboratory de Weybridge, por acogerme en su laboratorio, y prestarme los anticuerpos monoclonales utilizados en este trabajo.

A Angel Asensio Rubio, actual director del Laboratorio de Salud Pública de la Comunidad de Madrid, quien desde el principio puso todos los medios a su alcance, como director del Laboratorio Regional Agrario de la Comunidad de Madrid, para la culminación de este proyecto.

A Fernando Mirat, actual director del Laboratorio Regional Agrario de la Comunidad de Madrid, quien en su etapa como jefe del Servicio de Producción Animal de la Comunidad de Madrid me proporcionó los censos ganaderos de la Comunidad de Madrid.

A Elíseo Guallar y su equipo de la Escuela Nacional de Sanidad, por sus enseñanzas y su inestimable ayuda en la realización del estudio epidemiológico.

A todos los que me facilitaron la recogida de las muestras de sangre: Teresa Jiménez, Carmen Bayon y María de los Angeles Peñaranda.

A todos los ganaderos de bovino de la Comunidad de Madrid que han contribuido a la consecución de este estudio y que soportaron estoicamente mis visitas.

A Santa, Lola, Silvia, y Charo del Departamento de Patología Animal I por su apoyo en los momentos finales de esta tesis.

A los laboratorios Rhône Mérieux, por la financiación económica para la realización de parte de este proyecto.

A mis amigos del Centro Universitario San Pablo CEU-Veterinaria de Valencia Enrique, José Rafael, Vicente, Fernando, Ignacio, María que en todo momento estuvieron preocupados por el estado de salud de este proyecto.

A los amigos de la calle Chiva 1 de Valencia por su apoyo.

A las muchas personas que me han ayudado y apoyado en algún momento.

A mis padres, a los que les debo todo.

A Yolanda y Marcos por todo el tiempo que he dejado de dedicarles y por estar siempre a mi lado en los momentos más difíciles de manera callada.

# ÍNDICE

---

	Pag.
A. RELACIÓN DE TABLAS	
B. RELACIÓN DE FIGURAS	
C. LISTA DE ABREVIATURAS	
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>I.1. ETIOLOGÍA</b> .....	2
<b>I.1.1. Taxonomía del VDVB</b> .....	2
<b>I.1.2. Cultivo del virus y biotipos</b> .....	3
<b>I.1.3. Estructura vírica</b> .....	4
<b>I.1.4. ARN vírico y genotipos</b> .....	4
<b>I.1.5. Proteínas</b> .....	7
<b>I.1.6. Diferencias antigénicas entre los pestivirus</b> .....	8
<b>I.1.7. Utilidad de los anticuerpos monoclonales en el estudio del VDVB y de otros Pestivirus</b> .....	10
<b>I.2. PATOGENIA</b> .....	11
<b>I.2.1. Infección aguda</b> .....	11
<b>I.2.2. Infección intrauterina</b> .....	14
<b>I.2.3. Enfermedad de las mucosas</b> .....	20
<b>I.3. EPIDEMIOLOGÍA</b> .....	26
<b>I.3.1. Distribución geográfica y prevalencia de la infección</b> .....	27
<b>I.3.2. Morbilidad y Mortalidad</b> .....	30
<b>I.3.3. Presentación de las manifestaciones clínicas</b> .....	30
<b>I.3.4. Transmisión de la infección</b> .....	31
<b>I.3.5. Repercusión económica de la infección</b> .....	37
<b>I.4. SÍNTOMAS CLINICOS Y LESIONES</b> .....	37

<b>I.4.1 Cuadro clínico</b> .....	37
<b>I.4.1.1. Infección aguda</b> .....	37
<i>I.4.1.1.1. Diarrea vírica bovina (DVB)</i> .....	38
<i>I.4.1.1.2. Infección venérea</i> .....	38
<i>I.4.1.1.3. Inmunosupresión</i> .....	39
<i>I.4.1.1.4. El VDVB y el Síndrome Respiratorio Bovino (SRB)</i> .....	39
<i>I.4.1.1.5. Síndrome hemorrágico</i> .....	40
<i>I.4.1.1.6. Forma aguda grave</i> .....	40
<b>I.4.1.2. Infección fetal</b> .....	41
<b>I.4.1.3. Enfermedad de las mucosas (EM)</b> .....	42
<i>I.4.1.3.1. Enfermedad de las mucosas aguda</i> .....	42
<i>I.4.1.3.2. Enfermedad de las mucosas crónica</i> .....	43
<b>I.4.2. Lesiones</b> .....	44
<b>I.4.2.1. Infección aguda</b> .....	44
<b>I.4.2.2. Infección fetal</b> .....	44
<i>I.4.2.2.1. Animales PI</i> .....	45
<b>I.4.2.3. Enfermedad de las mucosas</b> .....	45
<b>I.5. DIAGNOSTICO</b> .....	49
<b>I.5.1. Diagnóstico clínico-epidemiológico</b> .....	49
<b>I.5.2. Diagnóstico laboratorial</b> .....	50
<b>I.5.2.1. Métodos directos</b> .....	50
<i>I.5.2.1.1. Aislamiento del virus</i> .....	50
<i>I.5.2.1.2. Detección de antígenos víricos</i> .....	52
<i>I.5.2.1.3. Detección de ácidos nucleicos</i> .....	53
<b>I.5.2.2. Métodos indirectos (serológicos)</b> .....	56
<b>I.5.2.3. Tipo de muestras que deben remitirse al laboratorio y selección             e interpretación de las pruebas diagnósticas</b> .....	58
<i>I.5.2.3.1. Infecciones agudas</i> .....	60
<i>I.5.2.3.2. Abortos</i> .....	60
<i>I.5.2.3.3. Infecciones persistentes</i> .....	61
<b>I.6. PREVENCIÓN Y CONTROL</b> .....	62
<b>I.6.1. Medidas para evitar la infección o reinfección de las explotaciones</b> .....	66
<b>I.6.2. Profilaxis médica</b> .....	68
<b>I.6.2.1. Vacunas atenuadas</b> .....	68
<b>I.6.2.2. Vacunas inactivadas</b> .....	70
<b>I.6.2.3. Recomendaciones de vacunación</b> .....	73

I.6.2.4. Vacunas del futuro .....	77
II. OBJETIVOS .....	79
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	83
III.A.1. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES DE AISLADOS ESPAÑOLES DEL VDVB .....	83
III.A.1.1. Cultivos celulares .....	83
III.A.1.1.1. Líneas celulares .....	83
III.A.1.1.2. Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares BT y MDBK .....	83
III.A.1.1.3. Conservación de líneas celulares por congelación .....	85
III.A.1.1.4. Descongelación de líneas celulares .....	85
III.A.1.2. Producción y titulación de los inóculos víricos del VDVB.....	86
III.A.1.2.1. Virus de referencia utilizados .....	86
III.A.1.2.2. Aislados españoles del VDVB.....	87
III.A.1.2.3. Preparación de las muestras para el aislamiento del VDVB.....	88
III.A.1.2.4. Obtención de inóculos víricos de los aislados del VDBV .....	92
III.A.1.2.5. Titulación de los aislados víricos mediante el método de Inmunoperoxidasa .....	92
<i>III.A.1.2.5.1. Reactivos utilizados</i> .....	93
<i>III.A.1.2.5.2. Realización de la técnica</i> .....	93
III.A.1.3. Anticuerpos monoclonales utilizados .....	94
III.A.1.4. Caracterización de los aislados del VDVB mediante el panel de anticuerpos monoclonales .....	98
III.A.1.5. Análisis de los resultados.....	99
III.B.1. SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE AL VDVB EN EL GANADO BOVINO DE LA CAM .....	105
III.B.1.1. Zona de estudio.....	105
III.B.1.2. Muestra .....	106
III.B.1.2.1. Tamaño de la muestra.....	106
III.B.1.2.2. Técnica de muestreo.....	107
<i>III.B.1.2.2.1. Primera etapa del muestreo: muestreo estratificado</i> .....	107
<i>III.B.1.2.2.2. Segunda etapa del muestreo: muestreo por conglomerados</i> .....	112
III.B.1.2.3. Fuente de las muestras .....	114
III.B.1.3. Análisis de los sueros.....	115
III.B.1.4. Análisis estadístico .....	117
III.B.1.5. Cuestionario.....	117
IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	123
IV.A.1. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES DE AISLADOS ESPAÑOLES DEL VDVB .....	123

<b>IV.A.1.1. Titulación de los aislados españoles del VDVB.....</b>	<b>123</b>
<b>IV.A.1.2. Biotipos observados en los aislados españoles del VDVB .....</b>	<b>123</b>
<b>IV.A.1.3. Reactividad de los aislados españoles del VDVB frente a los anticuerpos monoclonales agrupados según la cepa vírica utilizada para producirlos .....</b>	<b>124</b>
<b>IV.A.1.4. Caracterización de los aislados españoles del VDVB con los anticuerpos monoclonales utilizados.....</b>	<b>128</b>
<b>IV.A.1.5. Representación gráfica de los resultados obtenidos con los anticuerpos monoclonales estudiados y los aislados españoles del VDVB .....</b>	<b>131</b>
<b>IV.B.1 SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE AL VDVB EN EL GANADO BOVINO DE LA CAM.....</b>	<b>139</b>
<b>IV.B.1.1 Muestreo.....</b>	<b>139</b>
<b>IV.B.1.2 Seroprevalencia de anticuerpos frente al VDVB .....</b>	<b>140</b>
<b>IV.B.3. Cuestionario .....</b>	<b>153</b>
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>169</b>
<b>VI. RESUMEN.....</b>	<b>171</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>175</b>

## A. RELACION DE TABLAS

---

	<b>Pag.</b>
<b>Tabla I.1.</b>	Clasificación taxonómica de la familia <i>Flaviviridae</i> ..... 2
<b>Tabla I.2.</b>	Características de las proteínas del VDVB..... 7
<b>Tabla I.3.</b>	Propuesta de una nueva nomenclatura de los pestivirus..... 9
<b>Tabla I.4.</b>	Alteraciones congénitas asociadas con la infección transplacentaria del feto con el VDVB ..... 16
<b>Tabla I.5.</b>	Prevalencia de anticuerpos frente al VDVB realizados en países que no emplean vacunas en los programas de control ..... 27
<b>Tabla I.6.</b>	Prevalencia de anticuerpos frente al VDVB en España..... 29
<b>Tabla I.7.</b>	Modos de transmisión del VDVB..... 32
<b>Tabla I.8.</b>	Comparación de títulos de SNV usando diferentes cepas de referencia del VDVB ..... 57
<b>Tabla I.9.</b>	Interpretación del estado del animal con respecto a la infección de acuerdo con los resultados de las pruebas diagnósticas ..... 59
<b>Tabla I.10.</b>	Relación entre los valores de absorbancia obtenidos por un método ELISA indirecto de detección de Acs en muestras de leche del tanque y el porcentaje estimado de animales seropositivos en la explotación ..... 66
<b>Tabla I.11.</b>	Características de las vacunas atenuadas e inactivadas frente al VDVB con sus ventajas y desventajas ..... 73
<b>Tabla III.A.1</b>	Aislados españoles del VDVB utilizados en este estudio..... 89
<b>Tabla III.A.2.</b>	Ejemplo de una titulación de un aislado vírico por el método de Reed y Muench..... 94

<b>Tabla III.A.3.</b>	Anticuerpos monoclonales cedidos por el CVL. Dilución de uso del panel de cada uno de los anticuerpos monoclonales, cepa vírica frente a la que fueron obtenidos y proteína vírica frente a la que se dirigen.....	95
<b>Tabla III.A.4.</b>	Clase y subclase y títulos de neutralización para cada anticuerpo monoclonal para las dos cepas de VDVB de procedencia NADL y Oregon C24V.....	96
<b>Tabla III.A.5.</b>	Detalle de los resultados obtenidos y del comportamiento de las cepas de referencia con el panel de anticuerpos cedidos por el “Central Veterinary Laboratory” de Weybridge (Inglaterra) que fueron usados para caracterizar los virus de este estudio.....	97
<b>Tabla III.A.6.</b>	Dilución de virus por ml utilizada para infectar células BT o MDBK en microplacas de 96 pocillos para obtener un inóculo final de 300 DI <sub>50</sub> CT/pocillo requerida según el título obtenido para la Inmunoperoxidasa en placa. ....	99
<b>Tabla III.A.7.</b>	Normalización de los valores según la intensidad de la tinción para los distintos anticuerpos monoclonales utilizados.....	100
<b>Tabla III.A.8.</b>	Valores asignados introducidos en el programa PHYLIP según la intensidad de la tinción para los distintos anticuerpos monoclonales utilizados.....	100
<b>Tabla III.A.9.</b>	Descripción de la reactividad de los anticuerpos monoclonales usados en el experimento con los pestivirus bovinos de referencia mediante una prueba de Inmunoperoxidasa.....	102
<b>Tabla III.A.10.</b>	Descripción de la reactividad de los anticuerpos monoclonales usados en el experimento con los pestivirus ovinos de referencia mediante una prueba de Inmunoperoxidasa.....	103
<b>Tabla III.A.11.</b>	Descripción de la reactividad de los anticuerpos monoclonales usados en el experimento con los pestivirus no clasificados de referencia mediante una prueba de Inmunoperoxidasa.....	103
<b>Tabla III.A.12.</b>	Descripción de la reactividad de los anticuerpos monoclonales usados en el experimento con los pestivirus atípicos de referencia mediante una prueba de Inmunoperoxidasa.....	104
<b>Tabla III.B.1.</b>	Resumen por Comarcas de la Organización Administrativa de la CAM. (Servicio de Coordinación Agraria y Tramitación de Ayudas de la Dirección General de Agricultura y Alimentación de la Comunidad de Madrid -no publicados-).....	105
<b>Tabla III.B.2.</b>	Censo Ganadero de la Comunidad de Madrid (1995). Fuente Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaria General Técnica. Entre paréntesis peso con el que ponderan las poblaciones parciales sobre el total del Censo de la CAM.....	106
<b>Tabla III.B.3.</b>	Distribución de las explotaciones de la CAM en función del área geográfica, la tipología, y el tamaño.....	111

<b>Tabla III.B.4.</b>	Distribución del ganado vacuno de la CAM en función del área geográfica, la tipología, y el tamaño.....	111
<b>Tabla III.B.5.</b>	Distribución del tamaño muestral según los criterios antes establecidos .....	112
<b>Tabla III.B.6.</b>	Número y porcentaje de explotaciones seleccionadas en cada uno de los grupos establecidos.....	112
<b>Tabla III.B.7.</b>	Número de explotaciones seleccionadas aleatoriamente por estrato y número de animales que se tomó de cada una de ellas.....	113
<b>Tabla III.B.8.</b>	Animales que quedaron fuera del muestreo por ser de una tipología diferente a la que definía la explotación .....	113
<b>Tabla IV.A.1.</b>	Resultados de la titulación de las cepas de VDVB aisladas en España y utilizadas en este estudio .....	124
<b>Tabla IV.A.2.</b>	Reactividad de los aislados españoles con los AcMos obtenidos frente a la cepa Oregon C24V y que reaccionan con las proteínas vírales gp53 y gp48..	125
<b>Tabla IV.A.3.</b>	Reactividad de los aislados españoles con los AcMos obtenidos frente a la cepa NADL y que reaccionan con las proteínas vírales p80/125 y gp53 .....	125
<b>Tabla IV.A.4.</b>	Reactividad de los aislados españoles frente al AcMo obtenido frente a la cepa de referencia Baker/A y dirigido frente a la proteína viral gp48.....	126
<b>Tabla IV.A.5.</b>	Reactividad de los aislados españoles frente al AcMo obtenido de la cepa de referencia 86/2 y dirigido frente a la proteína viral gp53 .....	126
<b>Tabla IV.A.6.</b>	Reactividad de los aislados españoles frente a los AcMos obtenidos frente a la cepa 87/6 y que reaccionan con las proteínas vírales gp53 y gp48.....	126
<b>Tabla IV.A.7.</b>	Reactividad de los aislados españoles frente a los anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la cepa Vosges y dirigidos frente a las proteínas vírales p80/125, gp53 y gp48 .....	127
<b>Tabla IV.A.8.</b>	Reactividad de los aislados españoles frente a los anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la cepa 59386 y dirigidos a las proteínas vírales p80/125, gp53 y gp48 .....	128
<b>Tabla IV.A.9.</b>	Descripción de la reactividad de los anticuerpos monoclonales usados en el experimento con los aislados españoles del VDVB mediante una prueba de Inmunoperoxidasa.....	133
<b>Tabla IV.B.1.</b>	Número de animales y explotaciones que se analizaron por estrato del total de la población.....	139
<b>Tabla IV.B.2.</b>	Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en el total de animales investigados .....	141
<b>Tabla IV.B.3.</b>	Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB por aptitudes .....	142
<b>Tabla IV.B.4.</b>	Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB por áreas	

	geográficas.....	143
<b>Tabla IV.B.5.</b>	Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB por tamaño de explotación.....	144
<b>Tabla IV.B.6.</b>	Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB por aptitudes y tamaño de explotación .....	147
<b>Tabla IV.B.7.</b>	Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en explotaciones de leche de menos de 100 animales por áreas geográficas .....	148
<b>Tabla IV.B.8.</b>	Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en explotaciones de leche de más de 100 animales por áreas geográficas .....	149
<b>Tabla IV.B.9.</b>	Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en explotaciones de carne de menos de 100 animales por áreas geográficas .....	150
<b>Tabla IV.B.10.</b>	Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en explotaciones de carne de más de 100 animales por áreas geográficas .....	151
<b>Tabla IV.B.11.</b>	Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en explotaciones de cebo de más de 100 animales por áreas geográficas .....	152
<b>Tabla IV.B.12.</b>	Distribución de las explotaciones encuestadas por áreas geográficas y tamaño de explotación .....	153
<b>Tabla IV.B.13.</b>	Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones de leche y carne encuestadas .....	154
<b>Tabla IV.B.14.</b>	Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones lecheras abiertas y cerradas.....	155
<b>Tabla IV.B.15.</b>	Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones de carne abiertas y cerradas .....	156
<b>Tabla IV.B.16.</b>	Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones lecheras en función de que hubiera o no otras especies de riesgo (ovejas y cerdos) .....	157
<b>Tabla IV.B.17.</b>	Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones de carne en función de que hubiera o no otras especies de riesgo (ovejas y cerdos) .....	158
<b>Tabla IV.B.18.</b>	Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones de leche en función del método de cubrición (inseminación artificial -IA-, monta natural -MN-, o ambos -IA + MN-) utilizado .....	159
<b>Tabla IV.B.19.</b>	Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en los animales de las explotaciones lecheras que utilizan y no utilizan la transferencia de embriones.....	160
<b>Tabla IV.B.20.</b>	Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en los animales de las explotaciones lecheras que resultaron positivas y negativas al	

	diagnostico de brucelosis en los últimos 3 años .....	161
<b>Tabla IV.B.21.</b>	Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en los animales de las explotaciones de carne que resultaron positivas y negativas al diagnostico de brucelosis en los últimos 3 años .....	162
<b>Tabla IV.B.22.</b>	Resultados de las respuestas obtenidas al grupo de preguntas referidas a los posibles antecedentes de DVB .....	165
<b>Tabla IV.B.23.</b>	Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones lecheras que utilizan y no utilizan vacunas .....	166
<b>Tabla IV.B.24.</b>	Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones de carne que utilizan y no utilizan vacunas .....	167
<b>Tabla IV.B.25.</b>	Utilización de vacunas frente a la rinotrqueitis infecciosa bovina (RIB), parainfluenza-3 (PI-3), virus respiratorio sincitial bovion (VRSB) y diarreas neonatales en el ganado de leche .....	167
<b>Tabla IV.B.26.</b>	Utilización de vacunas frente a la rinotrqueitis infecciosa bovina (RIB), parainfluenza-3 (PI-3), virus respiratorio sincitial bovion (VRSB) y diarreas neonatales en el ganado de leche .....	166

## B. RELACION DE FIGURAS

---

	<b>Pag.</b>
<b>Figura 1.</b> Mapa genómico de los aislados CP y NCP del VDVB .....	6
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de las distintas alteraciones que pueden producirse en relación con el momento de la infección intrauterina.....	19
<b>Figura 3.</b> Algunos cambios genéticos identificados hasta la fecha que dan lugar a la expresión de la proteína p80/NS23 y a la transformación del biotipo NCP en CP... ..	22
<b>Figura 4.</b> Desarrollo de la EM después de producirse una mutación del virus NCP persistente a virus CP .....	24
<b>Figura 5.</b> Ciclos de infección del VDVB con sus diversas manifestaciones clínicas .....	33
<b>Figura 6.</b> Origen geográfico de los aislados españoles del VDVB .....	87
<b>Figura 7.</b> División de la CAM en 6 comarcas y simplificación a 4 áreas geográficas reuniendo las comarcas 4, 5 y 6 en una única área para realizar el muestreo.....	109
<b>Figura 8.</b> Interpretación de los resultados del ELISA.....	115
<b>Figura 9.</b> Cuestionario.....	118
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de aislados españoles que reaccionan con los diferentes anticuerpos monoclonales dirigidos frente a las proteínas gp53, gp48 y p80/125 .....	118
<b>Figura 11.</b> Relación filogenética de alguno de los pestivirus de rumiantes. Este árbol representa un consenso de cientos de árboles derivados de la misma base de datos .....	136
<b>Figura 12.</b> Mapa antigénico correspondiente a los diferentes virus españoles analizados cualitativamente mediante el programa de distancias antigénicas “MAP” .....	137

## C. RELACION DE ABREVIATURAS

---

<b>Acs:</b>	Anticuerpos	<b>DI<sub>50</sub>CT:</b>	Dosis infectante en cultivo de tejidos al 50 por 100
<b>AcMo:</b>	Anticuerpo monoclonal	<b>dde:</b>	Agua destilada y desionizada
<b>ADN:</b>	Acido desoxirribonucleico	<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>AGID:</b>	Agar gel inmunodifusión	<b>DO:</b>	Densidad Optica
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico	<b>dpi:</b>	Días postinfección
<b>ATTC:</b>	"American Type Culture Collection"	<b>DVB:</b>	Diarrea Vírica Bovina
<b>BT:</b>	Línea celular de cornetes nasales bovinos	<b>EB:</b>	Enfermedad de Border
<b>BRS:</b>	Banco Regional de Sueros	<b>ELISA:</b>	Enzimoimmunoanálisis
<b>CAM:</b>	Comunidad Autónoma de Madrid	<b>EM:</b>	Enfermedad de las mucosas
<b>cADNc:</b>	Ácido dexosirribonucleico complementario	<b>ESVV:</b>	"European Society for Veterinary Virology"
<b>CDF:</b>	Células dendríticas foliculares	<b>gp:</b>	Glicoproteína
<b>CMN:</b>	Células mononucleares	<b>IA:</b>	Inseminación artificial
<b>CP:</b>	Efecto citopático	<b>ISCOMs:</b>	Complejos inmunoestimulantes
<b>CVL:</b>	"Central Veterinary Laboratory"	<b>kb:</b>	Kilobases
		<b>MAPA:</b>	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

<b>MDBK:</b>	Línea celular de riñón bovino	<b>TM:</b>	Título Medio
<b>MEM:</b>	"Minimal Essential Medium"	<b>UE:</b>	Unión Europea
<b>NCP:</b>	Efecto no citopático	<b>UTR:</b>	Región no traducida
<b>nm:</b>	Nanometros	<b>VDVB:</b>	Virus de la Diarrea Vírica Bovina
<b>OIE:</b>	Oficina Internacional de Epizootías	<b>VEB:</b>	Virus de la Enfermedad de Border
<b>OMS:</b>	Organización Mundial de la Salud	<b>VNO:</b>	Vacuno de no ordeño
<b>ORF:</b>	Fragmento de lectura abierta	<b>VOR:</b>	Vacuno de Ordeño
<b>p:</b>	Proteína	<b>VPI-3:</b>	Virus de la Parainfluenza-3
<b>PBS:</b>	Solución salina fosfato	<b>VPPC:</b>	Virus de la Peste Porcina Clásica
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa	<b>VRIB:</b>	Virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina
<b>PC:</b>	Punto de Corte	<b>VRSB:</b>	Virus Respiratorio Sincitial Bovino
<b>PCV:</b>	Plazas de Cebo de vacuno		
<b>PHYLIP:</b>	"Phylogeny Inference Package versión 3.5c"		
<b>PI:</b>	Persistentemente infectados		
<b>PI-3:</b>	Parainfluenza-3		
<b>PK-15:</b>	Línea celular de riñón porcino		
<b>PLA:</b>	Técnica de Inmunoperoxidasa		
<b>PPC:</b>	Peste Porcina Clásica		
<b>RIB:</b>	Rinotraqueítis infecciosa bovina		
<b>RT:</b>	Reacción de la transcriptasa reversa		
<b>SFB:</b>	Suero fetal bovino		
<b>SNC:</b>	Sistema nervioso central		
<b>SNV:</b>	Seroneutralización vírica		
<b>SRB:</b>	Síndrome respiratorio bovino		
<b>TA:</b>	Título Alto		

## I. INTRODUCCIÓN

---

En 1946 Olafson *et al.*, describieron una enfermedad del ganado vacuno que se asemejaba a la peste bovina pero con un curso más leve. Se trataba de un proceso entérico agudo caracterizado por diarrea y lesiones erosivas en el tracto digestivo al que denominaron Diarrea Vírica Bovina. Los primeros estudios sobre el virus de la Diarrea Vírica Bovina (VDVB) confirmaron que se trataba de un nuevo virus diferente al virus de la peste bovina u otros virus (Olafson *et al.*, 1947). Siete años después se describió por primera vez la Enfermedad de las Mucosas (EM) como un proceso entérico de presentación esporádica pero con una mortalidad muy elevada (Ramsey y Chivers, 1953). Durante años se pensó que la Diarrea Vírica Bovina (DVB) y la EM eran procesos diferentes. Sin embargo, en los primeros años de la década de los sesenta se demostró que los virus aislados de estas dos enfermedades eran antigénicamente similares y que, por lo tanto, los dos procesos representaban diferentes manifestaciones clínicas de una misma enfermedad compleja. En este sentido, el Comité de Terminología de la Asociación Americana de Veterinarios propuso en 1968 denominar la enfermedad Diarrea Vírica Bovina-Enfermedad de las Mucosas. Esta denominación se extendió rápidamente en la literatura científica y fue muy utilizada durante años. Desde hace unos años, sin embargo, la tendencia generalizada es utilizar el término de DVB para referirse a todas las manifestaciones clínicas producidas por el VDVB. No obstante, conviene recordar que, como consideran muchos autores, a la luz de los conocimientos actuales sobre las infecciones producidas por el VDVB, la denominación de DVB es poco afortunada y responde a un criterio histórico de nomenclatura más que a un criterio descriptivo, puesto que, en la actualidad, raramente se producen brotes agudos de diarrea asociados al VDVB.

En los años 60 se conoció la estrecha relación existente entre el VDVB y el virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC) (Darbyshire, 1960; Dinter, 1963). Una década más tarde se identificó el virus de la Enfermedad de la Frontera, más conocido por su nombre inglés de Enfermedad de Border (VEB) (Plant *et al.*, 1973), el cual es muy similar al VDVB

(durante muchos años hubo una tendencia a considerar que el VEB era una variante del VDVB).

Para llegar al conocimiento que hoy se tiene de las infecciones producidas por el VDVB se ha recorrido un largo camino en el que los progresos de las investigaciones han sido lentos pero continuos y en el que ha sido decisiva la participación de especialistas en distintas áreas científicas. Especialmente significativos han sido los avances alcanzados en la última década en el conocimiento de la biología molecular del VDVB, de sus mecanismos de patogenidad y de la epidemiología de la infección.

## I.1. ETIOLOGÍA

### I.1.1. Taxonomía del VDVB

Los pestivirus se clasificaron en un primer momento como un grupo particular de virus no transmitidos por artrópodos dentro de la familia *Togaviridae* (Porterfield *et al.*, 1978; Horzinek, 1981). Sin embargo, estudios sobre su organización genómica mostraron profundas diferencias con otros miembros de esta familia (Collet *et al.*, 1988a; Meyers *et al.*, 1989). Esto llevó al *Comité Internacional de Taxonomía de los Virus* a reclasificar a los pestivirus dentro de la familia *Flaviviridae* (tabla I.1) (Francki *et al.*, 1991; Murphy *et al.*, 1995).

Tabla I.1. Clasificación taxonómica de la familia *Flaviviridae*. (Tomado de Murphy *et al.*, 1995).

Géneros	Especies
<i>Flavivirus</i>	Virus de la fiebre amarilla
<i>Pestivirus</i>	Virus de la diarrea vírica bovina (VDVB) Virus de la peste porcina clásica (VPPC) Virus de la enfermedad de border (VEB)
Grupo virus hepatitis C	Virus de la hepatitis C

La familia *Flaviviridae* comprende tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y el grupo de virus de la hepatitis C. Se ha comprobado que hay secuencias de aminoácidos conservadas en las proteínas no estructurales de los virus que componen esta familia (Collet *et al.*, 1989; Koonin y Dolja, 1993). Sin embargo, existen importantes diferencias entre estos géneros. Un ejemplo de estas diferencias es el rango de hospedadores. Así, los *Flavivirus* pueden infectar un gran número de especies tanto de mamíferos como de insectos, mientras que los pestivirus y el grupo de virus de la hepatitis C infectan a un limitado espectro de hospedadores.

El género *Pestivirus* incluye el VDVB, el VPPC y el VEB, los cuales están estrechamente relacionados entre sí. La homología entre estos virus da lugar a reacciones serológicas cruzadas, más intensas en el caso de los anticuerpos (Acs) dirigidos frente a las proteínas no estructurales (Collet *et al.*, 1989; Koonin y Dolja, 1993).

Aunque en la denominación de estos virus se incluye una especie animal, ésta no es su único hospedador y así, los pestivirus del cerdo pueden infectar al vacuno y los pestivirus de vacuno pueden infectar al cerdo induciendo ambas respuestas inmunes cruzadas, lo cual puede originar un problema cuando ambos virus están presentes en una misma zona.

### I.1.2. Cultivo del virus y biotipos

El VDVB se replica bien en células bovinas, ovinas y caprinas, mientras que la replicación en células porcinas es menos eficiente (Bolin *et al.*, 1994). Este virus es capaz de crecer tanto en cultivos primarios como en líneas celulares establecidas. Los cultivos celulares primarios más adecuados para el crecimiento de este virus son los procedentes de riñón, cornetes nasales y, sobre todo, testículos de origen bovino. Dentro de las líneas celulares establecidas se utilizan principalmente las líneas BT (cornetes nasales bovinos), MDBK (riñón bovino) y, menos frecuentemente, PK-15 (riñón porcino). Este virus también se ha adaptado a crecer en células de conejo. Las cepas adaptadas a células de conejo son capaces de infectar a los conejos (el conejo es por el momento el único animal de laboratorio que sirve de hospedador para el VDVB) (Fernelius *et al.*, 1969).

Dentro del VDVB se diferencian dos biotipos según produzcan o no efecto citopático *in vitro* en cultivos celulares (Gillespie *et al.*, 1960; Horzinek, 1981; Liess *et al.*, 1993). La mayoría de las cepas de este virus no inducen cambios morfológicos en las células infectadas, o como mucho pequeños efectos citopáticos, y, por ello, se las denomina como cepas no citopáticas (NCP). Estas cepas NCP se aíslan del 90% del total de las infecciones producidas por el VDVB (Dubovi, 1992). Las cepas que sí producen efecto citopático en los cultivos celulares se denominan cepas citopáticas (CP). El efecto citopático producido por estas cepas es bastante característico y consiste en la formación de áreas en las que las células presentan un citoplasma vacuolizado y granuloso o ya retraído y un núcleo intensamente picnótico. Estas células mueren al cabo de 2 ó 3 días postinoculación (Deregt y Loewen, 1995).

La diferenciación entre cepas citopáticas y no citopáticas no hace referencia a su capacidad para producir enfermedades en los animales (Deregt y Loewen, 1995).

Al parecer las cepas CP surgen por mutación de las cepas NCP (inserción de material genético celular y/o duplicación o delección de genes víricos) (Deregt *et al.*, 1995). Por tanto, el biotipo NCP podría considerarse como el biotipo normal presente en la naturaleza. Una diferencia importante entre las cepas NCP y las CP consiste en el hecho de que las primeras son capaces de establecer infecciones persistentes cuando se produce una infección transplacentaria del feto durante un determinado período de la gestación mientras que las segundas no producen este tipo de infección (ver apartado de patogenia).

Las cepas NCP del VDVB han sido un contaminante habitual de las líneas celulares procedentes de bóvidos y también del suero fetal bovino que se utiliza en los cultivos celulares (debido a que no producen alteraciones morfológicas en los cultivos su presencia pasa desapercibida). Esta contaminación por cepas NCP puede interferir con la detección del VDVB. Además del propio virus es posible que el suero fetal bovino contenga Acs o interferon frente al VDVB lo cual afecta a la detección tanto del VDVB como de los Acs específicos (Rossi *et al.*, 1980).

Todavía no se han diferenciado serotipos dentro del VDVB aunque la diversidad antigénica dentro de este virus es muy amplia. Este hecho tiene una gran trascendencia práctica ya que podría explicar tanto los fallos vacunales como la no detección de todos los animales infectados por este virus mediante determinadas pruebas diagnósticas (Donate y Mazzucchelli, 1995).

### **I.1.3. Estructura vírica**

El virión del VDVB consta de una envoltura esférica de naturaleza lipídica de 40-60 nm de diámetro, la cual rodea a una nucleocápside icosaédrica de 25-37 nm de diámetro (Horzinek, 1981; Francki *et al.*, 1991; Moenning y Plagemann, 1992). En la envoltura se sitúan diversas glicoproteínas: gp48/E0, gp25/E1 y gp53/E2; mientras que en la nucleocápside se localizan el ARN y la proteína de la cápside p14/C (Collet *et al.*, 1989; Collet, 1992).

### **I.1.4. ARN vírico y genotipos**

La información genética del VDVB está contenida en una cadena simple de ARN de polaridad positiva y un tamaño que oscila entre 12,5 y 16,5 Kb (Collet *et al.*, 1988a; Meyers *et al.*, 1989; Meyers *et al.*, 1991; Collet, 1992). Este ARN consta de una región no traducida o no codificante situada en el extremo 5' (UTR 5') de 360-385 bases seguido por un largo fragmento de lectura abierta (ORF) de gran extensión con una capacidad codificante para una única poliproteína de 3898-3988 aminoácidos (Collet *et al.*, 1988a; Meyers *et al.*, 1989; Moormann *et al.*, 1990; Moenning, 1992). A través de procesos de co-traducción y post-traducción se generan las otras proteínas necesarias para la maduración del virión y debido a un proceso proteolítico mediado por proteasas celulares y proteasas víricas se originan las proteínas, tanto estructurales como no estructurales, del virus (Collet *et al.*, 1988b; Wiskerchen y Collett, 1991). Las proteínas codificadas por el ORF del VDVB están representadas en el mapa genómico de la figura 1 (Nettleton y Entrican, 1995).

---

Las proteínas estructurales están codificadas en el primer tercio del genoma en el extremo 5', mientras que las proteínas no estructurales, con la excepción de la proteína p20/Npro, son codificadas por los dos tercios restantes (Collet *et al.*, 1988b). El primer producto del ORF es la proteína no estructural p20/Npro, le siguen las proteínas estructurales tanto de la cápside (p14/C) como de la envoltura (gp48/E0, gp25/E1 y gp53/E2) y, por último, están codificadas las proteínas no estructurales de las cuales cabe destacar la proteína p125/NS23. Una diferencia entre las cepas CP y las NCP consiste en que en las primeras la principal proteína no estructural producida en las células infectadas

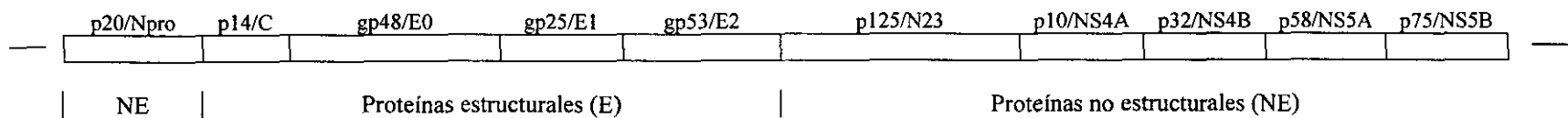
es la proteína p125/NS23 mientras que en el caso de las cepas CP la proteína p125/NS23 es escindida para liberar la proteína inmunodominante p80/NS3 y, en menor medida, la proteína p54/NS2, aunque la proteína p125/NS23 es también detectable. Por tanto, la expresión de la proteína p80/NS3 es un marcador de las cepas CP (Nettleton y Entrican, 1995).

Estudios de diferentes aislados del VDVB han mostrado una notable conservación de la secuencia del ARN vírico (Donis, 1995). Sin embargo, esta conservación no es uniforme a lo largo del genoma: los bloques más conservados se encuentran en la región UTR 5', mientras que las secuencias menos conservadas son inserciones que contienen información genética derivada de la célula hospedadora como es el caso de la secuencia que codifica la proteína p125/NS23 de algunos aislados CP del VDVB.

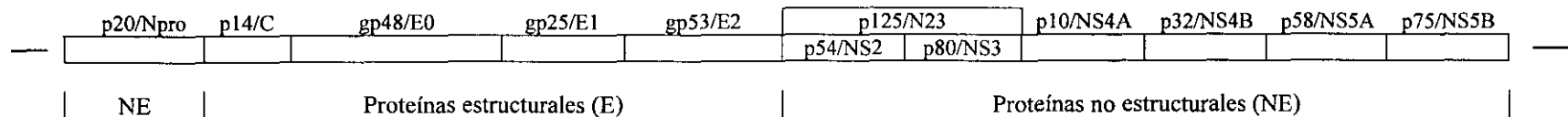
Mediante estudios genéticos se han diferenciado dos genotipos o linajes dentro del VDVB, los cuales se han denominado genotipo I y genotipo II (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994). Las diferencias entre los genomas de ambos genotipos se reflejan en diferencias significativas en la glicoproteína de superficie gp53/E2 (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994). El genotipo I incluye a la mayoría de los aislados de este virus, los cuales constituyen lo que se podría denominar como aislados clásicos. En el genotipo II se incluyen diferentes aislados que producen dos cuadros clínicos asociados con el VDVB de reciente descripción: síndrome hemorrágico y forma aguda grave. Hasta el momento todas las cepas aisladas del genotipo II pertenecen al biotipo NCP del VDVB.

**Figura 1.-** Mapa genómico de los aislados CP y NCP del VDVB. (Tomado de Nettleton y Entrican, 1995).

**Aislados no citopáticos**



**Aislados citopáticos**



### I.1.5. Proteínas

El genoma del VDVB codifica tanto proteínas estructurales como no estructurales. Estas proteínas pueden denominarse bien por números que reflejan su peso molecular o bien por letras que hacen referencia a su función o localización (tabla I.2).

Dentro de estas proteínas destacan las siguientes:

1) p20/Npro: proteasa N terminal. Es una proteína no estructural responsable de la proteólisis vírica (Stark *et al.*, 1993).

2) p14/C: proteína de la nucleocápside altamente conservada dentro de los pestivirus. La función de esta proteína es empaquetar el ARN genómico y proporcionar las interacciones necesarias para la formación de la envoltura del virión. Es una proteína que no induce la aparición de Acs en los animales infectados (Fernelius *et al.*, 1969).

**Tabla I.2.** Características de las proteínas del VDVB.

Proteína	Funciones y/o localización
p20/Npro	Proteasa vírica (proteína no estructural).
p14/C	Proteína de la nucleocápside altamente conservada.
gp48/E0	Proteína de la envoltura.
gp25/E1	Proteína de la envoltura.
gp53/E2	Proteína de la envoltura que induce títulos elevados de anticuerpos neutralizantes. Al parecer interactúa con un receptor de la célula hospedadora.
p125/NS23	Proteína no estructural que parece indispensable en la replicación del virus. Producida por los aislados NCP.
p54/NS2	Proteína no estructural escasamente conservada.
p80/NS3	Proteína no estructural marcadora de los aislados CP. Es la proteína más altamente conservada de los pestivirus.

3) gp48/E0: es una proteína de la envoltura que induce títulos altos de Acs pero con una capacidad limitada de neutralización del virus (Xue *et al.*, 1990; Boulanger *et al.*, 1991). Sin embargo, esta proteína podría intervenir en otros mecanismos de defensa inmunitarios como sugiere el hecho de que en una inmunización de cerdos con un virus recombinante que contenía los genes que codifican las proteínas de la estructura del virión,

con la excepción de los que codifican la proteína gp53/E2, producía una protección de los animales sin la aparición de Acs neutralizantes (Rümenapf *et al.*, 1991).

4) gp25/E1: proteína de la envoltura que se encuentra unida covalentemente a la proteína gp53/E2 por puentes disulfuro. Los sueros de los animales convalecientes no contienen niveles significativos de Acs frente a esta proteína (Donis y Dubovi, 1987a).

5) gp53/E2: es una proteína de la envoltura que contiene una región hipervariable (Donis *et al.*, 1987b; Bolin, 1988; Bolin y Ridpath, 1989; Bolin *et al.*, 1991; Donis *et al.*, 1991) y tiene una gran importancia dado que es la responsable de la generación de los Acs neutralizantes (Bolin *et al.*, 1988; Donis *et al.*, 1988; Magar *et al.*, 1988). Por ello, esta proteína tiene muchas posibilidades de ser utilizada como vacuna de subunidades (Paton *et al.*, 1996). Las diferencias antigénicas en esta proteína entre cepas de VDVB pueden causar fallos vacunales.

6) p125/NS23: es una proteína no estructural del VDVB que parece jugar un papel indispensable en la replicación del virus. Los bóvidos infectados por cepas de campo así como los vacunados con cepas vivas desarrollan una intensa respuesta humoral frente a esta proteína. Sin embargo, los animales vacunados con vacunas inactivadas no presentan Acs frente a esta proteína no estructural (Donis, 1995). Esta proteína está muy conservada dentro de los pestivirus: Acs frente a esta proteína reaccionan con proteínas similares presentes en el VPPC y en el VEB (Wensvoort y Terpstra, 1988; Wensvoort *et al.*, 1989; Paton *et al.*, 1991a).

La proteína p125/NS23 representaría el equivalente de una proteína homóloga de los flavivirus. Así, la proteína p125/NS23 parece abarcar una región que en los flavivirus contiene dos proteínas: NS2 y NS3. Sin embargo, las cepas CP del VDVB producen p80/NS3 como un polipéptido diferenciado. La proteína p80/NS3 puede generarse en cepas CP por escisión proteolítica de la proteína p125/NS23 o por genes duplicados en estas cepas (ver apartado de patogenicidad). Esta proteína ha sido objeto de numerosos estudios debido a que es una proteína exclusiva de las cepas CP del VDVB. Al parecer, la proteína p80/NS3 está directa o indirectamente implicada en el daño celular (Meyers *et al.*, 1991). Es posible que la proteína p80/NS3 escinda y luego destruya proteínas celulares críticas mientras que la proteína p125/NS23 no pueda hacerlo (Deregt y Loewen, 1995).

La proteína p54/NS2 se produce por proteólisis de la proteína p125/NS23, se encuentra en algunos, pero no en todos, de los aislados CP del VDVB, es poco inmunógena y no induce Acs humorales en terneros infectados (Donis y Dubovi, 1987b; Bolin y Ridpath, 1989).

### **I.1.6. Diferencias antigénicas entre los pestivirus**

Mediante el uso de anticuerpos monoclonales (AcMos) y el estudio de las secuencias genéticas se ha comprobado que la actual diferenciación en especies de los pestivirus basada en los hospedadores es insatisfactoria. Además, hay que recordar que los pestivirus no son específicos de hospedador.

Sin embargo, la neutralización heteróloga entre especies de pestivirus por AcMos no se produce ni siquiera cuando hay unión heteróloga por AcMos frente a la proteína gp53/E2. Esto sugiere que la similitud antigénica entre especies de pestivirus es débil en el caso de la glicoproteína gp53/E2 (Weiland *et al.*, 1990; Paton *et al.*, 1991a).

Basándose en estudios con AcMos y de secuencias genéticas realizados sobre un gran número de aislados de pestivirus algunos investigadores han propuesto una subdivisión antigénica de los pestivirus en 4 grupos: VPPC, VDVB clásicos, VEB y pestivirus atípicos (Edwards y Paton, 1995; Paton *et al.*, 1995). El primer subgrupo, VPPC, incluye a la mayoría de los pestivirus aislados de cerdos y no incluye a ningún aislado de rumiantes. El subgrupo de VDVB clásico incluye principalmente virus de origen bovino aunque también se incluyen algunos virus aislados de cerdos y ovejas. En el subgrupo de VEB se incluyen principalmente aislados de ovejas aunque también se han incluido algunas cepas aisladas de cerdos. El cuarto subtipo de pestivirus, pestivirus atípicos, incluye aislados recientes de ovejas (Paton *et al.*, 1994), cerdos (Wensvoort *et al.*, 1989) y bóvidos (Paton *et al.*, 1995) y hasta el momento no hay datos suficientes sobre la distribución de una especie hospedadora para asignarle un nombre basado en el hospedador.

En la tabla I.3 se refleja la nueva nomenclatura propuesta para el grupo de los pestivirus que fue consensuada en el tercer "European Society for Veterinary Virology (ESVV) Symposium on Pestivirus Infections" (Becher *et al.*, 1996).

**Tabla I.3.** Propuesta de una nueva nomenclatura de los pestivirus. (Tomado de Becher *et al.*, 1996).

Pestivirus tipo 1	VDVB tipo I
Pestivirus tipo 2	VPPC
Pestivirus tipo 3	Verdaderos VEB
Pestivirus tipo 4	VDVB tipo II

Dentro de los pestivirus que se aíslan de bóvidos se encuentran principalmente los aislados clásicos del VDVB. Sin embargo, los aislados del genotipo II del VDVB estudiados hasta la fecha se incluyen dentro de los denominados pestivirus atípicos.

Dentro de los pestivirus que se aíslan de ovejas podemos diferenciar tres grupos: VDVB clásicos, VEB y pestivirus atípicos. Dentro del primer grupo se encuentran las cepas clásicas del VDVB (en algunos países el VDVB es actualmente el pestivirus más prevalente en las ovejas). Además, mediante el uso de análisis genéticos se ha comprobado que ciertos aislados del VEB están más relacionados con algunas cepas del VDVB que con la mayoría de las cepas de referencia del VEB (Edwards y Paton, 1995; Paton *et al.*, 1995).

En el grupo del VEB se incluyen la mayoría de las cepas de referencia del VEB (Paton *et al.*, 1995).

En vacuno se ha observado la aparición de nuevas variantes del VDVB (McClurkin *et al.*, 1985; Moenning *et al.*, 1987) que son escasamente neutralizadas por antisueros producidos frente a las cepas de referencia del VDVB. Se ha sugerido que la presión inmune debida al amplio uso de vacunas ha favorecido la aparición de estos nuevos aislados. Además, las cepas del biotipo II del VDVB también son pobremente neutralizadas por los Acs inducidos por las vacunas elaboradas con cepas de VDVB clásicas (Deregt y Loewen, 1995). Todo ello implica que las vacunas basadas en una única cepa de virus pueden no ser eficaces.

Por lo tanto, el criterio actual de denominar las enfermedades producidas por los pestivirus es claramente inconsistente y sería recomendable denominar todas las enfermedades causadas por virus distintos del VPPC con el nombre genérico de pestivirus de rumiantes, el cual sólo sería subdividido cuando las cepas del virus causante hubieran sido caracterizadas como VDVB clásicos, VEB o pestivirus atípicos.

### **1.1.7. Utilidad de los anticuerpos monoclonales en el estudio del VDVB y de otros pestivirus**

Como ya se ha mencionado, el uso de AcMos ha permitido, junto con estudios de ácidos nucleicos, realizar una nueva clasificación de los pestivirus. Además, diversos grupos investigadores han obtenido AcMos que reconocen todos los pestivirus dado que detectan epitopos altamente conservados dentro de este grupo de virus (Cay *et al.*, 1989; Edwards *et al.*, 1991; Moenning *et al.*, 1987). La mayoría, por no decir todos, de esos AcMos están dirigidos frente a la proteína p80/125 y tienen una gran utilidad en las pruebas de diagnóstico.

Algunos investigadores han descrito la obtención de AcMos que reconocían de forma exclusiva todos los aislados del VDVB (Cay *et al.*, 1989; McHugh *et al.*, 1988; Moenning *et al.*, 1987). Sin embargo, en esos trabajos el número de aislados estudiados no fue muy elevado y en otros estudios en los que sí se han incluido un elevado número de aislados de pestivirus no se ha encontrado ningún AcMo que reconozca todos los aislados del VDVB de forma exclusiva (Bolin *et al.*, 1988; Corapi *et al.*, 1990; Deregt *et al.*, 1994; Edwards *et al.*, 1988; Paton *et al.*, 1991a; Xue *et al.*, 1990). Esto se debe a que los aislados del VDVB muestran una elevada variabilidad, superior a la que presentan los aislados del VPPC (frente a los cuales sí se han podido obtener AcMos que reconocen todos los aislados de forma exclusiva -Edwards y Sands, 1990; Edwards *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1989-). A pesar de ello, mediante el uso de paneles de AcMos se pueden caracterizar los distintos tipos de pestivirus aislados de rumiantes. Por tanto, una primera aplicación de los AcMos en el estudio de los pestivirus es la identificación y clasificación de los mismos.

Como se acaba de comentar, se ha comprobado la existencia de una elevada diversidad antigénica entre aislados del VDVB. Por tanto, diversos autores han propuesto crear grupos dentro del VDVB basándose en las diferencias antigénicas entre aislados identificados mediante el uso de AcMos (Bolin *et al.*, 1988; Corapi *et al.*, 1990; Deregt *et*

*al.*, 1994; Edwards *et al.*, 1988; Paton *et al.*, 1991a; Xue *et al.*, 1990). Sin embargo, ninguna de estas clasificaciones han prosperado dada que no parecen tener una aplicabilidad universal. A pesar de ello, es importante la caracterización antigénica mediante AcMos de los aislados del VDVB para la realización de estudios epidemiológicos.

Otro de los campos de interés de los AcMos en el conocimiento de los pestivirus ha sido en los estudios de neutralización del VDVB. En estos trabajos se ha comprobado que la principal proteína implicada en la neutralización del virus es la glicoproteína gp53 y que esta proteína presenta una gran variabilidad entre diferentes aislados del VDVB (Bolin *et al.*, 1988; Corapi *et al.*, 1990; Xue *et al.*, 1990). Por ello, el estudio mediante AcMos de la variabilidad de esta glicoproteína es fundamental para conocer la eficacia de las vacunas.

## **I.2. PATOGENIA**

Las diferentes patologías asociadas con el VDVB tienen una patogenia compleja y, en algunos casos, todavía no bien conocida. La respuesta de los animales a la infección, y el que ésta de o no lugar a un cuadro clínico, depende de múltiples factores interactivos. Entre los factores ligados al hospedador pueden destacarse los siguientes: (a) que el animal sea inmunocompetente o inmunotolerante al VDVB, (b) el estado inmunitario del animal frente al VDVB (es decir, que el animal sea sensible al VDVB o esté inmunizado pasiva -a través del calostro materno- o activamente -por infección previa o vacunación-), (c) que el animal esté o no gestante en el momento de la infección y, si lo está, el momento de la gestación en que se encuentra, (d) que se desarrollen o no otras infecciones intercurrentes y (e) el nivel de estrés ambiental a que está sometido el animal (Baker, 1995). Asimismo, y dada la heterogeneidad genética y antigénica existente entre los aislados del VDVB, la cepa de virus infectante puede jugar un papel en las diferencias que se observan en la respuesta clínica a la infección. De hecho, se han descrito diferencias en la virulencia de distintos aislados NCP del VDVB. Para una mejor comprensión de la patogenia de la infección con el VDVB, hemos estructurado este apartado en tres subapartados: la infección aguda, la infección intrauterina y la EM.

### **I.2.1. Infección aguda**

Las infecciones agudas están causadas fundamentalmente por el biotipo NCP del VDVB, que es el biotipo predominante en la naturaleza. Generalmente se considera que la mayoría de las infecciones postnatales agudas son inaparentes o cursan con un cuadro clínico leve. Un examen minucioso de los animales que sufren la infección subclínica puede poner de manifiesto una elevación de la temperatura corporal y leucopenia durante aproximadamente los días 3 a 7 postinfección.

La visión de que la infección aguda en animales inmunocompetentes es inaparente o leve está siendo, de alguna manera, cuestionada en los últimos años, pues, por una parte, en 1989 se describió un síndrome hemorrágico asociado a la infección aguda con cepas NCP del VDVB (Rebhun *et al.*, 1989) y, por otra, se han descrito recientemente formas clínicas agudas graves de la infección en varios países que recuerdan a la EM (Baker,

1995). Las cepas aisladas hasta la fecha de ambos procesos pertenecen al genotipo II. La descripción de estos procesos contradice la creencia anterior de que la EM era el único mecanismo patogénico que daba lugar a una enfermedad grave o fatal (Donis, 1995). La futura identificación de marcadores de virulencia en las estirpes del genotipo II causantes del síndrome hemorrágico y de la forma aguda grave será de gran ayuda para esclarecer la patogenia de estos procesos, que por el momento se desconoce.

La patogenia de la infección aguda clásica no se conoce con precisión. Es probable que la vía de entrada del virus y la infección inicial tenga lugar en la mucosa oronasal. Tras la infección parece que el virus se replicaría en el tracto respiratorio superior y en el tejido linfoide produciéndose posteriormente una diseminación sistémica. El virus se aísla de escobillones nasales durante unos pocos días postinfección (dpi), pero con un título bajo. La diseminación sistémica de la infección puede producirse como virus libre en el suero o como virus asociado a células sanguíneas de la serie blanca. Los linfocitos y monocitos se consideran especialmente sensibles al VDVB. Durante la leucopenia que se produce tras la infección hay una disminución transitoria tanto de los linfocitos B como de los T, pero a los 11-17 dpi se produce una recuperación total.

El VDVB puede infectar el tejido ovárico y testicular y puede aislarse del semen de toros persistentemente infectados (PI) y con infección aguda. Los toros PI excretan el VDVB continuamente y en gran cantidad en el semen, mientras que en los que sufren la infección aguda la eliminación es transitoria y en menor cantidad, pero esta eliminación se prolonga más allá del período virémico como consecuencia de la replicación local del virus en las vesículas seminales y en la próstata (Kirkland *et al.*, 1991). En el semen el virus se encuentra en el plasma seminal o en los linfocitos (Afshar y Eaglesome, 1990) y no se ha demostrado su presencia dentro de los espermatozoides (Revells *et al.*, 1988).

La infección aguda da lugar a una respuesta inmune tanto de base humoral como celular de larga duración, que en la práctica se considera de por vida. La existencia de Acs neutralizantes en los animales se considera el indicio más significativo de una respuesta inmune efectiva (Potgieter, 1995). La mayoría de los Acs neutralizantes inducidos por la infección están dirigidos contra epítomos de la proteína gp53/E2, que pueden variar entre cepas. Los Acs neutralizantes generalmente aparecen en el suero de 2 a 4 semanas después de la infección y probablemente persisten de por vida. Parece que es necesaria la presencia del virus vivo para que se induzca una respuesta inmune de base celular, y ésta puede ser un mecanismo inmune importante para controlar la infección primaria con el VDVB. Tras el desarrollo de la respuesta inmune es probable que exista una protección de por vida frente a los procesos clínicos causados por el VDVB, pero estos individuos pueden ser sensibles a reinfecciones periódicas (Baker, 1990).

A pesar de que la mayor parte de las infecciones agudas son inaparentes o dan un cuadro clínico leve, es evidente, desde los primeros estudios, que el VDVB puede producir enfermedad. Cuando, como consecuencia de la infección aguda, se producen manifestaciones clínicas el proceso suele denominarse DVB. Se desconoce porqué, en algunas circunstancias, se produce enfermedad. Es posible que ello sea debido a variaciones entre cepas de campo, es decir que existan diferencias de patogenicidad entre

cepas. Además, todavía no está claro si existen o no diferencias de cepas con respecto al tropismo por diferentes órganos como, por ejemplo, el pulmón (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

Una complicación tanto de la infección aguda como de la infección persistente son las infecciones mixtas con otros patógenos. La base para la patogenia de las infecciones mixtas parece ser la inmunosupresión a que puede dar lugar el virus.

La infección con el VDVB puede producir inmunosupresión tanto en los animales seronegativos inmunocompetentes como en los animales PI. Distintos datos clínicos así como resultados laboratoriales y de infecciones experimentales sugieren que muchas infecciones postnatales primarias con el VDVB, sean o no subclínicas, dan lugar en los animales a una inmunosupresión transitoria. En el caso de los animales PI, al menos una proporción de ellos, presentan una respuesta inmune permanentemente alterada (Potgieter, 1995).

Dado que el VDVB tiene afinidad por células inmunocompetentes (los linfocitos y los monocitos son importantes células diana para la replicación del virus), una consecuencia de la infección es la destrucción de alguna de estas células. Otra consecuencia de la infección es el deterioro funcional de células supervivientes, lo que puede ser otra causa, incluso más importante que la destrucción de células, de la inmunosupresión resultante (Potgieter, 1995).

La inmunosupresión inducida por la infección aguda es diferente de la producida por la infección persistente. La provocada por la infección aguda se asocia, al menos parcialmente, con la leucopenia transitoria: hay una disminución del número absoluto de linfocitos T y B así como del porcentaje de algunos subtipos de linfocitos T (disminuyen los subtipos  $BoCD4^+$  -colaboradores- y  $BoCD8^+$  -citotóxicos/supresores-) pero no se alteran los porcentajes de las células no-T no-B -nulas- ni de los monocitos. En los animales PI, sin embargo, no hay una disminución del número absoluto de linfocitos, aunque pueden presentar una proporción menor de linfocitos B circulantes. Además, estudios realizados *in vitro* sobre distintas funciones/disfunciones de células inmunocompetentes procedentes de terneros con infección aguda y de terneros PI han demostrado que existen diferencias importantes en distintos aspectos (Potgieter, 1995).

La inmunosupresión aumenta la sensibilidad de los animales a otros patógenos y puede favorecer o potenciar el desarrollo de infecciones concomitantes, especialmente cuando los animales están sometidos a factores estresantes ambientales o de manejo.

Los resultados obtenidos en multitud de estudios de campo sugieren que el VDVB puede jugar un papel en la patogénesis de procesos de etiología multifactorial. Un buen ejemplo de ello sería la presencia frecuente del VDVB en lesiones del tracto respiratorio de terneros afectados por el síndrome respiratorio bovino (SRB), generalmente junto con *Pasteurella haemolytica* tipo 1 y/o con el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (VRIB) (Potgieter, 1995). La posible participación del VDVB en infecciones sinérgicas con frecuencia pasa desapercibida porque pueden no estar presentes las lesiones típicas de la DVB/EM. El VDVB puede ser un patógeno importante del sistema respiratorio de los

bóvidos no porque ocasione un enfermedad primaria sino porque facilita o potencia infecciones secundarias.

Además, en algunos casos las infecciones intercurrentes con el VDVB parecen potenciar la virulencia de otros patógenos o cambiar la naturaleza de la enfermedad causada por estos patógenos en los bóvidos. Así, por ejemplo, se ha descrito que la infección simultánea del VDVB con el VRIB daba lugar a un proceso clínico grave en el que se produjeron lesiones en el tracto respiratorio, oculares y digestivas (Greig *et al.*, 1981).

Además de las evidencias de campo, los resultados de diferentes estudios experimentales apoyan la interacción sinérgica del VDVB con otros patógenos. Así, por ejemplo, Potgieter *et al.* (1984a) comprobaron que la infección vía aerosol con el VRIB de terneros infectados y no infectados previamente con el VDVB daba lugar a una difusión muy diferente del VRIB, pues, mientras que en los terneros no infectados con el VDVB la difusión del VRIB se limitaba al tracto respiratorio superior y, en menor medida, al tracto respiratorio inferior, en el caso de los terneros infectados previamente con el VDVB se producía una amplia diseminación del VRIB. Según los autores la infección inicial con el VDVB dañaría la capacidad de los terneros para eliminar el VRIB de los pulmones y para contener la infección localmente. Asimismo, los resultados experimentales obtenidos por Reggiardo y Kaeberle (1981) indican que la infección de terneros con el VDVB facilita la diseminación de bacterias endógenas dando lugar a una bacteriemia transitoria que coincide temporalmente con la leucopenia y con la/s disfunción/es de los linfocitos. Según estos investigadores el VDVB deprime los mecanismos de defensa normales presentes en la sangre circulante para eliminar las bacterias.

### **I.2.2. Infección intrauterina**

El VDVB raramente infecta el feto en vacas seropositivas. Parece, por lo tanto, que los Acs maternas son capaces de prevenir la infección transplacentaria. Sin embargo, la infección de animales gestantes seronegativos generalmente da lugar a una infección transplacentaria del feto.

Las consecuencias de la infección fetal son complejas y dependen principalmente del momento de la gestación en que se produce y, posiblemente, de las características de la cepa vírica infectante (potencial patógeno, biotipo, rango de células diana), si bien los factores ligados al virus no se han definido claramente.

Existe cierta incertidumbre sobre la patogenia de la infección durante los primeros 30 días de gestación. Se sabe que el virus se replica libremente en la placenta materna y que durante este período da lugar a una menor tasa de concepción y, consecuentemente, a repeticiones de celo. Sin embargo, también existe el punto de vista de que durante este período la infección transplacentaria sería muy limitada porque el contacto entre el epitelio materno y el trofoblasto fetal no es suficientemente íntimo hasta alrededor de los 30 días cuando se desarrollan los cotiledones fetales.

Los estados de gestación tempranos parecen ser muy sensibles a la infección con el VDVB y con frecuencia se produce la muerte embrionaria o fetal. Así, un resultado relativamente frecuente de la infección con el virus NCP durante los dos primeros trimestres de la gestación (y especialmente entre los días 50 a 100 de gestación) es la muerte fetal con aborto o momificación del feto. La muerte fetal puede producirse directamente por la invasión viral, pero el daño en el placentoma materno puede contribuir a interrumpir el suministro vascular de nutrientes.

Las consecuencias de la infección en los fetos que sobreviven a ella durante los dos primeros trimestres de la gestación dependen, como se indicó antes, del momento del desarrollo fetal (del estado de la organogénesis) y, en particular, del grado de desarrollo de su sistema inmune. Aunque las lesiones en el feto causadas por la infección hasta aproximadamente el día 150 pueden presentar cierta variación individual, existe un modelo más o menos característico según el momento de la gestación en que se produce la infección.

El feto bovino se hace inmunocompetente frente a varios antígenos, es decir, es capaz de reaccionar frente a ellos, de una manera gradual. Así, en general, alrededor del día 100 de gestación comienza la producción de Acs específicos frente a virus. En el caso del VDVB, el feto bovino es capaz de desarrollar una respuesta inmune frente al virus a los 180 días de gestación, y algunos fetos producen Acs frente al virus entre los días 120 y 165 (Potgieter, 1995).

De ahí que una posible consecuencia de la infección del feto desde aproximadamente los 30 días de gestación hasta los 100 a 120 sea el desarrollo de inmunotolerancia. La fase precisa del desarrollo fetal durante la que debe producirse la infección para causar inmunotolerancia se desconoce, pero es poco frecuente después de los 100 días, aunque todavía puede ocurrir a los 125 días de gestación. Dado que durante dicho período el sistema inmune no está suficientemente desarrollado, el feto no reconoce al virus como "extraño" y lo acepta como "propio". Por lo tanto, si la gestación llega a término, el ternero nacerá PI con el virus y, consecuentemente al fenómeno de la inmunotolerancia, carecerá de Acs específicos frente a la cepa infectante. Estudios experimentales y de campo han demostrado que sólo las cepas de virus NCP, pero no las CP, producen la persistencia vírica.

La inmunotolerancia es altamente específica. Los animales PI pueden desarrollar una respuesta inmune frente a cepas del VDVB antigénicamente distintas a la que está produciendo la infección persistente. Los Acs frente al VDVB detectados en los animales PI, dejando aparte los adquiridos por los terneros a través del calostro materno, son consecuencia de que los animales entran en contacto con una cepa del virus antigénicamente diferente bien por exposición natural (superinfección) o por vacunación. Los terneros PI que toman calostro podrán tener Acs frente al VDVB procedentes de la madre, y ello puede interferir el aislamiento del virus a partir de estos animales.

Algunos terneros PI muestran un retraso en el crecimiento al nacer o poco tiempo después y posteriormente tienen una tasa de crecimiento menor que los animales de su edad. Sin embargo, otros terneros PI tienen una apariencia sana y crecen normalmente.

Se ha comprobado que el VDVB está ampliamente difundido en diferentes tejidos de los animales PI existiendo pocas variaciones entre animales, independientemente de las manifestaciones clínico-patológicas. Esta distribución es similar cualitativamente a la encontrada en los casos de EM, pero difiere cuantitativamente, esto es, es mucho menor el número de células infectadas y/o la intensidad de las reacciones inmunohistoquímicas utilizadas para detectar antígeno viral en los animales PI, lo que potencialmente refleja el nivel de replicación del virus y/o el biotipo presente (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

La infección transplacentaria del feto en cualquier momento de la gestación puede producir un retraso en el crecimiento fetal que dará lugar al nacimiento de terneros de menor tamaño del normal, débiles y poco viables. En la enfermedad de Border (EB), producida por otro pestivirus, los corderos también pueden nacer PI y, al igual que ocurre en los terneros, estos corderos pueden ser más pequeños de lo normal al nacer y posteriormente tener una tasa pobre de crecimiento. En los corderos este proceso se ha asociado con una deficiencia de hormonas tiroideas (Baker, 1995).

Otras consecuencias de la infección fetal son las alteraciones teratológicas, entre las que cabe destacar, por su frecuencia, las malformaciones del sistema nervioso central (SNC). En la tabla I.4 figuran las diferentes alteraciones teratológicas asociadas a la infección fetal con el VDVB. Lógicamente, cuando las lesiones producidas por el virus son particularmente graves el feto morirá y será abortado. No obstante, con cierta frecuencia el virus produce daños en determinados tejidos que no son suficientes para que el feto muera y los terneros al nacimiento presentarán una amplia gama de signos clínicos que pueden oscilar desde aparentemente normales o débiles hasta una sintomatología nerviosa clara.

**Tabla I.4.** Alteraciones congénitas asociadas con la infección transplacentaria del feto con el VDVB. (Tomado de Baker, 1990).

<b>SISTEMA NERVIOSO</b>	<b>SISTEMA INMUNE</b>
Microencefalopatía	Aplasia del timo
Hipoplasia cerebelar	
Hidranencefalia	<b>SISTEMA TEGUMENTARIO</b>
Porencefalia	Hipotricosis
Hidrocéfalo	Alopecia
Hipomielinogénesis	
<b>OJO</b>	<b>SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO</b>
Atrofia retinal	Braquignatismo
Neuritis óptica	Retraso en el crecimiento
Cataratas	Artrogriposis
Microftalmia	<b>SISTEMA RESPIRATORIO</b>
Displasia retinal	Hipoplasia pulmonar

La infección transplacentaria del feto entre aproximadamente los días 100 a 150 de gestación puede dar lugar a numerosas alteraciones congénitas. Este período del desarrollo fetal se corresponde con las fases finales de la organogénesis del sistema nervioso y del sistema inmune fetal, lo que puede dar lugar a que se genere una respuesta inflamatoria frente al VDVB.

Brown *et al.* (1973) fueron los primeros autores que demostraron la relación entre el período de la gestación en que se producía la infección y sus consecuencias sobre el desarrollo cerebelar: de 5 novillas infectadas entre los 79 y los 150 días de gestación obtuvieron cuatro casos de degeneración cerebelar en la descendencia. Estos investigadores encontraron, además, que la gravedad de las lesiones aumentaba con la edad del feto en el momento de la infección y, así, la infección después de los 100 días daba lugar a las lesiones cerebelares más graves.

Done *et al.* (1980) en un estudio en el que infectaron 15 novillas gestantes y seronegativas a los 100 días de gestación, observaron que ninguna de las terneras mostró sintomatología clínica, si bien todas seroconvirtieron dentro de las seis semanas postinfección. Cuatro de las novillas abortaron y otra retuvo un feto momificado hasta el día 300. De las restantes 10 novillas nacieron terneros vivos, pero todos mostraban retraso en el crecimiento intrauterino con o sin malformaciones macroscópicas y/o desmielinización del SNC. Tres de los terneros estaban afectados clínicamente de un proceso nervioso congénito. Además, dos de los 10 terneros vivos tenían Acs específicos frente al VDVB.

Resultados análogos se obtuvieron en un estudio realizado con 50 novillas preñadas y seronegativas que fueron inoculadas secuencialmente en diferentes momentos de la gestación con una vacuna viva que contenía ambos biotipos, NCP y CP (Orban *et al.*, 1983; Liess *et al.*, 1984; Trautwein *et al.*, 1986). La inoculación de la vacuna antes del día 90 de gestación dió lugar al nacimiento de terneros virémicos PI sin Acs específicos precalostrales. Los terneros eran clínicamente normales o mostraban retraso en el crecimiento y algunos murieron durante las primeras 24 horas de vida. La inoculación de la vacuna entre los 90 y los aproximadamente 120 días tuvo como consecuencia el nacimiento de algunos terneros con malformaciones graves del SNC (hipoplasia cerebelar, hidranencefalia y/o hidrocefalia interna). En algunos casos pudo detectarse el virus pero otros fueron negativos al virus. Las novillas que fueron inoculadas con la vacuna después de los 120 días parieron terneros normales con Acs precalostrales frente al VDVB, si bien en este grupo de novillas se observaron abortos ocasionales. En ninguno de los terneros se detectó el virus.

La gravedad de las lesiones congénitas oculares también parece depender del momento de la gestación en que se produce la infección (Brown *et al.*, 1975). No se observan lesiones cuando la infección tiene lugar antes de los 90 días de gestación. A los 95 días se encuentran alteraciones leves y las hembras infectadas alrededor de los 150 días parieron terneros con atrofia retinal total.

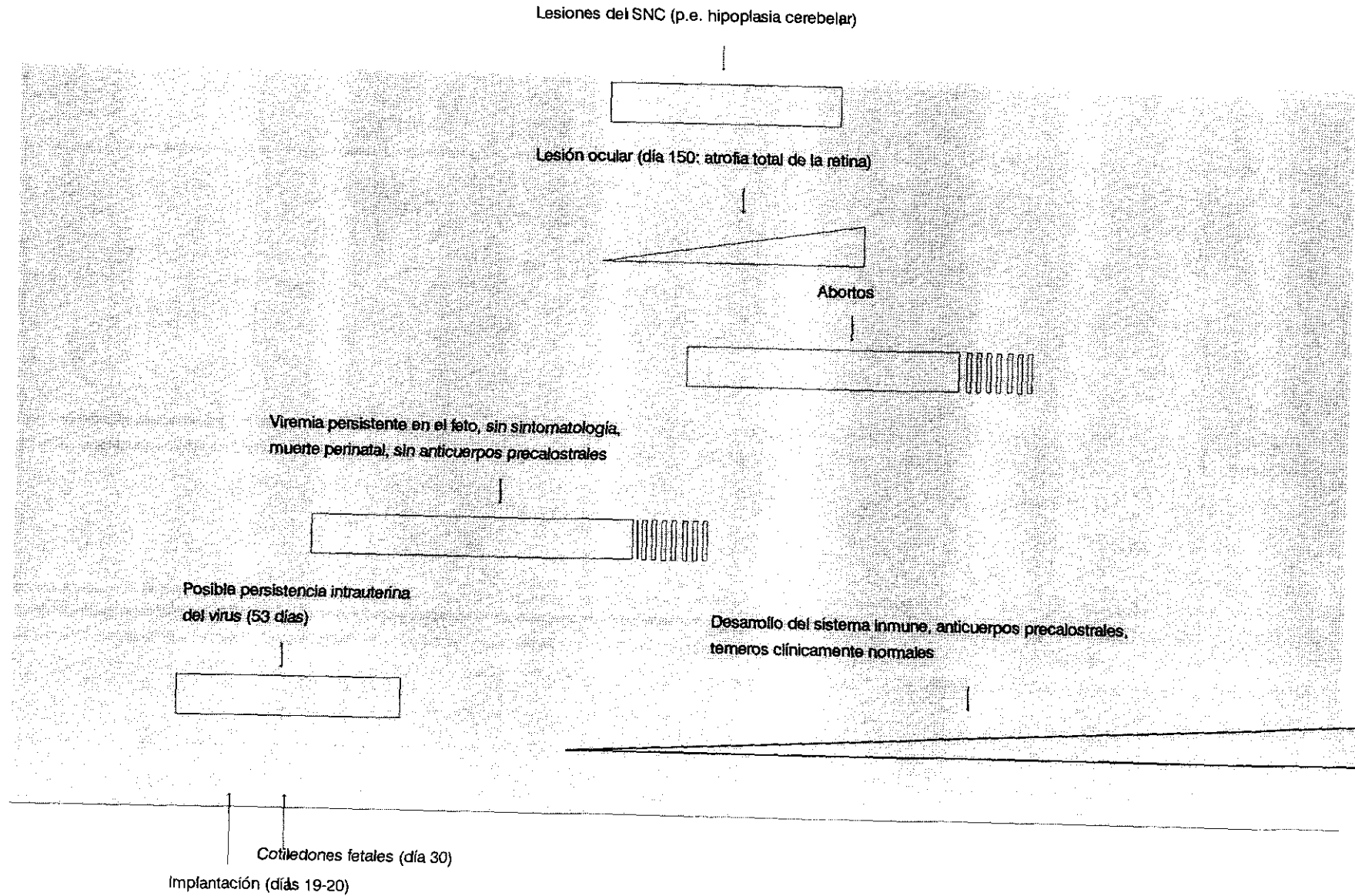
Se conoce poco sobre los mecanismos patogénicos que dan lugar a las alteraciones teratológicas. Por el momento los estudios sobre la distribución del virus en las lesiones del

SNC no han permitido aclarar los mecanismos patogénicos (Bielefeldt-Ohmann, 1995). Se ha sugerido que las lesiones pueden ser consecuencia bien del daño celular producido directamente por el virus o bien de la destrucción de células infectadas con el virus por el sistema inmune en desarrollo. Esta última idea se apoya en el hecho de que en las infecciones experimentales con el VDVB se encuentran casos con graves malformaciones del SNC que, sin embargo, son negativos a la detección del virus. Además de la lisis celular directa, otros posibles mecanismos del daño viral a nivel celular serían la inhibición del crecimiento celular o de la diferenciación celular (Castrucci *et al.*, 1990).

La infección de las hembras durante el último trimestre de la gestación no tiene consecuencias para el feto, pues, para entonces, su sistema inmunitario está suficientemente desarrollado y es capaz de producir una respuesta inmune eficaz frente al VDVB. Los terneros nacerán con Acs precalostrales. Ocasionalmente se han observado abortos atribuidos al VDVB durante este período.

En la figura 2 se representan esquemáticamente las distintas alteraciones que pueden producirse en relación con el momento de la infección intrauterina (Moenning y Liess, 1995).

**Figura 2.** Representación esquemática de las distintas alteraciones que pueden producirse en relación con el momento de la infección intrauterina. (Tomado de Moenning y Liess, 1995).



### I.2.3. Enfermedad de las mucosas

La EM se describió por primera vez en 1953 como un proceso patológico mortal de los bóvidos caracterizado por graves lesiones erosivas en la mucosa intestinal (Ramsey y Chivas, 1953). En los primeros años de la década de los sesenta se demostró que el virus causante de la EM era serológicamente similar al de la DVB. Sin embargo, los intentos de reproducir la EM con aislados víricos de animales afectados fracasaron. De ahí que durante muchos años la patogenia de la EM fuera un autentico misterio.

Cuando comenzaron a utilizarse vacunas vivas atenuadas conteniendo el biotipo CP del VDVB, a mediados de los años sesenta, se comprobó que estas vacunas podían producir problemas postvacunales, el más importante de los cuales era la EM postvacunal, que se presentaba en un número pequeño de animales de 2 a 4 semanas después de la vacunación. Por supuesto, se desconocía el mecanismo que desencadenaba la enfermedad.

Antes de que se llegara a formular una primera hipótesis sobre el origen de la EM, hubieron de acumularse durante años importantes descubrimientos, entre los que cabe destacar: (a) la infección persistente, (b) la inmunotolerancia de los animales PI frente al VDVB, (c) que el origen de los animales PI está en la infección *in utero* durante los 4 primeros meses de gestación, (d) que sólo los animales PI padecen la EM y (e) que, mientras que los animales PI están infectados sólo con el biotipo del virus NCP, los que mueren de la EM están infectados tanto con el biotipo NCP como con el CP. A mediados de los años ochenta, dos grupos de investigadores independientes, Brownlie *et al.* (1984) y Bolin *et al.* (1985) consiguieron reproducir la EM. Ambos grupos llegaron a la conclusión de que para que se produzca la EM se precisa que un animal PI con el virus NCP sufra posteriormente una superinfección con un virus CP. Esta hipótesis se confirmó posteriormente en otros trabajos.

Sin embargo, pronto se comprobó que la cuestión no era tan simple como propugnaba la teoría del virus doble, puesto que la superinfección de animales PI con una cepa CP del VDVB no siempre produce la EM. En efecto, en ciertos casos los animales PI inoculados con una cepa CP, en lugar de desarrollar la EM, producen Acs neutralizantes y permanecen sanos, lo que demuestra que la inmunotolerancia es específica para la cepa vírica persistente.

La caracterización antigénica con Acs policlonales y monoclonales de pares de virus (NCP y CP) aislados de casos naturales de la EM demostró que en la mayoría de los casos el par de virus que se aísla de animales afectados por la EM era antigénicamente similar, por lo que se llegó a la conclusión de que para que se produzca la EM es preciso que el virus CP desencadenante sea antigénicamente similar (homólogo) al virus NCP persistente. La similitud antigénica del virus CP con el NCP propicia que el sistema inmune tampoco reconozca al virus CP como extraño y su replicación incontrolada da lugar a la EM.

El origen de los virus CP es una cuestión que ha intrigado durante años a la comunidad científica. Teniendo en cuenta la ya comentada similitud antigénica entre los pares de virus aislados de los casos naturales de EM, se propuso la hipótesis de que los

virus CP surgían por mutación de los virus NCP en los animales PI. Como veremos a continuación, los estudios genéticos demostraron que se trataba de una visión acertada.

La secuenciación del ARN de cepas CP y NCP así como de pares de virus (NCP y CP) aislados de casos de EM ha permitido identificar diferentes cambios genéticos (mutaciones, deleciones, recombinaciones) en los virus CP que, en todos los casos, dan lugar a la producción de la proteína p80/NS3 mediante la creación de un punto de ruptura en la proteína no estructural p125/NS23 producida por las cepas NCP. Algunos de los cambios genéticos identificados hasta la fecha se representan esquemáticamente en la figura 3. Recordemos que la proteína p80/NS3 es un marcador bioquímico de las cepas CP y que también representa un marcador de virulencia puesto que los aislados CP son responsables de la inducción de la EM.

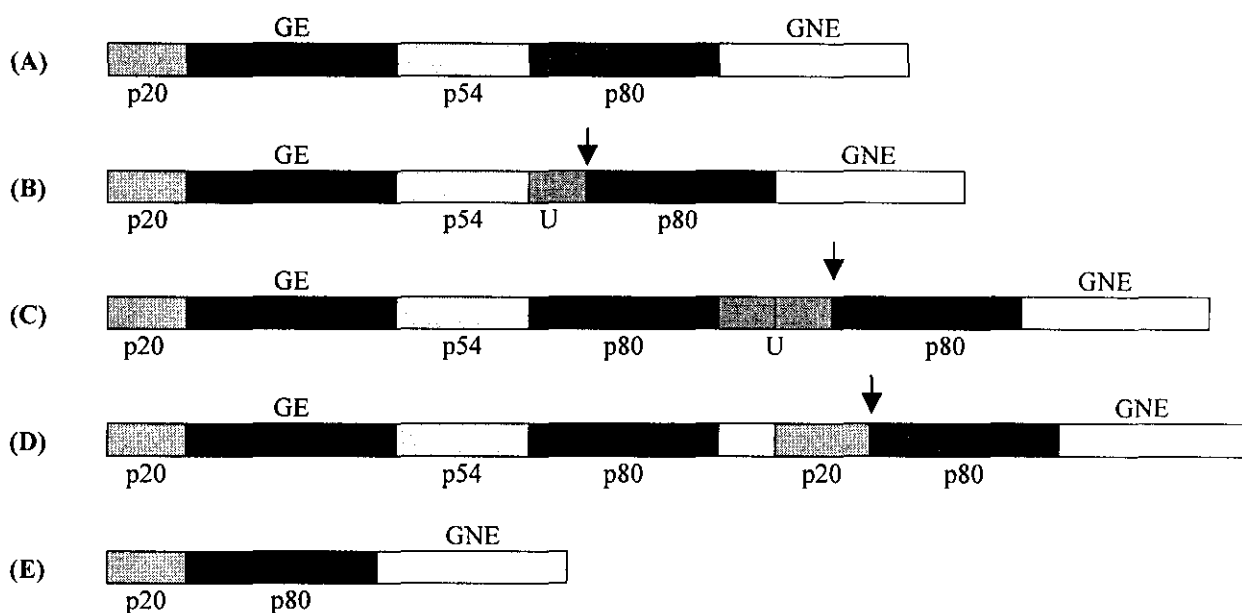
Los cambios genéticos identificados hasta la fecha son consecuencia principalmente de una recombinación del ARN viral con el ARN celular bovino o de una recombinación del ARN viral consigo mismo. Así, como ejemplo del primer caso, se han encontrado inserciones de secuencias de ubiquitina celular, sin duplicación de la región p80/NS3 (fig. 3b, caso de la cepa Osloss) o con duplicación de la región p80/NS3 (fig. 3c) en la región p125/NS23 de cepas CP aisladas de animales con EM. Asimismo, un inserto en la cepa NADL hibrida con secuencias bovinas sin caracterizar. Por otra parte, y como ejemplo de recombinación del ARN viral consigo mismo, Meyers *et al.* (1992) encontraron que dos cepas CP aisladas de casos de EM, en comparación con sus pares NCP, tenían una redistribución y duplicación de secuencias del virus y, en concreto, la secuencia viral p20/Npro duplicada creaba un punto de ruptura para la producción de la p80/NS3 (fig. 3d) (ver apartado de etiología).

Recientemente, Tautz *et al.* (1994) en otro estudio genético de un par de virus procedentes de un caso de EM, encontraron que el agente CP aislado no era un virus con capacidad de replicarse por sí mismo sino una partícula defectiva que dependía para su replicación del virus NCP. La partícula defectiva presentaba una deleción de 4,3 Kb, aproximadamente un tercio del genoma total, que abarcaba toda la secuencia que codifica las proteínas vírales estructurales (fig. 3e). El virus defectivo, sin embargo, expresaba la proteína p80/NS3 y replicaba únicamente en las células infectadas con el virus NCP utilizando las proteínas estructurales producidas por el virus NCP para empaquetar su genoma truncado. Por lo tanto, el virus defectivo, sería antigénicamente idéntico al virus NCP. Tautz *et al.* (1994) consideran que este tipo de virus defectivo podría producir la EM en cualquier animal PI independientemente de las características del virus NCP persistente. Esto necesita probarse experimentalmente.

También se han identificado aislados CP en los que la proteína p80/NS3 se produce sin que haya grandes cambios genéticos, por lo que se asume que dicha producción se debe a mutaciones.

Por el momento se desconoce en qué tejido/célula se produce el cambio o los cambios que dan lugar a la transformación del biotipo NCP en CP.

**Figura 3.-** Algunos cambios genéticos identificados hasta la fecha que dan lugar a la expresión de la proteína p80/NS23 y a la transformación del biotipo NCP en CP. En la figura A se presentan esquemáticamente las secuencias que codifican las proteínas estructurales (genes estructurales – GE-, y las secuencias de las proteínas p20/Npro, p125/NS23 (que comprenden las secuencias de la p54/NS2 y la p80/NS3) y otras proteínas no estructurales (GNE). Las figuras B a E representan diferentes cambios genéticos que dan lugar al biotipo CP y crean sitios nuevos de escisión de proteína (indicado por flechas) para la producción de la p80/NS3 (ver texto). U, ubiquitina celular insertada. (Tomado de Deregt y Loewen, 1995).



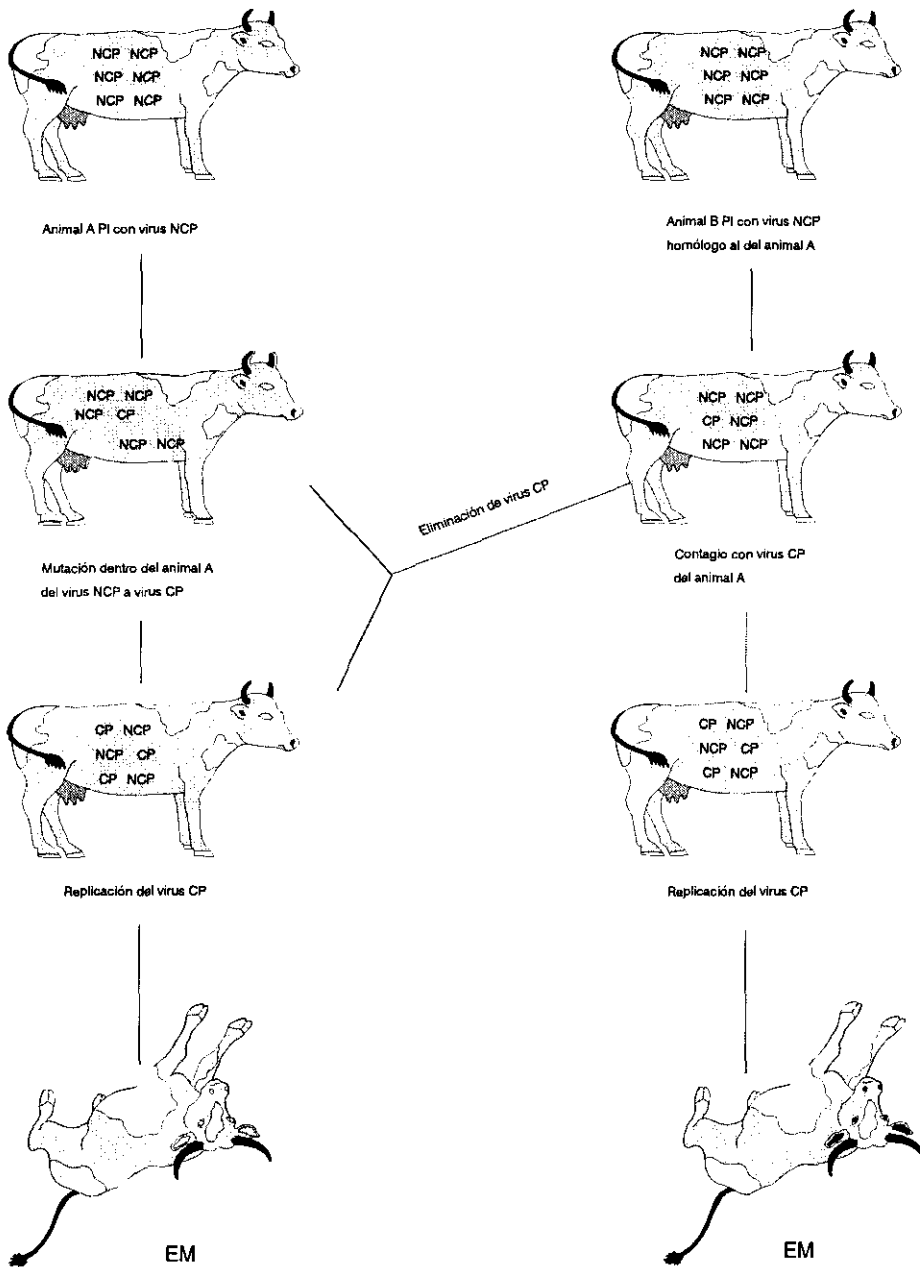
Si el virus CP que surge, por el mecanismo que sea, en un animal PI se difunde a otros animales PI de la explotación, estos desarrollarán también la EM si el virus NCP con el que están persistentemente infectados es similar al del animal en que surgió el virus CP, lo cual es probable dentro de una misma explotación (figura 4). Se ha comprobado que el virus NCP aislado de 18 animales PI de una única explotación eran prácticamente idénticos de acuerdo con su reactividad con AcMos frente a la proteína gp53/E2 (el principal antígeno neutralizante), lo que implicaría que las madres de estos animales se infectaron con una única cepa del virus (Bolin, 1995a). Esto explicaría cómo se produce un brote de EM en una explotación. Hoy en día se piensa que la mayoría de los brotes de EM son consecuencia de una mutación espontánea de un virus NCP que da lugar a un virus CP dentro de un animal PI.

Por el momento, sin embargo, se desconoce el mecanismo último por el que la p80/NS3 produce el efecto CP como también se desconocen los mecanismos que desencadenan la EM. Se han sugerido varias alternativas para explicar el efecto citopático inducido por la p80/NS3: (a) que se produzca una interacción directa de dicha proteína con macromoléculas celulares con alteración de la fisiología celular, (b) que la expresión de la proteína aumente la replicación del virus con la consiguiente acumulación de macromoléculas virales que con su actividad biológica ocasionan la patología celular y (c) una combinación de ambos mecanismos (Donis, 1995). Los datos disponibles hasta ahora son compatibles con una posible implicación de las actividades enzimáticas de la p80/NS3 (helicasa y proteasa) en la patología celular (Donis, 1995). No obstante, hay que destacar que aún no está claro que la p80/NS3 sea el factor citopatogénico y queda la posibilidad de que esta proteína represente sólo un epifenómeno o un marcador útil de otros acontecimientos más decisivos en la relación hospedador-patógeno (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

El efecto citopático inducido por las estirpes CP del VDVB es un fenómeno *in vitro* y se desconoce en qué medida éste tiene lugar *in vivo*. No obstante, la excelente correlación existente entre la citopatogenicidad y la EM sugiere que la capacidad citopática del virus, sola o en combinación con algún mecanismo adicional desconocido hasta ahora, es necesaria para la inducción de la enfermedad (Donis, 1995). La evolución de los virus que causan la EM en los animales PI tiene lugar durante un período de hasta varios años. La citopatogenicidad puede ser sólo uno de los rasgos seleccionados en el curso de la infección persistente, pero no puede descartarse que se produzca una selección concomitante de otros rasgos, lo que podría implicar que la citopatogenicidad fuera necesaria pero no suficiente para que un virus cause la EM (Donis, 1995).

Recientemente Adler *et al.* (1996) han comprobado que la infección de macrófagos procedentes de médula ósea bovina con virus CP prepara las células para una muerte celular inducida (apoptosis) en presencia de lipopolisacáridos. Estos investigadores sugieren que las bacterias o productos bacterianos pueden jugar un papel en la patogenia de la EM al inducir apoptosis en las células expuestas a factores liberados por las células que están infectadas por el virus CP (Adler *et al.*, 1996). Según los autores esto podría explicar la sorprendente localización de las lesiones en el tracto gastrointestinal y en otras áreas expuestas a altas concentraciones de endotoxina.

**Figura 4.-** Desarrollo de la EM después de producirse una mutación del virus NCP persistente a virus CP (izda). Dado que la mutación no afecta a las características antigénicas del virus CP no se producen anticuerpos. La transmisión del virus CP a otros animales de la explotación PI con virus homólogo da lugar a otros casos de EM (dcha.). (Adaptado de Bolin, 1995)



Según Bielefeldt-Ohmann (1995), las lesiones características de la DVB/EM posiblemente tienen una causa multifactorial por combinación del efecto citopático del virus con la respuesta inmune específica y no específica, abarcando esta última la producción local de citoquinas por células no linfoides así como por macrófagos y quizás por linfocitos T CD8<sup>+</sup> y células nulas en respuesta al daño celular o a otras citoquinas. Desde hace unos años se está estudiando el papel de las citoquinas en la patogénesis de la EM, y se ha sugerido que en su génesis puede haber un componente inmunopatológico importante (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

En los animales afectados por la EM el VDVB se encuentra ampliamente difundido en diferentes tejidos.

De acuerdo con lo expuesto hasta ahora, la patogenia de la EM puede resumirse de la siguiente manera. Una hembra gestante seronegativa se infecta con un virus NCP durante los 4 primeros meses de gestación y transmite la infección al feto, el cual al no tener su sistema inmune suficientemente desarrollado no reconoce al virus como "extraño" y lo integra en sus tejidos como "propio", por lo que nacerá PI e inmuntolerante a la cepa vírica infectante. En algún momento de la vida de este animal se produce un cambio genético (mutación, recombinación, delección..) en el ARN del virus NCP que da lugar a un virus CP (figura 4). El sistema inmune del animal no reacciona contra el virus CP porque sus proteínas estructurales son antigénicamente similares a las del virus NCP persistente. El virus CP se disemina en el hospedador causando una destrucción (deplección) del tejido linfoide asociado al intestino y necrosis de la mucosa que lo recubre. El animal desarrolla diarrea, deshidratación y muere de EM.

Esta secuencia de acontecimientos sobre el origen de la EM, sin embargo, todavía no explicaría todos los casos de EM, puesto que se ha comprobado tanto experimentalmente como en brotes naturales de la EM que, en algunos casos, el proceso también puede producirse cuando el virus CP superinfectante no es antigénicamente similar al virus NCP persistente. Dentro de estos casos se incluyen, entre otros, ciertos brotes de EM postvacunal, la controvertidamente denominada EM crónica y los casos de EM que tienen un comienzo retardado.

Se ha conseguido reproducir las formas aguda y crónica de la EM con virus CP que tenían suficientes diferencias antigénicas con el virus NCP persistente como para que los animales PI produjeran Acs neutralizantes frente al virus CP.

Bolin y Ridpath (citado en Bolin, 1995a), analizaron los virus NCP y CP de un brote de EM postvacunal encontrando diferencias entre ellos en la reactividad frente a 10 de 29 AcMo neutralizantes. Las diferencias antigénicas eran compatibles con las diferencias en la secuencias de los ARNs. La secuencia del ARN del virus CP aislado *postmortem* era idéntica a la del virus vacunal en 3 regiones separadas del ARN viral, incluyendo la región genética que codifica la glicoproteína asociada con la neutralización del virus. La similitud genética de los virus NCP y CP aislados *postmortem* era menor del 90%. Por lo tanto, el virus CP aislado *postmortem* era el virus vacunal, que era diferente genética y antigénicamente al virus NCP persistente. Estos resultados apoyarían la opinión de Bolin (1995a), de que, dada la diversidad antigénica del VDVB, es improbable que la

EM postvacunal únicamente se produzca en los animales PI con un virus NCP antigénicamente idéntico al virus vacunal.

Otro ejemplo en el que, a pesar de existir diferencias antigénicas entre el virus CP y el NCP, se produce la EM son los casos conocidos como EM con comienzo retardado. En varios estudios experimentales se inocularon animales PI con un virus CP antigénicamente distinto al virus NCP persistente y, aunque los animales no desarrollaron la EM entre las 2 y las 4 semanas postinfección, el proceso se presentó algunas semanas o meses después. Los animales PI produjeron Acs neutralizantes frente al virus CP con el que fueron inoculados, pero, sorprendentemente, estos Acs no neutralizaban el virus CP aislado *postmortem*. Como explicación a este hecho se ha sugerido que la presión selectiva de los Acs neutralizantes producidos frente al virus CP original inoculado favoreció la replicación de un mutante antigénico citopático frente al que los Acs no eran efectivos.

En otro estudio de un virus CP aislado de un brote de EM vacunal con comienzo retardado, Bolin y Ridpath (citado en Bolin, 1995a), encontraron que el virus tenía una inserción mutacional que implicaba una recombinación entre el ARN del virus NCP persistente y el ARN del virus vacunal. Al igual que en los casos espontáneos de EM, la recombinación genética dió lugar a un virus CP que era antigénicamente idéntico al virus NCP persistente. Según la interpretación de los investigadores, el sistema inmune del animal PI respondió contra el virus vacunal y lo destruyó. Sin embargo, el virus vacunal provocó indirectamente a través de la recombinación con el virus NCP la creación de un virus CP nuevo. El comienzo retardado de la enfermedad reflejaría el tiempo requerido por el virus CP nuevo para replicar en suficiente concentración para inducir la enfermedad.

De los casos expuestos puede deducirse que en el desarrollo de la EM cuando el virus CP infectante no es antigénicamente similar al NCP persistente pueden intervenir distintos mecanismos, algunos de los cuales no son bien conocidos y que, en definitiva podría tratarse de una competición entre el sistema inmune y el virus CP.

### **I.3. EPIDEMIOLOGÍA**

Creemos conveniente comenzar este apartado de epidemiología recordando el concepto tradicional de infección aguda por el VDVB. Se entiende por infección aguda la infección postnatal de animales sensibles seronegativos. Nada tiene que ver, por lo tanto, con la presentación de sintomatología clínica y, de hecho, la mayoría de las infecciones agudas son subclínicas. Este concepto tradicional, por lo tanto, no incluye ni el síndrome hemorrágico ni la forma aguda grave, procesos producidos por el VDVB y descritos en los últimos años.

Las estirpes NCP del VDVB son responsables de más del 90% de las infecciones en los bóvidos, por lo que este biotipo se considera el VDVB estándar. Como se indicó en el apartado de etiología, en la actualidad se reconocen dos genotipos (I y II) dentro del VDVB. Al parecer estos dos genotipos han estado circulando en las poblaciones bovinas al menos desde que se dispone de los aislados más antiguos. De momento se carece de datos que avalen una separación por distribución geográfica de estos genotipos. El genotipo II

presenta una escasa prevalencia en la mayoría de los países (Edwards, 1996a) si bien se ha sugerido que la prevalencia relativa del genotipo II con respecto al I puede estar aumentado en Estados Unidos (Donis, 1995).

### I.3.1. Distribución geográfica y prevalencia de la infección

El VDVB está ampliamente difundido en todos los países con una producción bovina importante, como lo demuestran las encuestas de seroprevalencia realizadas en multitud de países. La proporción de animales seropositivos con frecuencia se sitúa entre el 50 y el 90% (Baker, 1987).

Las encuestas serológicas realizadas en países que no utilizan vacunas en los programas de control son una buena referencia de la amplia difusión de la infección en las poblaciones bovinas, pues en estos casos, lógicamente, los animales seropositivos estuvieron expuestos al VDVB en algún momento de su vida (tabla I.5). Una alta proporción de animales, por lo tanto, sufre la infección durante los primeros años de vida.

**Tabla I.5.** Prevalencia de anticuerpos frente al VDVB realizados en países que no emplean vacunas en los programas de control.

PAÍS	% ANIMALES SEROPOSITIVOS	REFERENCIA
Reino Unido	62,5	Harkness <i>et al.</i> (1978)
	64,9	Edwards <i>et al.</i> (1987)
Dinamarca	78	Meyling (1984)
	64	Houe y Meyling (1991b)
Suecia	45,5	Niskanen <i>et al.</i> (1991)
	41*	Alenius <i>et al.</i> (1986)
Noruega	18,5	Loken <i>et al.</i> (1991)

\*Sólo se incluyeron en el estudio novillas.

Los estudios de prevalencia de rebaños infectados realizados en distintos países demuestran que, salvo en algún país excepcional como Finlandia (sólo 3% de explotaciones infectadas), en el resto de países la mayoría de las explotaciones (entre un 73 y un 100%) sufren la infección (Houe, 1995). Lo normal, por lo tanto, es que sólo ocasionalmente se encuentren explotaciones, especialmente las pequeñas y/o cerradas y/o

aisladas, libres de la infección, es decir, en las que todos los animales son seronegativos (Hjerpe, 1990).

En España se han realizado pocos estudios epidemiológicos sobre la prevalencia de anticuerpos frente al VDVB (tabla I.6). No obstante, los resultados de estos estudios coinciden en general con los publicados en otros países tanto en la proporción de animales seropositivos como en la de explotaciones infectadas. Ovejero en 1971, identificó por primera vez la infección por el VDVB en España y realizó una reducida encuesta serológica con 117 sueros de 4 provincias españolas, encontrando una seroprevalencia de 47,8% (tabla I.6). En un estudio mucho más amplio realizado por Castro *et al.* (1984) una década después sobre 2118 sueros de animales en su mayoría de aptitud cárnica de explotaciones con y sin antecedentes de procesos neumotéricos de 16 provincias se encontró una seroprevalencia media de 43,5% (tabla I.6). La seroprevalencia por provincias osciló entre un 20,5% en Burgos y un 68,3% en Asturias. Hay que destacar que en los años en los que se hizo este estudio (1981-1982) todavía no se utilizaban vacunas en España. Prieto *et al.* (1988) realizaron una encuesta serológica en vacuno lechero de la región asturiana sobre un total de 180 animales pertenecientes a 45 explotaciones de tamaño pequeño-mediano (entre 12 y 20 hembras adultas) en las que nunca se había vacunado frente al VDVB. Estos autores encontraron una prevalencia de animales seropositivos del 48,8% y una prevalencia de explotaciones con al menos un animal seropositivo del 84,4%. Del mismo modo, Marín (1997) sobre un total de 2311 animales con trastornos reproductivos de Extremadura encontró una seroprevalencia del 53,35%. Álvarez *et al.* (1994a) en un estudio reciente sobre 5403 sueros de 118 explotaciones de ganado frisón de la provincia de León encontraron una prevalencia de animales seropositivos de 51,3% y una prevalencia de explotaciones de 91,5%. Finalmente, Sanchez (1998) sobre 203 sueros pertenecientes a 10 explotaciones de ganado bravo de las 35 existentes en la provincia de Badajoz encontró una prevalencia de animales positivos del 65,02% y una prevalencia de explotaciones del 90%.

La prevalencia de la infección por el VDVB, además de como la prevalencia de animales seropositivos, también puede expresarse como la prevalencia de animales PI. Recordemos que los animales PI tuvieron que sufrir la infección con una cepa NCP en el útero materno entre los 40 y los 120 días de gestación cuando todavía no son inmunocompetentes. Por lo tanto, muchas infecciones agudas no dan lugar a animales PI porque la hembra no está en el período de gestación crítico y porque se considera que la inmunidad adquirida previene posteriormente la infección fetal. Además, hay que tener en cuenta que la supervivencia de los terneros que nacen PI es bastante menor que la de los normales. Encuestas realizadas en diferentes países han puesto de manifiesto que la prevalencia de animales PI en las poblaciones bovinas oscilan entre un 0,5 y un 2% (Baker, 1987; Houe, 1995). En España, que nosotros tengamos conocimiento, sólo se ha realizado una encuesta de este tipo por Álvarez *et al.* (1994b) en explotaciones de ganado frisón de la provincia de León. En este estudio se encontró un 0,7% de animales PI y un 25,5% de explotaciones con al menos un animal PI.

Se ha estimado que cuando se realizan encuestas epidemiológicas en explotaciones sin antecedentes claros de la infección, los animales PI pueden alcanzar un máximo del 2% y los animales seropositivos entre un 65 y un 75% (Houe, 1995c). Parece que la infección

en las explotaciones es, de alguna manera, autolimitante: si la incidencia de la infección llega a ser muy alta, habrá un número creciente de animales que adquieran inmunidad antes de alcanzar la edad reproductiva, con lo que nacerán menos terneros PI, lo que a su vez propiciará que baje de nuevo la incidencia de la infección (Houe, 1995c).

**Tabla I.6.** Prevalencia de anticuerpos frente al VDVB en España.

Número de sueros estudiados	Número de explotaciones	Ámbito de la encuesta	% de animales seropositivos	% de rebaños seropositivos	Fuente
117	n.e.	4 provincias	47,8	---	Ovejero, (1971)
2118	n.e.	16 provincias Mayoría de aptitud cárnica	43,5	---	Castro <i>et al.</i> (1984)
180	45	Asturias Ganado lechero	48,8	84,4	Prieto <i>et al.</i> (1988)
5403	118	Provincia de León Ganado lechero	51,3	91,5	Álvarez <i>et al.</i> (1994a)
2311	n.e.	Extremadura	53,3	---	Marín (1997)
203	10	Provincia de Badajoz Ganado bravo	65,0	90	Sánchez (1998)

n.e.: No especificado

### **I.3.2. Morbilidad y Mortalidad**

A pesar de que la mayor parte de las infecciones agudas (entre un 70 y un 90% según estimaciones) son inaparentes (Ames, 1986), el VDVB puede dar lugar a una amplia gama de manifestaciones clínicas entre las que se incluyen la DVB, las derivadas de la infección transplacentaria (repeticiones de celo, abortos, momificaciones fetales, malformaciones congénitas, nacimiento de terneros débiles, nacimiento de terneros PI,...) y la EM. Sin olvidar el síndrome hemorrágico ni la forma aguda grave, procesos ambos asociados con el genotipo II y descritos en los últimos años.

En el caso de la DVB, aunque la morbilidad puede ser alta, la mortalidad es muy baja o nula. La incidencia general de abortos producida por el VDVB se ha estimado entre un 2 y un 7%, si bien cuando se producen brotes en explotaciones no inmunes el porcentaje de abortos puede ser mucho mayor (Baker, 1995). Mucho más difícil resulta hacer estimaciones sobre la incidencia de las malformaciones congénitas o de los terneros que nacen PI. En ambos casos su presentación está relacionada con la infección de hembras gestantes durante un determinado período de la gestación. La estimación de que la prevalencia de animales PI en las poblaciones bovinas oscila entre un 0,5 y un 2% (Baker, 1987; Houe, 1995c) no debe confundirse con la de los terneros que nacen PI. Esta última, lógicamente, será bastante mayor puesto que la estimación dada está basada en encuestas de campo realizadas en distintos países en animales que sobreviven al menos unos meses y, por consiguiente, no incluyen los animales PI que mueren durante los primeros meses de vida.

La EM se considera una forma esporádica de la infección con el VDVB y cuando se presenta en una explotación generalmente afecta a pocos animales (menos del 5%) aunque excepcionalmente se han descrito algunos brotes epidémicos que afectaban hasta el 25% de los efectivos (Baker, 1995). La mortalidad de la EM es prácticamente del 100%. Cuando aparece un brote en una explotación los animales afectados generalmente se encuentran agrupados por la edad y representan terneros que están PI con la misma cepa NCP del VDVB.

### **I.3.3. Presentación de las manifestaciones clínicas**

Las manifestaciones clínicas producidas por la infección con el VDVB se presentan en las explotaciones en el siguiente orden: (1) DVB aguda, (2) trastornos de la reproducción, tales como repeticiones de celo a ciclo largo y abortos, (3) nacimiento de terneros con malformaciones congénitas, débiles y de menor tamaño del normal, (4) casos de retraso en el crecimiento en el colectivo joven y (5) EM (Houe, 1995). No obstante, existe una gran variabilidad entre brotes tanto en el tiempo que transcurre entre las diferentes manifestaciones clínicas como en su gravedad. Además, hay que destacar que es muy raro que en un mismo brote se observen todas las manifestaciones clínicas.

Los trastornos de la reproducción son con frecuencia la primera manifestación de la infección observada en una explotación y, si no están asociados con otras manifestaciones clínicas, pueden no asociarse al VDVB.

Generalmente se precisan al menos 3 semanas desde la infección aguda hasta que se presentan los primeros abortos. Posteriormente, los abortos pueden seguir produciéndose durante varios meses (Roeder *et al.*, 1986) y con frecuencia el problema puede durar aproximadamente un año (Meyling *et al.*, 1990).

Los animales PI suelen nacer de 5 a 9 meses después de la infección aguda. Algunos de los terneros PI pueden presentar alteraciones congénitas, pero la mayoría de los terneros con alteraciones congénitas no están PI y generalmente nacen justo antes que los terneros PI (Houe, 1995c). El período de nacimiento de estos terneros se acompaña de un aumento significativo de la mortalidad perinatal. Los casos de EM se presentan en animales PI generalmente entre los 6 y los 24 meses de edad.

### **I.3.4. Transmisión de la infección**

La forma más frecuente de introducción de la infección en una explotación es a través de la incorporación de animales sanos PI (generalmente novillas) o de hembras gestantes que portan un feto infectado. Existen otros mecanismos de introducción del virus en las explotaciones (tabla I.7) que se discuten a continuación.

La transmisión del VDVB puede ser vertical, de una generación a la siguiente, y horizontal. Las hembras PI que se reproducen dan lugar invariablemente a terneros PI, con lo que se establecen estirpes familiares que pueden ayudar al mantenimiento del virus en las explotaciones.

En la figura 5 se representan esquemáticamente los ciclos de infección del VDVB con sus diversas manifestaciones clínicas.

#### ***Animales persistentemente infectados (PI)***

Los animales PI juegan un papel clave en la epidemiología de la infección puesto que son la fuente principal de difusión y mantenimiento del VDVB. El contacto directo con los animales PI es el principal modo de transmisión de la infección. Dichos animales eliminan continuamente gran cantidad de virus en diferentes secreciones y excreciones, tales como: flujo nasal, saliva, semen, orina, heces, lágrimas y leche. La cantidad de virus en estos animales es muy alta: es posible detectar el virus por aislamiento en muestras de suero diluidas hasta  $10^6$ . Estos animales, por lo tanto, son una fuente continua de virus y transmiten la infección con mucha eficacia a otros animales sensibles.

En la difusión natural del virus la vía de infección más frecuente es la oronasal (posiblemente a través del contacto hocico-hocico), si bien, como se expone más adelante, son posibles otras vías de infección (ver tabla I.7).

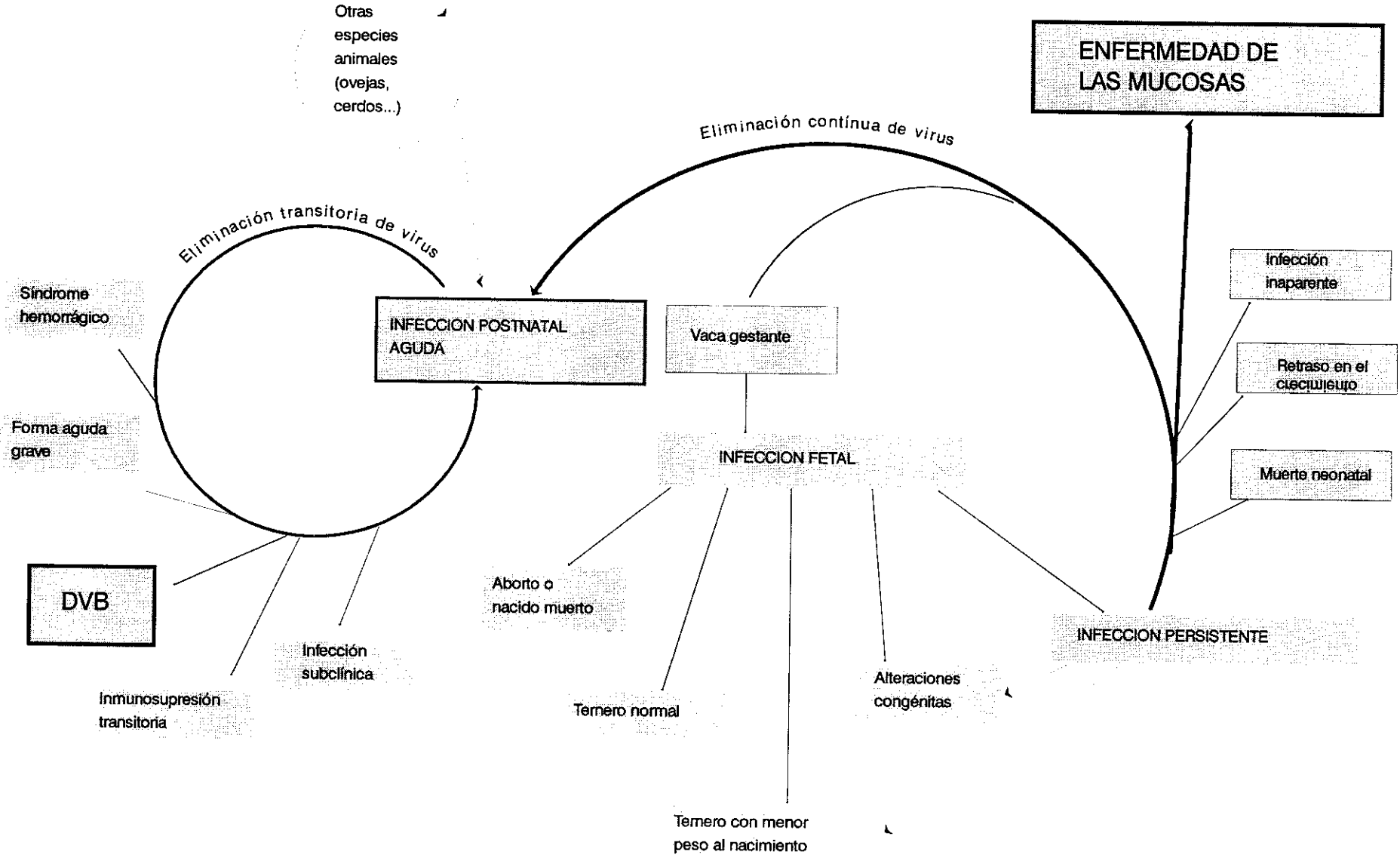
La presencia de animales PI en una explotación, siempre que no se realice una segregación rigurosa del colectivo joven, propicia que la infección se difunda rápidamente a prácticamente todos los animales de la explotación, especialmente si el alojamiento de los animales conlleva un contacto estrecho. Distintos estudios demuestran que la proporción de animales seropositivos en las explotaciones con animales PI es

significativamente mayor que en las que no existen animales PI. Así, por ejemplo, en un estudio realizado en Dinamarca se encontró una media del 87% de animales seropositivos en explotaciones que tenían algún animal PI frente al 43% en explotaciones sin PI (Houe *et al.*, 1991). Asimismo, Álvarez *et al.* (1994a), en un estudio realizado en la provincia de León, hallaron unas prevalencias medias de animales seropositivos del 89,0% y del 51,7% en explotaciones con y sin animales PI, respectivamente.

**Tabla I.7.** Modos de transmisión del VDVB.

TRANSMISIÓN	CARACTERÍSTICAS
Vertical (Prenatal): <ul style="list-style-type: none"> <li>- Transplacentaria                             <ul style="list-style-type: none"> <li>. Infección aguda</li> <li>. Animales PI</li> </ul> </li> <li>- Semen</li> <li>- Transferencia de embriones                             <ul style="list-style-type: none"> <li>. Receptora PI</li> <li>. Donadora PI</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Muy eficiente. Las consecuencias dependen del momento de desarrollo embrionario. Siempre dan animales PI</li> <li>No está clara</li> <li>Siempre se produce infección fetal No está clara</li> </ul>
Horizontal (Postnatal): <ul style="list-style-type: none"> <li>- Contacto con PI</li> <li>- Contacto con infectados agudos</li> <li>- Contacto con otras especies infectadas con el VDVB</li> <li>- Semen</li> <li>- Transferencia de embriones                             <ul style="list-style-type: none"> <li>. Donadora PI</li> </ul> </li> <li>- Yatrogénica                             <ul style="list-style-type: none"> <li>. Vacunas vivas DVB</li> <li>. Otras vacunas contaminadas</li> <li>. Transferencia de embriones</li> <li>. Reutilización de agujas</li> </ul> </li> <li>- Moscas hematófagas (vectores)</li> <li>- Utensilios/ropas (indirecta)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La más importante epidemiológicamente</li> <li>Relativamente poco eficaz</li> <li>Posible</li> <li>Puede ser importante si no se toman medidas de control</li> <li>Posible si los embriones no se lavan adecuadamente</li> <li>Riesgo en hembras gestantes</li> <li>Posible si hay contaminación en la producción</li> <li>Posible si el líquido de lavado está contaminado</li> <li>Riesgo cuando hay animales PI</li> <li>Demostrada experimentalmente. Se desconoce su importancia en la infección natural</li> <li>Posible</li> </ul>

Figura 5. Ciclos de infección del VDVB con sus diversas manifestaciones clínicas. (Adaptado de Duffell y Harkness, 1985)



Las estirpes CP del VDVB surgen, por diferentes cambios genéticos, de los virus NCP en los animales PI (ver apartado de patogenia). Cuando esta transformación se produce en un animal PI, el virus CP al igual que el NCP se elimina por diferentes secreciones y excreciones. Por lo tanto, el virus CP puede difundirse a otros animales PI de la explotación. Y estos desarrollarán la EM si el virus NCP con el que están persistentemente infectados es similar al del animal en el que surgió el virus CP, lo cual es probable dentro de una misma explotación. Esto explicaría como se produce un brote de EM en una explotación.

Cuando la entrada de la infección en una explotación se produce por cualquiera de las otras formas posibles (ver tabla I.7) que no sean la introducción de animales PI o de hembras gestantes que portan un feto infectado, la difusión inicial de la infección suele limitarse a unos pocos animales pero, si están implicadas hembras gestantes, al cabo de unos meses podrán nacer animales PI que transmitirán la infección al resto de la explotación.

### *Animales infectados transitoriamente*

Los animales con infección aguda también pueden actuar como fuente de virus y transmitir la infección a otros animales, aunque con mucha menor eficacia que los PI. Tras la infección aguda se produce una viremia transitoria y el virus se elimina por la mayoría de las secreciones y excreciones generalmente desde el día 4 al día 10 postinfección, aunque en algunos casos la eliminación puede prolongarse algunos días más. No obstante, la cantidad de virus eliminada es muy baja, mucho menor que en los PI (Duffell y Harkness, 1985). En algunos experimentos de transmisión se ha comprobado que los animales con infección aguda no transmitían la infección a otros animales sensibles con los que estaban en contacto (Meyling *et al.*, 1990). Estos estudios demostrarían la escasa eficacia de estos animales para transmitir la infección, si bien hay que tener en cuenta que las condiciones experimentales puede que no mimeticen aquellas en las que se produce la infección natural. La infección aguda puede jugar un papel de cierta importancia en la diseminación del virus cuando se juntan animales de origen diverso. En estas condiciones, y en ausencia de animales PI, se han diagnosticado infecciones por seroconversión o por detección de animales virémicos transitorios (Meyling *et al.*, 1990), lo que indica que en algunas ocasiones se produce la transmisión a partir de los animales con infección aguda.

Si la infección aguda transitoria se produce conjuntamente con una infección respiratoria, es probable que la transmisión se vea favorecida a través de aerosoles (Meyling *et al.*, 1990).

### *Otras especies animales*

El ganado vacuno es el principal reservorio del VDVB. Sin embargo, el VDVB o, para ser más precisos con la terminología usada por muchos autores, pestivirus de rumiantes semejantes al VDVB se han aislado de muchos otros rumiantes (incluyendo la oveja, la cabra y muchas especies de rumiantes mantenidas en cautividad y de vida libre) (Nettleton, 1990; Houe, 1995; Loken, 1995) y del cerdo (Liess y Moenning, 1990). Además, distintas encuestas serológicas han detectado Acs frente al virus en

aproximadamente 50 especies de rumiantes distribuidas en las familias *Camelidae*, *Cervidae*, *Giraffidae*, *Antilocapridae* y *Bovidae* (Nettleton, 1990; Loken, 1995). Estas especies, por lo tanto, se consideran reservorios potenciales del virus. Sin embargo, la importancia epidemiológica de estas especies, a excepción de la ovina, la caprina y quizá de la porcina, como fuente de infección para los bóvidos se desconoce.

La transmisión natural entre especies, que parece requerir un contacto estrecho, se produce sobre todo de los bóvidos a las otras especies y, como es lógico, en esta transmisión juegan un papel fundamental los animales PI. También se ha demostrado la transmisión natural del virus de las ovejas (en las que también se da la infección persistente aunque en menor medida que en los bóvidos) al ganado vacuno (Carlsson y Belak, 1994; Loken, 1995). La cabra y el cerdo, como potenciales portadores del virus, podrían también difundir la infección a los bóvidos.

### *Semen*

Como se indicó anteriormente el VDVB se excreta en el semen tanto de los toros PI como de los que sufren la infección aguda. En los primeros la excrección es continua y la cantidad muy elevada (son frecuentes títulos víricos de  $10^4$ - $10^5$  DI<sub>50</sub>CT/ml), mientras que en los toros con infección aguda la excrección es transitoria y mucho menor.

Las vacas seronegativas que se inseminan con semen contaminado se infectan, pero por esta vía de transmisión raramente se producen fetos PI. En un experimento en el que se inseminaron 12 novillas seronegativas con semen de un toro PI, todas seroconvirtieron en un plazo de dos semanas, todas quedaron preñadas y todas parieron terneros vivos, pero sólo uno de los terneros estaba PI (Meyling y Jensen, 1988). Es fácil deducir que la transmisión horizontal por el semen puede jugar un papel importante en la difusión del virus si no se toman las medidas de control adecuadas. No está claro, sin embargo, si a través del semen puede producirse la transmisión vertical, pues en el caso mencionado antes del ternero PI nacido de una novilla inseminada con semen contaminado, es posible que la infección del feto procediera de la madre, que después de infectarse con el semen transmitiera la infección al feto. Se ha encontrado que el riesgo de transmisión venérea de la infección es mayor en la monta natural que cuando se utiliza la inseminación artificial (IA) (Grahm *et al.*, 1984), lo cual parece lógico.

La presencia de toros PI en los centros de recogida de semen para inseminación artificial representa, lógicamente, un gran riesgo para la difusión del virus. Teniendo en cuenta (a) que la prevalencia de animales PI en las poblaciones bovinas oscila entre un 0,5 y un 2%, (b) que parte de los animales PI pueden llegar a adultos sin mostrar manifestaciones clínicas y (c) que los centros de reproducción evalúan anualmente cientos de toros como potenciales reproductores de élite, es muy probable que algunos de estos animales estén PI. Así, por ejemplo, Howard *et al.* (1990) en un estudio realizado en cuatro grandes centros de inseminación en los Estados Unidos detectaron 12 toros PI sobre 1538 animales estudiados. Curiosamente 10 de los 12 toros PI habían nacido por transferencia de embriones.

Kirkland *et al.* (1994) estudiaron las consecuencias del uso a gran escala de dosis seminales procedentes de un toro PI de 2 años de edad, aparentemente sano y con un peso corporal normal. El semen de este animal se catalogó como de calidad normal con respecto a la densidad, motilidad y criterios morfológicos. Dentro del programa de evaluación de este toro se llegaron a utilizar aproximadamente 600 pajuelas en vacas seleccionadas de 97 explotaciones. En el análisis retrospectivo de las consecuencias del uso del semen se comprobó (a) que el porcentaje de concepción a primera inseminación fue muy bajo (38%), (b) que todas menos una de las 162 vacas inseminadas eran seropositivas al VDVB, mientras que, en comparación, de 143 vacas de las mismas explotaciones inseminadas con otros toros sólo 95 (66,4%) eran seropositivas, y (c) que de 61 terneros nacidos del toro y estudiados virológicamente únicamente 2 estaban PI siendo el resto normales y no infectados.

### ***Transferencia de embriones***

La transmisión vertical también se produce tras la transferencia de embriones si la hembra receptora está PI. Si es la hembra donadora la que está PI, el VDVB está presente en gran cantidad en el ambiente uterino (Brock *et al.*, 1991) y, aunque parece que no penetra la zona pelúcida del embrión si está intacta, se transmitirá con el embrión si los lavados de éste no se realizan adecuadamente. La transmisión en este caso es inicialmente horizontal, si bien no puede descartarse que la hembra receptora, que sufrirá la infección aguda, transmita posteriormente la infección al embrión.

### ***Infección yatrogénica***

En la infección yatrogénica incluimos aquellas intervenciones veterinarias que pueden dar lugar a la transmisión del VDVB. La vacunación de hembras gestantes seronegativas con vacunas vivas puede dar lugar a la infección transplacentaria del feto con las mismas consecuencias de la infección natural incluyendo el posible nacimiento de terneros PI. También se ha descrito la difusión de la infección por el empleo de vacunas frente a otros agentes que estaban contaminadas con el VDVB. Recordemos que el VDVB es, o al menos lo era antes de extremarse las medidas de control, un contaminante frecuente de los lotes de suero fetal bovino preparados comercialmente. De igual manera la infección puede transmitirse durante la transferencia de embriones si el líquido de lavado contiene suero fetal bovino contaminado. Experimentalmente se ha demostrado que la reutilización de una aguja de inyección en un animal sensible a los 3 minutos de haber sido utilizada en un animal PI transmitía la infección. También se ha demostrado que la exploración rectal de animales sensibles con guantes contaminados con heces de animales PI transmite la infección (Lang-Ree *et al.*, 1994).

### ***Otros métodos de transmisión***

El VDVB puede aislarse de moscas hematófagas hasta 96 horas después de haberse alimentado en un animal PI y experimentalmente se ha conseguido transmitir la infección a animales sensibles con 50 moscas que primero se alimentaron durante 5 minutos en un animal PI y posteriormente 15 minutos en animales sensibles (Tarry *et al.*, 1991). No

obstante, el papel de las moscas y quizá otros insectos hematófagos en la transmisión natural no está claro.

La transmisión indirecta a través de distintos utensilios y ropas contaminados se considera posible. Así, por ejemplo, se ha demostrado que la reutilización de un narigón en los 3 minutos siguientes a haber sido usado en un animal PI transmitía la infección.

### **I.3.5. Repercusión económica de la infección**

Las pérdidas económicas ocasionadas por el virus a nivel de explotación dependen, lógicamente de la gran variabilidad existente en la morbi- y mortalidad de los diferentes brotes clínicos. Por el momento son pocos los trabajos que han estudiado detenidamente el impacto económico del VDVB a nivel de explotación. Así, por ejemplo, en un estudio realizado en 14 explotaciones lecheras holandesas se calculó que las pérdidas medias producidas por la infección eran de 77 dólares americanos por vaca con un rango entre las diferentes explotaciones que iba de 42 a 285 dólares americanos por animal (Wentink y Dijkhuizen, 1990). En otro estudio realizado en 8 explotaciones lecheras danesas con una media de 115 animales y en el que sólo se incluyeron las pérdidas debidas a la EM, estas pérdidas oscilaron en las diferentes explotaciones, en función de las medidas de control tomadas, entre 2380 a 2980 dólares por animal (Houe *et al.*, 1994).

En algunos países se han hecho estimaciones sobre el impacto económico del VBDV a nivel nacional. Así, por ejemplo, en el Reino Unido tres estudios diferentes han evaluado las pérdidas en 185, 47 y 32 millones de dólares americanos (Harkness, 1987a; Spedding *et al.*, 1987; Bennett, 1992). En Dinamarca se han calculado unas pérdidas de 20 millones de dólares americanos por cada millón de partos (Houe *et al.*, 1993). Aunque estas cifras son estimaciones aproximadas de las verdaderas pérdidas y no son extrapolables a otros países con diferente situación epidemiológica, si dan una idea de la importancia económica del VDVB en la producción bovina.

## **I.4. SÍNTOMAS CLINICOS Y LESIONES**

### **I.4.1 Cuadro clínico**

La infección del ganado vacuno con el VDVB puede ocasionar diferentes manifestaciones clínicas que oscilan desde una infección subclínica hasta el cuadro mortal denominado EM. Como se discutió en el apartado dedicado a la patogenia, la respuesta de los animales a la infección, y el que ésta dé o no lugar a un cuadro clínico, depende de múltiples factores interactivos. Al igual que en la patogenia, las manifestaciones clínicas y lesiones de la infección por el VDVB se exponen en tres grandes apartados: infección aguda, infección fetal y EM.

#### **I.4.1.1. Infección aguda**

Tradicionalmente se considera que la mayoría de las infecciones postnatales agudas en animales inmunocompetentes son subclínicas o cursan con un cuadro clínico leve. Así,

se ha estimado que entre el 70 y el 90 % de las infecciones con el VDVB no dan lugar a manifestaciones clínicas (Ames, 1986). Esta visión tradicional, sin embargo, está siendo cuestionada en los últimos años al haberse descrito, asociados con la infección aguda, por una parte, un síndrome hemorrágico y, por otra, una forma grave de la infección que recuerda, de alguna manera, la EM.

En los animales que sufren la infección subclínica, si se examinan detenidamente, puede detectarse con frecuencia un aumento moderado de la temperatura corporal y leucopenia desde alrededor del día 3 hasta el día 7 postinfección, pero a los 11-17 días se produce una recuperación total de la leucopenia. Además, en un estudio longitudinal realizado recientemente en una explotación lechera, la infección subclínica se ha asociado con una disminución de la producción de leche (Moerman *et al.*, 1994).

La infección aguda da lugar a una respuesta inmune, tanto humoral como celular, de larga duración, que en la práctica se considera de por vida. Las infecciones subclínicas son responsables en gran medida de las altas prevalencias de animales seropositivos frente al VDVB en las poblaciones bovinas (Baker, 1995).

#### ***1.4.1.1.1. Diarrea vírica bovina (DVB)***

Cuando, como consecuencia de la infección aguda, se producen manifestaciones clínicas (generalmente leves), el proceso suele denominarse Diarrea Vírica Bovina (DVB; BVD en sus iniciales inglesas). Esta denominación, sin embargo, responde a un criterio histórico de nomenclatura más que a un criterio descriptivo, puesto que, en la actualidad, si exceptuamos las formas graves de la infección tratadas más adelante, raramente se producen brotes agudos de diarrea asociados al VDVB (Brownlie, 1985).

El proceso afecta fundamentalmente a animales entre los 6 meses y los 2 años de edad. La morbilidad puede ser alta, pero la mortalidad es muy baja o nula. Tras 5 a 7 días de período de incubación, se produce fiebre transitoria y leucopenia (Duffell y Harkness, 1985). Los animales afectados pueden mostrar síntomas tales como depresión, anorexia, flujo oculonasal y/o diarrea. Ocasionalmente pueden apreciarse erosiones y ulceraciones en la cavidad bucal. En las vacas en lactación puede acompañarse de disminución de la producción láctea.

#### ***1.4.1.1.2. Infección venérea***

El VDVB se excreta en el semen tanto de los toros PI como de los que sufren la infección aguda. En los primeros la excreción es continua, mientras que en los segundos la eliminación es transitoria. Se han descrito resultados contradictorios sobre las consecuencias tanto de la infección persistente como de la aguda en la calidad espermática del semen. Así, mientras que en algunos trabajos se ha hallado una calidad aceptable, en otros estudios se ha encontrado una baja calidad del semen caracterizada por una disminución de la motilidad y un aumento de los espermatozoides anormales (Baker, 1995).

También se han encontrado resultados contradictorios en la tasa de concepción tanto en hembras cubiertas por monta natural o inseminadas artificialmente con semen de toros PI como en hembras natural o experimentalmente infectadas por diferentes vías (intranasal, oral, intrauterina) en el momento de la cubrición. No obstante, estudios recientes indican que la infección natural o experimental por vía intranasal alrededor de la cubrición puede dar lugar a una disminución significativa de la tasa de concepción (Baker, 1995). En definitiva, se considera que el VDVB puede producir una disminución transitoria de la tasa de concepción, con las consiguientes repeticiones de celo, que a nivel de explotación se manifiesta por un mayor número de servicios/inseminaciones por concepción. En algunas explotaciones se ha observado una disminución significativa de la tasa de concepción durante varias semanas e incluso meses después de la introducción del virus (Roeder *et al.*, 1986; Houe y Meyling, 1991a). Con frecuencia los trastornos de la reproducción son los primeros observados en una explotación y, si no están asociados con otras manifestaciones clínicas en los animales, será difícil relacionarlos con el VDVB. El VDVB también se ha asociado a ovaritis en novillas infértiles (Sentongo *et al.*, 1980).

#### ***1.4.1.1.3. Inmunosupresión***

Como se expuso ampliamente en el apartado de patogenia, la infección con el VDVB puede producir inmunosupresión tanto en los animales seronegativos inmunocompetentes como en los animales PI. La inmunosupresión aumenta la sensibilidad de los animales a otros patógenos y puede favorecer o potenciar el desarrollo de infecciones concomitantes, especialmente cuando los animales están sometidos a factores estresantes ambientales o de manejo. La inmunosupresión, por lo tanto, contribuye a la amplia gama de manifestaciones clínicas producidas por el VDVB. Se han descrito infecciones mixtas del VDVB, y agravamiento consiguiente del cuadro clínico, con al menos los siguientes patógenos: el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (VRIB), el virus parainfluenza tipo 3 (VPI-3), rotavirus, coronavirus, *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp., *Actinomyces pyogenes*, coccidios y helmintos (Baker, 1990). Desde el punto de vista clínico merece especial atención la participación del VDVB en el síndrome respiratorio bovino (SRB).

#### ***1.4.1.1.4. El VDVB y el Síndrome Respiratorio Bovino (SRB)***

La posible participación del VDVB en el SRB ha sido una cuestión controvertida durante años, si bien, hoy en día, la mayoría de los autores consideran que el VDVB puede contribuir al SRB a través de su efecto inmunosupresor. En diferentes estudios de brotes del SRB se ha aislado el VDVB generalmente asociado con otros patógenos. Así, por ejemplo, en un estudio el VDVB fue el virus aislado con más frecuencia de pulmones neumónicos procedentes de animales de cebadero afectados por el SRB (Reggiardo, 1979) y en otro estudio se comprobó que era el virus encontrado con mayor frecuencia en asociación con múltiples infecciones víricas en terneros afectados por el SRB (Richer *et al.*, 1988).

La mayoría de las investigaciones sobre el sinergismo virus-bacteria en el SRB se han realizado con el VRIB y con el VPI-3, habiéndose prestado mucha menor atención al VDVB. No obstante, los estudios experimentales llevados a cabo con el VDVB, aunque

han dado resultados variables, cosa que, por otra parte, también ocurre con los otros dos virus, han demostrado que puede producir infecciones en el tracto respiratorio y, por lo tanto, apoyan la idea de que el virus puede jugar un papel en el SRB (ver apartado de patogenia). En un estudio experimental se demostró una asociación sinérgica entre el VDVB y *Pasteurella haemolytica* (Potgieter *et al.*, 1984a) y en otro trabajo se comprobó que la infección inicial de terneros con el VDVB dañaba su capacidad para eliminar una infección posterior con el VRIB (Potgieter *et al.*, 1984b).

#### ***1.4.1.1.5. Síndrome hemorrágico***

Rebhun *et al.* (1989) describieron en Estados Unidos un nuevo síndrome asociado con el VDVB caracterizado por trombocitopenia grave y hemorragias. El cuadro ha sido reproducido experimentalmente en terneros por inoculación intravenosa con sangre procedente de animales afectados (Corapi *et al.*, 1989; Corapi *et al.*, 1990) y por inoculación intranasal con el virus propagado en cultivo celular (Bolin *et al.*, 1992). En 1992 se describió un cuadro clínico similar en Bélgica (Broes *et al.*, 1992).

El proceso en animales adultos se caracteriza por una acusada trombocitopenia que da lugar a diarrea sanguinolenta, epistaxis y hemorragias petequiales y equimosis en mucosas, y se acompaña de fiebre y leucopenia. También se han observado hemorragias en la cámara anterior del ojo (hipema). Asimismo, los animales afectados que se inyectan, sangran por los puntos de inyección.

Los virus aislados hasta el momento de este síndrome pertenecen al genotipo II (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994).

#### ***1.4.1.1.6. Forma aguda grave***

En 1993 Hibberd y Turkington describieron un brote agudo grave asociado al biotipo NCP del VDVB en una explotación lechera de 160 vacas en Inglaterra. El brote afectó a 32 animales y se caracterizó por anorexia, pérdida de la producción de leche y diarrea acuosa profusa. A pesar del comienzo agudo del proceso, sólo 5 de los 22 animales examinados tenían fiebre (39,7 a 41°C) y únicamente 6 presentaban pequeñas erosiones puntiformes en la cara inferior de la lengua y en la faringe. Además, bastantes animales presentaron cojera pronunciada de una o más extremidades. La mortalidad fue elevada: 12 animales murieron (6 de ellos dentro de las 48 horas del comienzo de la sintomatología) y otros 5 tuvieron que sacrificarse por razones humanitarias. Además, 6 de los 15 supervivientes, que quedaron extremadamente delgados y dejaron de producir leche, se eliminaron por razones productivas. El tratamiento de los animales afectados con fluidoterapia intravenosa, antibióticos y astringentes orales no fue efectivo. En la necropsia de los casos típicos se encontraron erosiones puntiformes ampliamente difundidas en la cavidad bucal y en el tracto gastrointestinal alto.

Paralelamente se describieron otros tres brotes agudos producidos por cepas NCP del VDVB en otras tantas explotaciones lecheras inglesas distantes geográficamente (David *et al.*, 1994). Los animales afectados presentaban diarrea acuosa aguda, agalaxia y pirexia (39,4 a 42°C). En casos aislados se apreciaron, además, ulceraciones en la mucosa

bucal, descarga nasal mucosa y rigidez muscular. En el brote más grave la morbilidad alcanzó el 40% y la mortalidad el 10%. En ninguna de las explotaciones, sin embargo, se observó un aumento de la incidencia de abortos.

Por otra parte, en Canadá y Estados Unidos también se han descrito en los últimos años brotes agudos de enfermedad asociados con el VDVB (Baker, 1995) con unas características clínicas parecidas entre sí. Así, por ejemplo, en Ontario en 1993 se describieron un gran número de brotes en explotaciones caracterizados por pirexia, neumonía y diarrea en animales de todas las edades. Además, también se produjeron abortos y en los animales viejos se encontraron con frecuencia úlceras en la boca. La gravedad de los brotes en las diferentes explotaciones varió: en algunas sólo unos pocos animales se vieron afectados, mientras que en otras la mortalidad alcanzó entre un 10 y un 20%. Los aislados de estos brotes tipificados hasta la fecha pertenecen al genotipo II del VDVB

### **I.4.1.2. Infección fetal**

La infección de una hembra gestante inmunocompetente y seronegativa con el VDVB, además de las consecuencias sobre la propia hembra, que no difieren de las expuestas en la infección aguda, da lugar con mucha frecuencia a una infección transplacentaria del feto. Hay que destacar que la ausencia de sintomatología clínica en la madre (infección subclínica) no implica protección fetal ni excluye la posibilidad de la infección transplacentaria.

Recordemos que las consecuencias de la infección fetal dependen fundamentalmente del momento de la gestación en que se produce la infección. La infección fetal puede dar lugar a reabsorción fetal, aborto, momificación fetal, malformaciones congénitas y nacimiento de terneros muertos, débiles, de menor tamaño del normal, persistentemente infectados y normales con anticuerpos precalostrales.

La infección transplacentaria del feto durante el primer trimestre de la gestación puede ocasionar la muerte embrionaria/fetal seguida de reabsorción, momificación o aborto. La expulsión del feto puede tener lugar desde unos días a varios meses después de la infección. La incidencia general de abortos producida por el VDVB se ha estimado entre un 2 y un 7%, pero cuando se producen brotes en explotaciones no inmunes el porcentaje de abortos puede ser mucho mayor (Baker, 1990). Murray (1990) en un estudio de campo sobre abortos en ganado bovino realizado en el Reino Unido encontró que el VDVB era el patógeno identificado con mayor frecuencia.

La infección transplacentaria del feto entre aproximadamente los días 100 a 150 de gestación puede dar lugar a numerosas alteraciones congénitas, entre las que cabe destacar por su frecuencia las que afectan al sistema nervioso central. Los terneros que sufren hipoplasia cerebelar se muestran reacios a ponerse en pie y sólo lo consiguen con dificultad. Estos animales abren las extremidades para aumentar la base de apoyo y pueden presentar ataxia y temblores. La hipomielogénesis se asocia generalmente con temblores.

Las alteraciones teratológicas del ojo pueden dar lugar a diferentes grados de ceguera. La presencia de cataratas se detecta fácilmente en el examen oftálmico, en el que también puede descubrirse opacidad de la córnea debida a queratitis intersticial.

La infección transplacentaria del feto en cualquier momento de la gestación puede producir un retraso en el crecimiento fetal que dará lugar al nacimiento de terneros de menor tamaño del normal, débiles y que pueden morir poco tiempo después de nacer.

La infección fetal antes de la completa maduración del sistema inmune del feto puede dar lugar al desarrollo de inmunotolerancia. En estos casos, si la gestación llega a término, el ternero nacerá persistentemente infectado y permanecerá como tal durante toda su vida. Algunos terneros PI muestran un retraso en el crecimiento al nacer o poco tiempo después y posteriormente tienen una tasa de crecimiento menor que los animales de su edad (Potgieter, 1995). De hecho, la presencia en las explotaciones de animales con un evidente retraso en el crecimiento es un indicio de la posible presencia de animales PI. La mortalidad de los terneros PI es bastante mayor que la de los no infectados. Se ha estimado que el 50% de los terneros que nacen PI pueden morir durante el primer año de vida (Duffell y Harkness, 1985). Los animales PI parecen ser más sensibles a otras infecciones, particularmente las asociadas con neumonías y enteritis, y esto se ha relacionado con la inmunosupresión inducida por la infección persistente con el VDVB.

A pesar de lo expuesto anteriormente, bastantes animales PI no muestran sintomatología clínica alguna y pueden alcanzar la madurez y reproducirse.

La infección con el VDVB en el último trimestre de la gestación raramente tiene consecuencias para el feto. Los terneros son normales al nacer y tienen anticuerpos neutralizantes frente al virus.

### **I.4.1.3. Enfermedad de las mucosas (EM)**

Clínicamente suelen diferenciarse dos formas de la EM: una forma aguda, que tiene un curso rápido y es mortal prácticamente en el 100% de los casos, y una forma crónica, que también se asocia con una alta mortalidad y que se caracteriza por un curso más prolongado. La presentación en los animales PI de una u otra forma parece estar relacionada con el grado de homología entre la cepa de virus NCP y la CP implicadas (ver apartado de patogenia).

#### ***I.4.1.3.1. Enfermedad de las mucosas aguda***

La forma aguda de la EM se considera una forma esporádica de la infección con el VDVB. El proceso afecta fundamentalmente a animales entre los 6 meses y los 2 años de edad. La EM aguda se caracteriza por pirexia (40,5 a 41°C), depresión, debilidad y anorexia. También se observa taquicardia y polipnea. A medida que la enfermedad progresa se produce emaciación y deshidratación con acidosis. En las vacas en lactación la producción de leche disminuye (Baker, 1990; Baker, 1995).

En una inspección detallada de la cavidad oral pueden observarse lesiones erosivas en los labios, las comisuras de la boca, las encías, la lengua y la parte posterior del paladar duro. Estas lesiones pueden fusionarse formando áreas mayores de necrosis de la mucosa que pueden acabar desprendiéndose. También pueden presentarse lesiones erosivas en la parte externa de los ollares y en la cavidad nasal y, en algunos casos, se han descritos lesiones similares en la vulva y los pezones (Baker, 1990). En algunos casos se han descrito cojeras: los animales son reacios a moverse e incluso permanecen echados, lo que se ha atribuido a la presencia de lesiones erosivas y necrosis en la piel interdigital de las pezuñas. Las lesiones orales suelen encontrarse en un 75 a un 80% de los animales afectados y generalmente se acompañan de pialismo. Con frecuencia se observa también flujo nasal mucopurulento y mas ocasionalmente lagrimeo y edema de córnea (Baker, 1990; Baker, 1995).

A los dos o tres días de iniciarse la sintomatología los animales presentan una diarrea acuosa profusa, pero en los casos sobreagudos los animales pueden morir antes del comienzo de la diarrea. Las heces tienen un olor nauseabundo y pueden contener cantidades variables de sangre fresca o coagulada y restos fibrinosos de mucosa intestinal desprendida. En el momento de la defecación puede observarse esfuerzo (Baker, 1990; Baker, 1995).

En la fase inicial de la enfermedad se produce una intensa leucopenia. Pueden presentarse neutropenia sin desvío a la izquierda, linfopenia y trombocitopenia. Son frecuentes las infecciones bacterianas secundarias.

El curso de la enfermedad, que termina con la muerte del animal, puede oscilar entre 2-3 días a 2-3 semanas. La muerte, por lo tanto, puede ocurrir poco después de manifestarse los primeros síntomas, pero generalmente se produce entre los 3 y los 10 días del comienzo de la sintomatología.

### ***1.4.1.3.2. Enfermedad de las mucosas crónica***

Cierto porcentaje de los animales que sufren la EM no mueren en el período de tiempo esperado y se convierten en afectados crónicos. La EM crónica se caracteriza por inapetencia, pérdida progresiva de peso hasta emaciación y mal aspecto general de los animales. La diarrea puede ser continua o intermitente y puede apreciarse timpanismo crónico. Con frecuencia se observa flujo nasal y lagrimeo continuo (Baker, 1990; Baker, 1995).

Pueden presentarse áreas de alopecia e hiperqueratinización, generalmente en el cuello. Frecuentemente se encuentran lesiones erosivas crónicas en la boca y la piel de distintas partes del cuerpo. Las zonas cutáneas afectadas con mayor frecuencia son la perineal, la prepucial, la vulvar, la zonas de unión de los cuernos y las pezuñas, la hendidura interdigital y la parte posterior de la pezuña. Una característica de estas lesiones cutáneas es que no curan. Pueden presentarse cojeras crónicas debido a laminitis, a necrosis interdigital y a deformaciones de las pezuñas (Baker, 1990; Baker, 1995). Son frecuentes las infecciones bacterianas secundarias. El recuento de células sanguíneas pone de manifiesto pancitopenia caracterizada por anemia, leucopenia, neutropenia y linfopenia.

Los animales afectados por la EM crónica pueden sobrevivir hasta 18 meses pero finalmente mueren como consecuencia de la extrema debilidad. Los animales que sufren la EM crónica deben distinguirse de aquellos animales PI que tienen una tasa de crecimiento reducida desde el nacimiento y mal aspecto general.

Edwards *et al.*, (1991) han descrito varios casos de terneros PI que sufrieron síntomas transitorios de EM y que posteriormente se recuperaron y permanecieron sanos hasta que fueron sacrificados en matadero. Parece, pues, que en algunos casos es posible la recuperación de los animales que sufren la EM. Este aspecto, sin embargo, necesita investigarse más.

#### **I.4.2. Lesiones**

Las infecciones con el VDVB pueden dar lugar a una amplia gama en tipos y grados de lesiones. Las lesiones encontradas en los animales afectados, al igual que las manifestaciones clínicas, dependen de la interacción de múltiples factores.

##### **I.4.2.1. Infección aguda**

En la Diarrea Vírica Bovina, las lesiones generalmente son leves: el intestino está flácido y edematoso y hay una ligera reacción de los ganglios linfáticos mesentéricos. También se han descrito lesiones en el esófago y en la cavidad oral caracterizadas por pequeñas erosiones y úlceras superficiales. Ocasionalmente las lesiones encontradas recuerdan a las de la EM (ver más adelante) y consisten en erosiones y hemorragias longitudinales, atrofia y hemorragia de las placas de Peyer y erosiones en el colon proximal (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

##### **I.4.2.2. Infección fetal**

Las lesiones más características producidas como consecuencia de la infección transplacentaria son las alteraciones teratológicas. Las lesiones del SNC y las del ojo han recibido una atención especial tanto en estudios de campo como experimentales. La hipoplasia cerebelar es una de las alteraciones más frecuentes y puede estar constituida por alteraciones ligeras (tales como reducción del número de células de las capas molecular y granular), por una reducción y cambio de ubicación de las células de Purkinje, por una pérdida franca de la estructura general o por una pérdida total de las células de Purkinje. En estos últimos casos puede detectarse una inflamación leucocitaria como consecuencia de un proceso inflamatorio. En otras ocasiones, la desmielinización es el hallazgo más destacado (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

La corioretinopatía frecuentemente consiste en una despigmentación variable y en pérdida de neuronas así como de las células de conos y bastones. Los cristalinos pueden estar afectados por catarata capsular y alteraciones degenerativas en las fibras del cristalino. Puede haber signos de inflamación de la córnea y gliosis en el nervio óptico (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

#### ***1.4.2.2.1. Animales PI***

En estudios realizados en animales PI clínicamente sanos se han detectado lesiones histopatológicas en algunos de ellos pero no en todos. Las lesiones encontradas incluyen infiltraciones intersticiales locales de células mononucleares (CMN) en el riñón y engrosamiento focal de la membrana basal glomerular, ligera acumulación de CMN en los espacios portahepáticos, mayor frecuencia de acúmulos linfoides peribronquiolares y necrosis microfocales en el epitelio de la lengua y el esófago acompañadas de una acumulación moderada subepitelial de CMN. Curiosamente, en los mismos estudios se encontró que los tejidos linfoides de los animales PI eran indistinguibles de los de animales normales de edad y condiciones ambientales comparables (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

En los animales PI con un evidente retraso en el crecimiento pueden encontrarse lesiones cutáneas tanto macroscópicas como microscópicas. Macroscópicamente las lesiones pueden recordar las encontradas en la forma crónica de la EM (ver más adelante). Microscópicamente, las alteraciones pueden oscilar desde una infiltración ligera subepitelial de CMN (principalmente macrófagos) a lesiones más marcadas de carácter paraqueratósico o hiperqueratósico. Alteraciones similares pueden encontrarse en el epitelio queratinizado del esófago, rumen, retículo y omaso (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

#### **1.4.2.3. Enfermedad de las mucosas**

En los animales que muestran la EM típicamente se encuentran lesiones macroscópicas erosivas/ulcerativas a lo largo del tracto digestivo, especialmente en el esófago, los pilares del rumen, el omaso, el abomaso y el intestino.

Pueden observarse lesiones erosivas en el hocico, los labios, la mucosa bucal, las encías, la lengua (especialmente en sus partes latero-posteriores) y la parte posterior del paladar duro. También pueden encontrarse pequeñas erosiones en los orificios nasales y en la cavidad nasal.

En el esófago, las lesiones erosivo-ulcerativas suelen ser muy abundantes y, por lo general, tienen un aspecto alargado (1-2 cm de largo por 0,5-2 mm de ancho) siguiendo la dirección de los pliegues de la mucosa del esófago. También son muy frecuentes las erosiones en los pilares del rumen, en el retículo y en las láminas del omaso. No obstante, en los casos crónicos de EM (o de curso prolongado) pueden no apreciarse lesiones macroscópicas en el tracto digestivo anterior o ser muy ligeras (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

En el abomaso se observan lesiones erosivo edematosas y hemorrágicas, especialmente en la zona pilórica. La enteritis catarral puede progresar a hemorrágica, fibrinonecrótica y ulcerativa. El contenido intestinal suele ser oscuro, acuoso y maloliente. Las placas de Peyer, así como el tejido linfóide en el colon proximal, pueden aparecer hemorrágicas y necróticas. La mucosa del intestino grueso puede estar edematosa, frecuentemente formando un dibujo lineal que sigue los pliegues de la mucosa (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

El timo está generalmente atrófico y, en muchos casos, se observa únicamente un tejido fibroepitelial parcialmente infiltrado de grasa. Los ganglios linfáticos pueden estar aumentados de tamaño, edematosos o hipoplásicos dependiendo del grado de inflamación de las zonas drenadas, de la duración del cuadro clínico y/o de las interacciones virus-célula hospedadora en el órgano (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

La mayoría de los animales presentan lesiones cutáneas aparentes, aunque con una *variación individual considerable tanto en grado como en extensión*. Las lesiones son más frecuentes y más marcadas en el cuello, la espalda y la región perineal. Las alteraciones, con aspecto de eczema, son el resultado de dermatosis e hiperqueratosis y paraqueratosis acompañadas de hipotricosis o alopecia. También pueden encontrarse lesiones erosivas en el área perineal, alrededor de la abertura del prepucio y en la vulva. Asimismo, se encuentran con frecuencia lesiones erosivas con o sin liquenificación y exudación en la hendidura interdigital y la zona de unión de la piel y las pezuñas. Puede observarse supuración debido a infecciones bacterianas secundarias, aunque es menos frecuente de lo que *cabría esperar*. *Generalmente las lesiones cutáneas son más marcadas en los casos crónicos de EM (de curso prolongado)* (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

La conjuntivitis es un hallazgo casi constante. También pueden presentarse bronconeumonía y pleuritis fibrinosa atribuibles a infecciones bacterianas secundarias causadas frecuentemente por *Actinomyces bovis* o *Pasteurella* spp.

A pesar de la variación en el aspecto de las lesiones macroscópicas, el tipo de cuadro histopatológico en cualquiera de los órganos es uniforme con variaciones en la intensidad y progresión de las lesiones.

La alteración inicial en los epitelios queratinizados (piel, boca y tracto digestivo alto incluyendo el rumen, el retículo y el omaso) *consiste en una infiltración focal de CMN en los estratos papilar y reticular de la lámina propia/dermis con tendencia a una localización periarteriolar y pericapilar pero sin que lleguen a desarrollarse manguitos claros*. Se produce un engrosamiento de la lámina propia por ensanchamiento y alargamiento de la papila dérmica, frecuentemente a costa de los pliegues del epitelio basal, que puede aparecer como lamelas. Este tejido puede estar hiperémico con diapedesis hemorrágica. En el epitelio la alteración inicial parece consistir en degeneración y necrosis eosinofílica de células dispersas en el estrato espinoso, que progresa a necrosis celular amplia con ruptura de las uniones intercelulares. Al mismo tiempo se produce infiltración del epitelio con CMN, con frecuencia sin relación aparente con las células epiteliales necróticas, pero que puede estar dirigida hacia células inaparentemente modificadas por la infección con el virus (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

A medida que el proceso progresa se producen focos bien delimitados con una apariencia reticulada en el estrato espinoso. Estos focos pueden permanecer cubiertos por un estrato córneo intacto. Sin embargo, eventualmente esta capa también pierde la integridad y se erosiona. La capa basal generalmente permanece intacta mientras progresan los procesos mencionados, pero eventualmente pueden producirse alteraciones necrobióticas y metaplásicas. Las células basales pueden transformarse en escamosas, pero

a menos que se produzca ulceración o infecciones bacterianas secundarias, la capa permanece sin romperse.

En otras áreas, especialmente en zonas de la piel del cuello y la espalda, los procesos de hiperqueratosis y paraqueratosis pueden predominar en las alteraciones epiteliales, con formación de masas queratinoides gruesas (con frecuencia 50 a 100 capas de células) mezcladas con cantidades variables de restos celulares necróticos, queratina e infiltración de CMN.

Los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas parecen implicarse en los procesos cutáneos relativamente tarde, con una infiltración inicial periglandular y perifolicular de CMN y cambios posteriores degenerativos y necróticos de los folículos semejantes a los descritos antes. Presumiblemente en esta etapa es cuando se desarrolla la hipotricosis y la alopecia (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

En el intestino y en el abomaso las alteraciones patológicas se localizan selectivamente en el fondo de las criptas. Las primeras alteraciones se producen en células aisladas o en grupos pequeños de células adyacentes y consisten en condensación citoplasmática seguida de vacuolización, redondeamiento y descamación. Estudios inmunohistoquímicos han puesto de manifiesto que estas reacciones celulares se producen en células con una gran replicación vírica, presumiblemente de virus CP (Liebler *et al.*, 1991; Bielefeldt-Ohmann, 1995). Los restos celulares y el mucus se acumulan en la luz de las criptas, que puede ocluirse y dilatarse con aplanamiento del epitelio y desaparición de las microvellosidades. Estas alteraciones, especialmente sobre las placas de Peyer, progresan a un estado de atrofia completa de las criptas y las vellosidades, permaneciendo un epitelio plano cubriendo una lámina propia de tejido fibroso casi acelular. Aunque tales áreas parecen especialmente propensas a sufrir ulceración, hay que destacar que la necrosis descrita macroscópicamente se corresponde en muchos, sino en la mayoría, de los casos con áreas con atrofia/metaplasia epitelial completas.

En algunos casos o en algunas partes del intestino puede predominar en las alteraciones de las criptas una metaplasia de células mucosas y se acompaña de una excesiva producción y acumulación de mucus. La reacción de la lámina propia generalmente se caracteriza por una masiva infiltración de CMN, especialmente macrófagos. Otras alteraciones pueden incluir edemas de las capas subepiteliales, hiperemia y diapedesis.

En los casos naturales agudos de EM de corta duración (1-4 días) se ha encontrado que la estructura general del timo se mantiene, pero se produce una reducción neta que afecta principalmente al córtex, en el que puede apreciarse apoptosis y desintegración de timocitos, células epiteliales prominentes y grandes macrófagos con fagocitosis activa. Las alteraciones medulares se caracterizan por una deplección variable de timocitos, pero raramente se observan signos de muerte celular franca. En los casos subagudos a crónicos de la EM, el timo muestra una pérdida progresiva de la organización zonal. El córtex puede permanecer como una fina capa de epitelio "colapsado" rodeado de un tejido fibroreticular con corpúsculos de Hassall prominentes y células mioides. También pueden persistir

algunos (pocos) linfocitos en islotes dispersos y, asimismo, puede hacerse evidente una infiltración grasa, especialmente en los animales más viejos (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

Las placas de Peyer parecen sufrir ya durante las fases clínicas sobreagudas a agudas una intensa deplección de células linfoides, que afecta especialmente a las zonas foliculares así como a las interfoliculares y subepiteliales. Las alteraciones foliculares incluyen una hipertrofia aparente seguida de degeneración de las células dendríticas foliculares (CDF) y sustitución con un material fibroide homogéneo. La estructura de las placas de Peyer puede además aparecer distorsionada por la prolongación de las criptas y la dilatación de las criptas seguida de degeneración. En casos más prolongados (crónicos) de EM las placas de Peyer están atróficas. Con frecuencia, únicamente permanece un tejido fibrótico condensado/retráctil (hialinizado) con pequeños islotes linfoides que están rodeadas por capas concéntricas de tejido fibroso. Las zonas interfoliculares constan de una zona estrecha, por debajo de la capa muscular, con pocos linfocitos, monocitos y macrófagos entre fibroblastos y colágeno. Las vénulas postcapilares con endotelio alto no son distinguibles (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

Las alteraciones más llamativas en los ganglios linfáticos parietales y mesentéricos son deplección de linfocitos de la zona subyacente al seno subcapsular y cambios regresivos en los folículos primarios y secundarios, el número de los cuales es comparable al encontrado en los animales no infectados y en los PI clínicamente sanos. En los folículos secundarios el centro germinal puede estar reemplazado por un estroma citoplásmico homogéneo (sin estructura), ligeramente eosinófilo consistente en células dendríticas grandes, que por microscopía electrónica se identifican como CDF. También puede presentarse una fibrosis clara algunas veces con un origen pericapilar. Esta zona puede estar rodeada por macrófagos aislados con grandes fagolisosomas, incrustados en una corona de linfocitos irregular y mal definida. La fibrosis central puede progresar a un estado en el que las CDF desaparecen y el centro germinal está completamente reemplazado por una masa fibroide hialina condensada acelular que está rodeada por pocos islotes dispersos de linfocitos (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

El paracórtex puede presentar diferentes grados de deplección de linfocitos. Directamente relacionado con este hecho hay un aplanamiento de las células endoteliales de las vénulas postcapilares con endotelio alto y una disminución de la migración transendotelial de linfocitos. La médula puede estar relativamente o netamente expandida. Esto es parcialmente consecuencia de una reacción notable de los senos caracterizada por una acumulación de linfocitos y monocitos típicos así como de grandes macrófagos activados. Esto es especialmente evidente en los casos de EM más prolongados y en los ganglios linfáticos parietales, en los que estas células pueden llegar a tener características de células epitelioides (Bielefeldt-Ohmann, 1995).

Las alteraciones en el tejido linfoide de las amígdalas recuerdan a las descritas para las placas de Peyer y los ganglios linfáticos, con una evolución similar a la apuntada para las placas de Peyer. En el bazo son hallazgos característicos una deplección de linfocitos de los manguitos linfoides periarteriolares y alteraciones en los folículos, similares aunque menos acusadas, a las encontradas en los ganglios linfáticos.

## **I.5. DIAGNOSTICO**

En los apartados anteriores se ha expuesto la complejidad de la patogenia de la infección por el VDVB y la gran variabilidad que puede haber en sus manifestaciones clínicas en las explotaciones. Es preciso, por lo tanto, conocer bien estas cuestiones a la hora de enfrentarse al diagnóstico. Ello permitirá tomar las muestras adecuadas en cada caso para su análisis laboratorial e interpretar correctamente los resultados de laboratorio. Dadas las repercusiones de la infección es importante realizar el diagnóstico exacto lo más pronto posible con el fin de tomar las decisiones de manejo y preventivas pertinentes en cada caso para evitar o reducir las pérdidas ocasionadas por el virus.

### **I.5.1. Diagnóstico clínico-epidemiológico**

El papel del veterinario clínico en el diagnóstico es fundamental, pues en muchos casos de su perspicacia depende que se llegue más o menos precozmente a sospechar que existe un posible problema en una explotación relacionado con el VDVB. No obstante, dadas las características de la infección, con frecuencia incluso los clínicos más experimentados tienen dificultades para identificar el problema basándose en la presentación clínico-patológica. Puede afirmarse que de las diversas manifestaciones clínicas producidas por el VDVB el veterinario clínico prácticamente sólo puede diagnosticar con certeza los casos de EM que presentan la sintomatología y las lesiones típicas. E incluso en estos casos hoy en día habría que tener en cuenta para el diagnóstico diferencial las formas agudas graves asociadas con el genotipo II. En todos los demás casos el diagnóstico es presuntivo y necesita confirmarse en el laboratorio.

Los datos epidemiológicos y clínico-patológicos en los que puede apoyarse el clínico para sospechar que en una explotación existe un posible problema relacionado con el VDVB han sido expuestos ampliamente en los apartados correspondientes. Aquí nos limitaremos a insistir en algunos hechos relevantes.

Recordemos que la mayoría de las infecciones agudas son subclínicas o dan lugar a un cuadro clínico leve y/o poco preciso. De ahí que el diagnóstico presuntivo, sobre todo en las primeras etapas de la infección de una explotación, no sea sencillo y deba basarse en la interpretación de una serie de síntomas poco específicos, en la consideración del historial clínico de la explotación y/o en el análisis de los registros sobre reproducción.

Con frecuencia la primera manifestación de la infección en una explotación es una disminución de la tasa de concepción, con las consiguientes repeticiones de celo, lo que se traduce en un aumento del número de servicios/inseminaciones por concepción. Si esto ocurre en ausencia de otras manifestaciones en los animales no será fácil relacionarlo con el VDVB.

En otros casos los primeros indicios pueden ser la presentación de abortos y/o el nacimiento de terneros muertos, débiles o de menor tamaño del normal. Sería recomendable que en las explotaciones se intentase sistemáticamente diagnosticar todos los abortos o como mínimo hacerlo siempre que se produzca más de un caso en un corto período de tiempo. Si nacen terneros con alteraciones teratológicas, el VDVB debe estar

siempre en la primera línea de sospecha. Es posible, incluso, que en algunas explotaciones no llegue a sospecharse la infección con el VDVB hasta que aparece el primer caso de EM.

Finalmente, es posible que en algunos casos la primera evidencia de la infección proceda del laboratorio de diagnóstico que aísla el virus o detecta antígenos específicos del mismo en muestras de tejidos, como por ejemplo pulmón o intestino, recogidas durante la necropsia rutinaria de animales que mueren debido a procesos respiratorios o entéricos y cuya etiología se desea investigar. En algunos de estos casos puede ser difícil establecer si el VDVB debe considerarse o no el patógeno primario. En cualquier caso, la identificación de la infección con el VDVB debe considerarse siempre significativa desde el punto de vista del estado sanitario general de la explotación (Brock, 1995).

De lo expuesto hasta ahora se deduce que en la mayoría de los casos se precisa recurrir al laboratorio para confirmar el diagnóstico. Para realizar un diagnóstico lo más exacto y rápido posible y a unos costes razonables es fundamental una estrecha colaboración entre el clínico y el laboratorio. Ello permitirá al clínico remitir las muestras idóneas en cada caso y al laboratorio seleccionar el/los método/s de diagnóstico apropiados a cada situación y hacer una correcta interpretación de los resultados.

## **I.5.2. Diagnóstico laboratorial**

Como en cualquier otra virosis los métodos de diagnóstico específicos para el VDVB pueden dividirse en dos grandes grupos: (a) detección del virus o de algunos de sus componentes (métodos directos) y (b) detección de la respuesta inmune del hospedador a la infección (métodos indirectos).

### **I.5.2.1. Métodos directos**

#### ***I.5.2.1.1. Aislamiento del virus***

El aislamiento del virus es el método más fiable y el más utilizado tradicionalmente para el diagnóstico de las infecciones por el VDVB (Dubovi, 1990; Edwards, 1990; Howard *et al.*, 1990; Kelling *et al.*, 1990). A pesar de que, como se expone más adelante, se han desarrollado nuevos métodos de detección del virus, el aislamiento sigue siendo la técnica de referencia con la que se compara la sensibilidad de otras técnicas.

El virus generalmente se aísla con facilidad *in vitro*. Para el aislamiento suelen emplearse las líneas celulares BT (cornetes nasales bovinos) y MDBK (riñón bovino). Los aislados CP producen alteraciones características en los cultivos celulares detectables dentro de las 48 horas postinoculación. El efecto citopático consiste en la formación de áreas en las que las células presentan un citoplasma vacuolizado y granuloso y un núcleo intensamente picnótico. Sin embargo, la mayoría de los aislados de campo del VDVB son NCP. Los aislados NCP, al no inducir alteraciones visibles en los cultivos celulares, se reconocen detectando antígenos víricos mediante tinciones de inmunofluorescencia o inmunoenzimáticas (Ward y Kaeberle, 1984; Dubovi, 1990). El aislamiento de las cepas NCP en cultivos celulares requiere de 3 a 5 días.

El aislamiento del virus requiere un control riguroso tanto del suero fetal bovino utilizado para suplementar los medios de cultivo celulares como de los propios cultivos celulares ya que pueden estar contaminados por el VDVB. En el caso del suero fetal bovino, además de la posible contaminación por el virus, algunos lotes pueden contener factores de inhibición (anticuerpos o interferon específicos frente a este virus) que pueden reducir el título del virus de las muestras inoculadas de 10 a 100 veces y, por lo tanto, reducir considerablemente la sensibilidad de la técnica (Edwards, 1990). El suero puede irradiarse o tratarse con agentes químicos antes de su uso para inactivar los posibles virus contaminantes (Dubovi, 1990).

El aislamiento del virus puede realizarse a partir de diversas muestras: suero, plasma, coágulos de sangre, sangre completa, hisopos nasales, semen y varios tipos de muestras de tejidos (Brock, 1995). La mejor muestra para el aislamiento del virus son las células mononucleares obtenidas de sangre completa e incluidas en una solución tampón. En el caso de animales muertos y de fetos abortados las mejores muestras para el aislamiento del virus son las procedentes de órganos linfoides, tales como el bazo, las placas de Peyer del intestino delgado, los ganglios linfáticos y el timo.

En la actualidad cuando se analizan un elevado número de muestras el aislamiento se realiza en placas microtiter y el antígeno vírico se detecta usando un conjugado marcado con peroxidasa en lugar de la inmunofluorescencia empleada rutinariamente con anterioridad (Ward y Kaeberle, 1984; Afsar *et al.*, 1991). Esta técnica fue descrita por Meyling en 1984 y ha adquirido una amplia aceptación.

La técnica de inmunoperoxidasa en placa presenta ventajas con respecto a la inmunofluorescencia tales como la capacidad de procesar un elevado número de muestras simultáneamente y la no necesidad de contar con un microscopio de fluorescencia ni con un experto para interpretar los resultados. Un posible problema de esta técnica es que cuando se utilizan muestras de suero para el aislamiento algunos de los sueros pueden estar contaminados o contener sustancias tóxicas, lo que provoca la destrucción del sustrato celular (Nettleton y Entrican, 1993). Además, Nettleton y Entrican (1993) en un estudio comparativo llegaron a la conclusión de que la sensibilidad de la técnica de inmunoperoxidasa era baja y, por lo tanto, algunos animales virémicos no se detectan. Las muestras más adecuadas para el ensayo de la inmunoperoxidasa en placa son el suero, las células mononucleares y los homogeneizados de tejidos. El ensayo de inmunoperoxidasa en placa requiere aproximadamente de 5 a 7 días, tiempo suficiente para realizar dos pases completos de las muestras. Para la detección de antígenos del VDVB se usan anticuerpos tanto poli como monoclonales. Deregt *et al.* (1992) encontraron que una combinación de diferentes anticuerpos monoclonales frente a epítomos de las proteínas gp53/E2 y p80/NS3-p125/NS23 presentaba la más amplia capacidad de detección de distintos aislados de VDVB. Para detectar el VDVB en los ensayos inmunoenzimáticos, y dada la diversidad antigénica de los aislados del VDVB, es recomendable emplear una combinación de anticuerpos monoclonales con una amplia reactividad cruzada.

### 1.5.2.1.2. Detección de antígenos víricos

Puede realizarse una rápida identificación de antígenos del VDVB en muestras de tejidos por métodos inmunohistoquímicos tales como inmunofluorescencia o tinción inmunoenzimática utilizando cortes de tejidos congelados (Dubovi, 1990). La detección de antígenos es una técnica rápida pero menos sensible que el aislamiento del virus en cultivos celulares (Snyder *et al.*, 1979) y es más útil en el caso de animales persistentemente infectados que en el caso de animales con infecciones agudas. La técnica de inmunofluorescencia tiene el inconveniente de que no permite procesar un elevado número de muestras.

Recientemente se ha demostrado que un anticuerpo monoclonal frente a la proteína gp48/E0 (C15C) reacciona ampliamente con la mayoría de las cepas del VDVB y puede utilizarse para detectar el virus en preparaciones histológicas convencionales fijadas en formol e incluidas en parafina (Haines *et al.*, 1992). El epítipo reconocido por este anticuerpo monoclonal en la proteína gp48/E0 está altamente conservado entre los aislados de VDVB, por lo que su reactividad está muy poco influenciada por la variabilidad antigénica del VDVB. En un trabajo reciente Ellis *et al.* (1995) comparando la eficacia diagnóstica de esta técnica inmunohistoquímica con el aislamiento del virus y la inmunofluorescencia en el caso de abortos y muertes neonatales llegaron a la conclusión de que la técnica inmunohistoquímica sobre cortes histológicos proporcionaba los mejores resultados. La identificación del virus en tejidos fijados permite confirmar la infección con el VDVB sin necesidad de recurrir al aislamiento del virus. Esta técnica puede ser muy útil cuando se analizan muestras de animales muertos por procesos que pueden tener una etiología multifactorial como, por ejemplo, los respiratorios o los entéricos. La identificación del VDVB en estas muestras patológicas, aunque en algunos casos resulte difícil determinar si se trata del patógeno primario, debe considerarse siempre significativa desde el punto de vista general de la explotación (Brock, 1995).

### ELISA de captura de antígeno

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales específicos frente al VDVB ha permitido desarrollar diversas técnicas inmunoenzimáticas de captura de antígeno (Chu *et al.*, 1985; Fenton *et al.*, 1990; Vickers y Minocha, 1990; Greiser *et al.*, 1993; Ludemann y Katz, 1994; Entrican *et al.*, 1995; Sandvik y Krogsrud, 1995). Las técnicas ELISA de captura de antígeno probablemente sean la mejor alternativa para detectar antígenos del VDVB cuando se trabaja con un gran número de muestras (Horner *et al.*, 1995). De hecho, varias de estas técnicas están comercializadas y representan una buena herramienta diagnóstica para laboratorios que carecen de la mínima infraestructura necesaria para realizar el aislamiento.

La mayoría de estos ELISAs utilizan anticuerpos monoclonales frente a las proteínas p80/NS3-p125/NS23 que reconocen prácticamente a todos los aislados del VDVB. No obstante, hay que tener presente que esta proteína es común a todos los pestivirus, lo que puede dar lugar a reacciones falsas positivas (Collet *et al.*, 1989; Paton *et al.*, 1991b). La utilización de anticuerpos monoclonales frente a la glicoproteína gp53, aunque tiene la ventaja de que no da reacciones cruzadas con otros pestivirus, presenta el

inconveniente de que sólo se detectan un limitado número de aislados del VDVB (Bolin *et al.*, 1988; Xue *et al.*, 1990; Paton *et al.*, 1992).

A continuación se describen algunas de las técnicas ELISA de captura descritas en los últimos años en la literatura. Fenton *et al.* (1990, 1991) desarrollaron un ELISA de captura para detectar antígeno del VDVB en células sanguíneas de la serie blanca utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína p80/NS3. Estos investigadores detectaron el virus en 47 de 48 muestras que fueron positivas por aislamiento y no encontraron ningún falso positivo (167 muestras negativas por aislamiento también fueron negativas por este ELISA). Shannon *et al.* (1991) han desarrollado otra técnica ELISA de captura que permite detectar antígeno vírico en células de la serie blanca, coágulos de sangre y muestras de tejidos. La técnica propuesta por estos autores utiliza un antisuero policlonal frente al VDVB producido en cabras para capturar el antígeno y una mezcla de tres anticuerpos monoclonales para detectar el antígeno capturado. Greiser *et al.* (1993) compararon otra técnica ELISA de captura con el aislamiento del virus obteniendo una sensibilidad del 97%.

En 1991 se desarrolló una técnica ELISA de captura de antígeno con anticuerpos policlonales en el *Danish State Veterinary Institute for Virus Research* que ha proporcionado unos excelentes resultados y parece ideal para su utilización en un programa de erradicación (Bitsch y Ronstholt, 1995).

La mayoría de los ELISAs de captura descritos para detectar antígeno del VDVB utilizan, además de anticuerpos monoclonales, un anticuerpo policlonal. Recientemente, sin embargo, Entrican *et al.* (1995) han desarrollado un ELISA de captura que sólo utiliza anticuerpos monoclonales y que es más sensible que los que combinan el uso de anticuerpos mono y policlonales. Sin embargo, ninguno de los métodos de ELISA propuestos hasta la fecha ha igualado la sensibilidad del aislamiento del virus (Greiser *et al.*, 1993).

### **Citometría de flujo**

La citometría de flujo puede utilizarse como un método de identificación directa de antígenos del VDVB en muestras como una alternativa al aislamiento del virus (Qvist *et al.*, 1990; Qvist *et al.*, 1991). Qvist *et al.* (1990, 1991) comprobaron que la sensibilidad del análisis de la citometría de flujo de lisados de muestras de sangre completa era equivalente a la del aislamiento del virus. Sin embargo, la citometría de flujo presenta importantes inconvenientes derivados del importante coste económico del citómetro de flujo y de la necesidad de disponer de un técnico especializado.

#### **1.5.2.1.3. Detección de ácidos nucleicos**

La aplicación de los métodos de detección de ácidos nucleicos implica la detección directa del ARN genómico viral, lo que con respecto al aislamiento del virus tiene la ventaja de evitar la interferencia potencial con los anticuerpos neutralizantes (Brock, 1995). Además, estos métodos detectan el ARN genómico tanto de partículas víricas infecciosas como de partículas víricas defectivas o inactivadas. Por lo tanto, teóricamente la

sensibilidad de la detección debe ser igual o mayor que la del aislamiento del virus (Belak y Ballagipordany, 1991; Hertig *et al.*, 1991; Horner *et al.*, 1995). La especificidad de estos métodos depende de la región genómica seleccionada para la detección y de las condiciones de reacción utilizadas (Brock, 1995).

La aplicación de estos métodos requiere una extracción previa del ARN no degradado de las muestras antes de la detección, y precisamente en este paso se encuentra la principal desventaja de estos métodos dada la dificultad para extraer el ARN no degradado de las muestras clínicas (Brock y Potgieter, 1990; Brock, 1991). Será necesario desarrollar métodos mejorados de extracción del ARN, más rápidos y más sencillos para aumentar la aplicación práctica y la aceptación de estas técnicas.

### ***Hibridación de ácidos nucleicos***

El análisis comparativo de las secuencias de diversos aislados del VDVB permitió identificar regiones del genoma, tales como la que codifica la proteína no estructural p80/NS3-p125/NS23 y la región UTR 5', que tenían altos niveles de conservación de las secuencias de nucleótidos (Kwang *et al.*, 1991; Brock *et al.*, 1993). Además, comparando sondas frente a estas dos regiones se ha comprobado que las sondas de la región UTR 5' eran las que permitían detectar un mayor número de aislados del VDVB (Lewis *et al.*, 1991; Brock *et al.*, 1993; Ridpath *et al.*, 1993). Así, Brock *et al.* (1993) lograron detectar las 19 cepas de VDVB analizadas utilizando sondas de hibridación de la región UTR 5'. Comparativamente, sin embargo, utilizando tres sondas diferentes de otros tantos aislados del VDVB (cepas NY-1, NADL, y SD-1) dirigidas frente a la región que codifica la proteína p80/NS3, sólo consiguieron detectar entre el 60 y el 80% de las cepas analizadas (Brock *et al.*, 1993). En otro estudio Lewis *et al.* (1991) detectaron el 86% de los aislados víricos utilizando sondas de la región UTR 5'. Las técnicas de hibridación son útiles en determinados trabajos de investigación pero, por el momento, no se utilizan en los laboratorios de diagnóstico.

### ***Reacción de la transcriptasa reversa seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)***

El fundamento de esta técnica consiste en que con la reacción de la transcriptasa reversa (RT) se produce un ADN complementario (cADN) a partir de la cadena molde de ARN del virus, que posteriormente es amplificado por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La eficacia de esta técnica depende básicamente de los siguientes factores: (a) del método de extracción previo del ARN vírico no degradado, (b) de la elección de los cebadores específicos para la amplificación y (c) de las condiciones de reacción empleadas. Como generalmente los cebadores se diseñan a partir de secuencias muy conservadas, estas técnicas permiten detectar, además del VDVB, la mayoría de los pestivirus incluyendo el VPPC y el VEB. No obstante, con una selección adecuada de cebadores se han conseguido diferenciar el VDVB y el VPPC (Wirz *et al.*, 1993). La sensibilidad de esta técnica, al menos en teoría, debería ser igual o superior a la del aislamiento del virus. En la mayoría de los casos, en condiciones experimentales, la RT-PCR es capaz de detectar niveles de virus de 10 a 1000 veces menores que el aislamiento (Hertig *et al.*, 1991; López *et al.*, 1991; Alansari *et al.*, 1993).

Son muchos los grupos de investigación que han desarrollado técnicas RT-PCR para detectar el VDVB (Fenton *et al.*, 1990; Belak y Ballagipondany, 1991; Hertig *et al.*, 1991; López *et al.*, 1991; Ward y Misra, 1991; Hooft van Iddekinge *et al.*, 1992; Alansari *et al.*, 1993; Hamel *et al.*, 1995). La mayor parte de las técnicas RT-PCR descritas se han aplicado a la detección del VDVB en muestras de sangre y suero, pero también se han descrito otros protocolos que permiten detectar el ARN vírico en diferentes tejidos (López *et al.*, 1991; Gruber *et al.*, 1993; Schmitt *et al.*, 1994; Hamel *et al.*, 1995), en leche (Brock y Radwan, 1992; Radwan *et al.*, 1995) y en semen (Da Silva *et al.*, 1995).

Radwan *et al.* (1995) han adaptado la técnica RT-PCR para detectar el VDVB en muestras de leche del tanque de mezcla lo que permite identificar explotaciones infectadas. La técnica requiere la extracción del ARN vírico de las células somáticas de la leche. Utilizando como control positivo la leche de un animal PI, los autores comprobaron que la RT-PCR detectaba el VDVB en un mínimo de 580 células somáticas, mientras que el límite de detección por aislamiento estaba en 8500 células. Al aplicar la técnica a muestras de leche procedentes de explotaciones los investigadores detectaron el virus en 31 de 83 explotaciones sospechosas de sufrir la infección y en otras 2 de 41 explotaciones seleccionadas al azar. Por contra, los intentos de detectar el virus por aislamiento de estas muestras fueron negativos en todos los casos, lo que según los autores podría deberse a la presencia de Acs frente al virus en la leche.

Recientemente un grupo de investigadores españoles han puesto a punto una RT-PCR para la detección del VDVB en semen (Da Silva *et al.*, 1995), cosa que no se había conseguido con anterioridad ya que las diferentes RT-PCR no funcionaban cuando se aplicaban a la detección del virus en semen. La aportación más novedosa del protocolo propuesto por Da Silva *et al.* (1995) consiste en pasar el semen por una columna de cromatografía Sephacryl S-400 antes de la extracción del ARN vírico. Este paso, según los investigadores, podría contribuir a eliminar inhibidores de la transcriptasa reversa presentes en el semen. La prueba puede ser especialmente útil para el control de los animales en los centros de IA, máxime teniendo en cuenta que con frecuencia el aislamiento del virus a partir del semen fracasa. El fracaso del aislamiento del virus a partir de semen puede explicarse por los efectos viricidas del semen (Kahrs *et al.*, 1980), por los bajos títulos del virus en semen que pueden ir de 5 a 75 DI<sub>50</sub>CT/ml (Kirkland *et al.*, 1991) o por la inhibición de la transcriptasa reversa por el virus (Reddy *et al.*, 1983).

La RT-PCR presenta desventajas importantes para su uso rutinario en los laboratorios de diagnóstico tales como su coste económico y la laboriosidad del procesado de las muestras. No es extraño, por lo tanto, que en la actualidad la atención de los investigadores se esté dirigiendo a desarrollar protocolos más sencillos que puedan aplicarse directamente a muestras clínicas (Hamel *et al.*, 1995). Aunque muy posiblemente la RT-PCR nunca llegará a utilizarse de forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico, si puede ser, en determinadas circunstancias, una buena elección para la detección del VDVB especialmente cuando no se obtengan resultados concluyentes con otras pruebas como el aislamiento.

### I.5.2.2. Métodos indirectos (serológicos)

Aunque se han realizado diferentes estudios sobre la respuesta inmune celular frente al VDVB, desde el punto de vista diagnóstico sólo se utiliza la respuesta humoral. Recordemos que los animales que sufren una infección aguda con el VDVB seroconvierten dentro de las 2 a 3 semanas posteriores a la exposición al virus, que el título de anticuerpos puede seguir aumentando durante algunas semanas después, que en los animales que superan la infección los Acs persisten durante años, posiblemente durante toda la vida, y que los terneros que toman calostro de vacas seropositivas adquieren Acs que declinan lentamente durante los primeros meses de vida. Por lo tanto, la detección de Acs en una única muestra de suero de un animal no vacunado sólo nos indicará que el animal sufrió la infección en algún momento del pasado y, lógicamente, no tiene valor diagnóstico. El diagnóstico serológico de la infección aguda requiere analizar dos muestras de suero, una tomada durante la fase aguda y otra 3 ó 4 semanas después, para demostrar que durante este intervalo se ha producido una seroconversión o un aumento significativo del título de Acs.

Entre las diferentes pruebas serológicas descritas para la detección de Acs frente al VDVB las más ampliamente utilizadas son la seroneutralización y ELISA. Otras pruebas como la inmunodifusión o la fijación del complemento se utilizan muy poco en la actualidad.

#### *Seroneutralización vírica (SNV)*

La seroneutralización vírica ha sido tradicionalmente el método serológico más utilizado para determinar los niveles de los anticuerpos específicos frente al VDVB. La técnica, lógicamente, precisa el empleo de cultivos celulares, lo que limita su uso a aquellos laboratorios que disponen de estas facilidades. Al igual que en el aislamiento del virus, es muy importante comprobar que el cultivo celular no esté contaminado por una cepa endógena del VDVB y que el suero fetal bovino usado en el medio de cultivo esté libre del VDVB y de factores inhibitorios del crecimiento de este virus (Edwards, 1990). La realización de la prueba requiere de 3 a 5 días.

No existe una cepa de referencia aceptada por todos los laboratorios para realizar la prueba (Edwards, 1990; Brock, 1995). Las cepas de referencia utilizadas con más frecuencia en el mundo son las cepas citopáticas NADL, Singer y Oregon C24V. No obstante, en la SNV también pueden utilizarse como referencia cepas no citopáticas combinándolas con el ensayo de inmunoperoxidasa en placa (Brock, 1995).

Es preciso tener presente que la SNV no es una técnica totalmente reproducible y que, por lo tanto, los títulos de seroneutralización pueden variar de un laboratorio a otro por varias razones. La razón principal para esta variación es consecuencia de la diversidad antigénica entre las cepas del VDVB utilizadas en los ensayos de SNV (Castrucci *et al.*, 1975; Bolin *et al.*, 1988; Bolin *et al.*, 1991). Así, por ejemplo, Deregt *et al.* (1992) compararon el uso como cepas de referencia de las cepas NADL y Singer usando la línea celular MDBK y encontraron que la cepa Singer daba menos resultados negativos y mayores títulos que la NADL. En la tabla I.8 se muestra otro ejemplo ilustrativo de este

hecho. Como puede apreciarse en la tabla los títulos de seroneutralización varían considerablemente en función de la cepa utilizada en la prueba. El tipo de cultivo celular utilizado en el ensayo, el número de pases de estos cultivos y la propia metodología de cada laboratorio son otras posibles causas de la variación en los resultados (Edwards, 1990; Brock, 1995).

**Tabla I.8.** Comparación de títulos de SNV usando diferentes cepas de referencia del VDVB (tomado de Brock, 1991).

Animal N°	SD-1 <sup>a</sup>	BJ <sup>a</sup>	NADL <sup>b</sup>
1	>1:640	1:80	>1:640
2	1:80	>1:640	1:10
3	>1:640	1:5	1:320
4	<1:5	1:5	<1:5
5	<1:5	1:10	<1:5
6	<1:5	<1:5	<1:5

<sup>a</sup>Cepa NCP de VDVB; <sup>b</sup>Cepa CP de VDVB

Además de la diferencia en los títulos obtenidos según la cepa de VDVB utilizada, los resultados pueden variar entre laboratorios incluso cuando se utiliza la misma cepa de referencia puesto que estos virus no son antigénicamente estables en pases repetidos. Así, se ha comprobado con anticuerpos monoclonales que existen diferencias antigénicas en una misma cepa de referencia mantenida en diferentes laboratorios (Cay *et al.*, 1989).

Debido a las dificultades mencionadas para estandarizar los ensayos de SNV es importante destacar que el análisis de los sueros pareados (de la fase aguda y convaleciente) debe realizarse simultáneamente en el laboratorio. Los sueros tomados en la fase aguda deben almacenarse congelados hasta que se pueda disponer de los sueros correspondientes a la fase convaleciente.

### **ELISA**

La técnica ELISA constituye una alternativa a la SNV. En la mayoría de los casos los títulos obtenidos por ELISA se correlacionan bien con los obtenidos por SNV. Teniendo en cuenta que, en comparación con la SNV, la técnica ELISA es más fácil de realizar en cualquier laboratorio, más rápida, más barata y más adecuada para procesar un elevado número de muestras es muy probable que se convierta a corto plazo en el método serológico más utilizado. De hecho, diferentes ensayos ELISA están siendo ya comercializados por algunos laboratorios.

La mayoría de los protocolos de ELISAs descritos hasta la fecha para la detección de anticuerpos frente al VDVB utilizan un antígeno purificado del virus para tapizar las placas (Chu *et al.*, 1985; Bock *et al.*, 1986; Durham y Hassard, 1990; Cho *et al.*, 1991; Moenning *et al.*, 1991; Paton *et al.*, 1991b). El antígeno más empleado en estas pruebas de ELISA es la proteína p80/NS3-p125/NS23 dado que contiene determinantes antigénicos compartidos por prácticamente todos los aislados del VDVB.

Un problema asociado con frecuencia a este tipo de ELISA es que dan lugar a unos altos niveles de "ruidos de fondo" (uniones inespecíficas), lo que está relacionado con el grado de pureza del antígeno empleado para tapizar las placas. Para limitar este inconveniente se han utilizado diversos métodos de preparación del antígeno (Chu *et al.*, 1985; Bock *et al.*, 1986; Cho *et al.*, 1991) que son bastante laboriosos, lo que conlleva un importante gasto en tiempo y dinero. La obtención de proteínas del VDVB por recombinación genética permitirá disponer de antígenos útiles para el diagnóstico a un coste económico razonable (Kwang *et al.*, 1995).

Niskanen *et al.* (1991) y Carlsson *et al.* (1992) han desarrollado sendos ELISAs para detectar niveles de anticuerpos en muestras de leche tanto de animales individuales como procedentes de tanques de mezcla. Estos investigadores han encontrado una buena correlación entre el nivel de anticuerpos en el tanque de mezcla y la presencia de animales persistentemente infectados en la explotación. Este ELISA podría ser un buen método de cribado en las explotaciones no vacunadas. En España algunos laboratorios ya realizan rutinariamente esta prueba.

### **I.5.2.3. Tipo de muestras que deben remitirse al laboratorio y selección e interpretación de las pruebas diagnósticas**

El tipo de muestras que deben remitirse al laboratorio depende del historial de la explotación. Así, por ejemplo, para evaluar e interpretar correctamente la serología es necesario conocer el historial de vacunaciones de la explotación. También es diferente la forma de enfocar el diagnóstico según se trate de confirmar una infección aguda o una infección persistente (ver tabla I.9).

**Tabla I.9.** Interpretación del estado del animal con respecto a la infección de acuerdo con los resultados de las pruebas diagnósticas.

VIRUS	ANTICUERPO	INTERPRETACIÓN
-	-	- Animal no infectado por el VDVB y plenamente receptivo a la infección
-	+	<p>1. Ternero hasta aproximadamente 6 meses, no vacunado</p> <p>a) Nacido de madre seropositiva:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Posibles Acs calostrales</li> </ul> <p>b) Nacido de madre seronegativa:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sufrió la infección y tiene una inmunidad sólida frente al VDVB</li> </ul> <p>2. Animal mayor de 6 meses no vacunado</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sufrió la infección y tiene una inmunidad sólida frente al VDVB</li> </ul> <p>3. Animal vacunado</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Puede o no haber sufrido la infección y tiene una inmunidad más o menos sólida frente al VDVB en función de si padeció o no la infección y del tipo y frecuencia de vacuna empleada.</li> </ul>
+	-	<p>1. El animal sufre la infección persistente: inmunotolerante (lo más frecuente)</p> <p>2. El animal está en la fase inicial de una infección aguda (infrecuente)</p>
+	+	<p>1. El animal está en fase final de una infección aguda y ha seroconvertido (infrecuente)</p> <p>2. El animal era seropositivo pero no estaba suficientemente protegido frente a la cepa infectante y sufre la infección aguda (posible)</p> <p>3. El animal sufre la infección persistente</p> <p>a) Menor de 3 meses nacido de madre seropositiva:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Posibles Acs calostrales</li> </ul> <p>b) Mayor de 3 meses:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Entró en contacto con un virus heterólogo al que está produciendo la infección persistente por superinfección o vacunación</li> </ul>

### ***1.5.2.3.1. Infecciones agudas***

Hay que tener presente que en el caso de infecciones agudas el VDVB sólo puede aislarse de los animales entre aproximadamente el día 3 y el día 8 a 10 postinfección y en algunos animales el aislamiento sólo es positivo durante 2 ó 3 días en el transcurso de la infección. La mejor muestra para aislar el VDVB de animales infectados de forma aguda es la sangre completa (es mejor que el suero del que puede aislarse durante un intervalo de tiempo más corto). Además, pueden recogerse muestras con hisopos de la cavidad nasal y enviarlas al laboratorio para intentar el aislamiento del virus.

El desarrollo de los anticuerpos neutralizantes en los animales convalecientes interfiere con el aislamiento del virus. Dado que las técnicas que detectan ácidos nucleicos no se ven afectadas por la presencia de los anticuerpos neutralizantes, estos métodos pueden ser positivos durante períodos más largos que el aislamiento del virus.

En los casos de animales muertos por la infección aguda deben remitirse principalmente órganos linfoides (Dubovi, 1990). En estos casos el diagnóstico puede realizarse mediante la detección de antígenos específicos o por aislamiento del virus.

El aislamiento del virus de los animales con infección aguda con frecuencia puede presentar dificultades. De ahí que la serología sea el método de diagnóstico más empleado. Deben analizarse sueros pareados de un mismo animal con un intervalo de 3 a 4 semanas y debe observarse un importante incremento, hasta cuatro veces, del título de anticuerpos en el suero tomado en la fase convaleciente con respecto al suero tomado en fase de infección aguda. En las explotaciones afectadas por brotes agudos deben tomarse muestras de suero de cualquier animal con diarrea, fiebre, anorexia o disminución de la producción de leche. Además de las muestras de los animales más afectados, el envío de muestras de otros animales sanos de la explotación puede facilitar el diagnóstico.

### ***1.5.2.3.2. Abortos***

En el caso de abortos lo ideal sería remitir los fetos enteros y, si esto no fuera posible deben recogerse diferentes órganos (tiroides, timo, cerebro, bazo y riñón) sobre medios de transporte adecuados para virus. A partir de estos órganos puede intentarse el aislamiento o la detección del virus. Además, es recomendable enviar sangre del corazón y/o exudado pleural, pericárdico o peritoneal para detectar anticuerpos.

Hay que tener en cuenta que en muchos abortos asociados con el VDVB no puede aislarse o detectarse el virus. Los fetos abortados o los animales nacidos muertos que se infectaron cuando eran inmunocompetentes (después de los 90 a 125 días de gestación) serán negativos al virus pero positivos a Acs. La detección de Acs en el suero de sangre extraída del corazón o en exudados confirmaría la infección intrauterina.

La serología de las madres suele ser de escasa ayuda puesto que, dado el intervalo que hay entre la infección de las madres y los abortos, las hembras seroconvierten antes de que se produzca el aborto. Sin embargo, si la madre es seronegativa podrá descartarse al

VDVB como causa del aborto, salvo que se trate de una vaca PI, en cuyo caso habría que tratar de aislar el virus de la misma.

El diagnóstico en terneros con defectos congénitos debe incluir el aislamiento del virus y la serología (antes de que los animales tomen calostro). La mayoría de las alteraciones congénitas asociadas con el VDVB se producen tras la infección del feto que ya es inmunocompetente. De ahí que estos terneros son raramente virémicos pero suelen presentar títulos de anticuerpos

### ***1.5.2.3.3. Infecciones persistentes***

La identificación de los animales PI se realiza mediante el aislamiento del virus. El nivel de viremia en los animales PI es generalmente bastante elevado ( $10^6$  DI<sub>50</sub>CT/ml de suero) pero podría variar entre  $10^2$  y  $10^7$  DI<sub>50</sub>CT/ml (Brock *et al.*, 1991). Además, en algunos animales el nivel de viremia podría descender pasado un tiempo (Brock y Grooms, 1994).

En la mayoría de los casos el suero es una muestra adecuada para el aislamiento del virus. Sin embargo, en terneros jóvenes que han tomado calostro de madres seropositivas los anticuerpos maternos podrían disminuir el nivel de virus libre en el suero con lo que el aislamiento del virus podría dar un resultado falso negativo. Por ello, en terneros menores de tres meses de edad la mejor muestra para realizar el aislamiento son las células mononucleares de sangre completa (Dubovi, 1990).

Algunos investigadores han sugerido que para identificar a los animales PI podría, en primer término, recurrirse a la serología, lo que permitiría seleccionar los animales seronegativos, que serían los que posteriormente se someterían al aislamiento del virus. Los conocimientos actuales, sin embargo, desaconsejan esta estrategia, pues, si bien es cierto que muchos animales PI son seronegativos, también lo es que la inmunotolerancia es altamente específica y que, por lo tanto, los animales PI pueden desarrollar una respuesta inmune frente a cepas del VDVB antigénicamente distintas a la que está produciendo la infección persistente. Los anticuerpos frente al VDVB detectados en los animales PI, dejando aparte los adquiridos por los terneros a través del calostro materno, son consecuencia de que los animales entran en contacto con una cepa del virus antigénicamente diferente bien por exposición natural (superinfección) o bien por vacunación.

Los animales PI se identifican como tales cuando se aísla el virus en dos muestras del mismo animal tomadas con un intervalo de 30 días (en el caso de animales con infección aguda al cabo de ese tiempo ya no se aislaría el virus). Además, la serología pareada demostraría que en el caso de los animales PI o bien son seronegativos o bien no hay variaciones en el título entre las dos muestras de suero, mientras que en el caso de animales con infección aguda se observaría una seroconversión.

## I.6. PREVENCIÓN Y CONTROL

Las infecciones producidas por el VDVB no están incluidas ni en la lista A ni en la lista B de enfermedades de la Organización Internacional de Epizootias (OIE) (Brar *et al.*, 1978) y, excepto en Noruega, no es una enfermedad de declaración obligatoria.

No existe un tratamiento eficaz contra la DVB. Cuando, como consecuencia de la infección, se produce sintomatología clínica puede recurrirse a un tratamiento de soporte en el que cabe considerar el uso de antibióticos para el tratamiento de las infecciones bacterianas secundarias. El uso de corticoesteroides está contraindicado porque posiblemente tengan un efecto aditivo sobre la inmunosupresión inducida por el virus. En su lugar pueden emplearse antiinflamatorios no esteroideos. Si se presenta deshidratación habrá que corregirla administrando por vía oral o intravenosa soluciones de electrolitos. Si el proceso se acompaña de diarrea pueden administrarse antidiarréicos y protectores intestinales (Baker, 1995).

Los esfuerzos para luchar contra el VDVB deben dirigirse, por lo tanto, a la prevención y el control de la infección con el objetivo básico de evitar o reducir las pérdidas económicas producidas por este virus.

Las medidas de prevención y control deben sustentarse en un conocimiento preciso de los diferentes aspectos de la infección y muy especialmente de: (a) la epidemiología del VDVB, en particular sus formas de mantenimiento, difusión y transmisión en las que los animales PI juegan un papel clave, (b) la compleja patogenia de la infección, en la que cabe destacar las consecuencias de la infección transplacentaria, (c) la eficacia y disponibilidad de las diferentes pruebas diagnósticas, lo que permitirá utilizar en cada situación las que proporcionen los mejores resultados y (d) la respuesta inmune de los animales tras la infección o la vacunación, y en el caso de la vacunación es preciso conocer las características de las vacunas existentes en el mercado frente al VDVB.

Por el momento, sólo los países escandinavos han puesto en marcha programas de control, y posible erradicación, del VDVB a escala nacional. Estos países cumplen dos condiciones básicas para establecer dichos programas: tienen en general una baja prevalencia de la infección y no utilizan vacunas.

En la mayoría de los países, incluido España, debido a su situación epidemiológica con altas prevalencias de la infección, el control de la infección debe abordarse básicamente a nivel de explotación. No obstante, como es lógico, los programas de control serían más eficaces si pudieran implantarse a nivel local, comarcal o regional en aquellas zonas con una densidad alta de ganado bovino y/o en las que los animales de distintas explotaciones puedan entrar en contacto.

Las medidas de prevención y control a adoptar dependerán de la situación de partida de cada explotación con respecto a la infección. Inicialmente las explotaciones podrán catalogarse como no infectadas, como infectadas o como de estado desconocido.

Sólo puede tenerse la seguridad de que una explotación está libre del VDVB cuando todos los animales de la misma son seronegativos. En España, de acuerdo con diferentes estudios (Prieto *et al.*, 1988; Álvarez *et al.*, 1994a) y al igual que en la mayoría de los países, sólo cumplen esta condición una pequeña proporción de explotaciones, que generalmente son pequeñas y/o cerradas y/o aisladas y que, por supuesto, no utilizan vacunas. En estas explotaciones libres del VDVB debe evitarse la introducción de la infección aplicando las medidas de profilaxis sanitaria que se exponen más adelante. No obstante, si se estima que el riesgo de que la explotación se infecte (por encontrarse en una zona de alta prevalencia de la infección y con una alta densidad de ganado bovino, por no ser una explotación cerrada o por otras razones epidemiológicas) es muy elevado, puede además instaurarse un programa de vacunación.

En las explotaciones que se saben infectadas, generalmente aquellas en las que se ha diagnosticado la infección en el laboratorio a partir de una sospecha clínica, el primer objetivo debe ser identificar y eliminar a los animales PI que, como sabemos, son los responsables del mantenimiento y la transmisión del virus en la explotación.

Para identificar a los animales PI debe realizarse un análisis individual de todos los animales de la explotación mayores de 3 meses (hay quien recomienda realizarlo a partir de los 6 meses) para detectar el virus en sangre. Las técnicas ELISA de captura de antígeno son las más recomendables para este propósito dada su eficacia y su relativa sencillez. Los terneros menores de 3 (o de 6) meses se analizarán cuando alcancen esta edad. Debido a la posible interferencia con los Acs calostrales se recomienda que los terneros se analicen una segunda vez a los 3-4 meses de la primera para asegurarse de que no se mantiene en la explotación ningún animal PI. Además, deberán analizarse todos los terneros nacidos en la explotación durante los 9 meses siguientes al estudio global preferentemente antes de que tomen calostro. Con ello nos aseguraremos de que no nace ningún animal PI de hembras gestantes que pudieran estar en fase de convalecencia de una infección aguda en el momento que se realizó el análisis de toda la explotación.

Hay que tener en cuenta que si la recogida de muestras de sangre se realizó mientras estaba teniendo lugar una infección aguda pueden detectarse animales virémicos que estaban infectados transitoriamente. Si el resultado de los análisis, por la cantidad y/o calidad de los animales que dan positivo, indica que puede haber sucedido esto, puede resultar interesante realizar un segundo análisis a estos animales 2 ó 3 semanas después para confirmar definitivamente si están o no PI.

Algunos autores han propuesto para detectar a los animales PI realizar un primer análisis serológico a todos los animales de la explotación mayores de 6 meses y, posteriormente, limitar la detección del virus en sangre a los animales seronegativos. Aunque este método resulta más barato, no garantiza que se detecten todos los animales PI. Recordemos que la inmunotolerancia inducida por el VDVB es específica para la cepa de virus infectante y, en consecuencia, algunos animales PI pueden ser seropositivos por contacto con una cepa heteróloga o por haber sido vacunados.

Los animales identificados como PI deben eliminarse lo antes posible de la explotación y, en tanto se produce la eliminación física, deben permanecer aislados del

resto de los animales especialmente de las hembras gestantes. Su único destino, por razones deontológicas, debe ser el matadero.

De acuerdo con los resultados obtenidos hasta el momento con un programa piloto de control llevado a cabo en la isla danesa de Samsoe, e iniciado en 1992, la identificación y eliminación de los animales PI permite erradicar el VDVB (Bitsch y Ronstholt, 1995). Apoyándose en esta experiencia, Bitsch y Ronsholt, (1995) consideran que la posible latencia y reactivación de la infección no parece jugar un papel importante en las condiciones de campo para mantener la infección en las explotaciones. Por el contrario, Edwards *et al.* (1986) han encontrado evidencias serológicas de que el VDVB siguió circulando en 4 explotaciones inglesas en las que se habían eliminado los animales PI. Estos resultados contradicen la experiencia danesa realizada a una escala mucho mayor y podrían deberse a una deficiencia en la detección de los animales PI o a una insuficiente aplicación de las medidas de prevención encaminadas a impedir la reinfección de las explotaciones.

Los programas de control en las explotaciones infectadas, además de la eliminación de los animales PI, deben incluir un programa de vacunación adaptado a las condiciones de cada explotación (si ya se está haciendo deberá continuarse siempre que se considere adecuado o modificarse) y unas medidas estrictas de profilaxis sanitaria que eviten la reinfección de las explotaciones (ver más adelante).

Cuando se desconoce el estado de una explotación con respecto a la infección, lo cual suele ser frecuente, pueden adoptarse diferentes estrategias. Una primera opción es considerar a la explotación como potencialmente infectada y, consecuentemente, actuar como se expuso antes. Esta estrategia, sin embargo, debido a los gastos que acarrea, puede no ser económicamente rentable en muchas explotaciones. Si se descarta esta opción, la estrategia a seguir debería decidirse en buena medida en función de los antecedentes de la explotación: si se han presentado o no en los últimos años patologías asociables al VDVB, si se está o no realizando un programa de vacunación y en caso afirmativo desde cuándo, etc.

En las explotaciones sin antecedentes puede optarse simplemente por aplicar (o continuar) un programa de vacunación y por extremar las medidas de prevención para impedir la entrada del virus en las explotaciones. Lógicamente esta estrategia es más barata pero con ella se corre el riesgo de que, si la explotación está infectada, los avances en el control de la infección pueden ser lentos. En cualquier caso debería hacerse un seguimiento estrecho de los animales e investigar cualquier patología en la que pudiera estar implicado el VDVB.

Por último, puede optarse por investigar el estado de la explotación con respecto a la infección recurriendo al análisis serológico y/o a la detección del virus en una muestra reducida de los animales de la explotación. Hay que tener presente que los muestreos serológicos proporcionan una información limitada cuando se utilizan vacunas y, por lo tanto, los resultados deben interpretarse con cautela. Aunque se han propuesto diferentes métodos de muestreo serológico, su aplicación en la situación española está bastante limitada, dado el uso cada vez más generalizado de vacunas.

De acuerdo con los estudios de Houe *et al.* (1995a) si las explotaciones no utilizan vacunas o sólo usan vacunas inactivadas, el análisis serológico de un pequeño número de animales de la explotación puede utilizarse como un indicador indirecto de la presencia o no de animales PI, puesto que los títulos de Acs de los animales de las explotaciones con animales PI son mayores que los de las explotaciones sin animales PI incluso cuando se utilizan vacunas inactivadas. El método propuesto por Houe *et al.* (1995a) consiste en estudiar el título de Acs neutralizantes en cinco animales de la explotación del grupo de 9 a 18 meses y clasificarlos en animales con título alto ( $>128$ ) o con título bajo ( $<64$ ). En las explotaciones con animales PI la probabilidad de obtener al menos 3 animales con título alto es mayor del 99% mientras que en las explotaciones sin animales PI la probabilidad es menor del 1% en las que utilizan vacunas inactivadas y menor del 0,1% en las que no usan vacunas.

Otra posibilidad es incluir en el estudio serológico varios animales de los siguientes grupos: terneros de 8-9 meses, novillas preñadas, novillas de primer parto, vacas de segundo parto y vacas adultas. Recordemos que las explotaciones con animales PI generalmente tienen unas altas prevalencias ( $>90\%$ ) de animales seropositivos (Houe *et al.*, 1995b). Por lo tanto, si las explotaciones no utilizan vacunas, la distribución por edades de los animales seropositivos puede indicar si existe o no en el momento actual animales PI en la explotación (prácticamente los animales de todas las edades serán seropositivos) o si hubo animales PI en el pasado (sólo serán seropositivos los animales adultos).

En las explotaciones lecheras que no utilizan vacunas también puede recurrirse a un muestreo análogo al utilizado en los programas de control de los países escandinavos (Bitsch y Ronstholt, 1995), esto es, estudio de Acs en el tanque de mezcla de leche y estudio serológico de unos pocos animales jóvenes. Así, por ejemplo, pueden muestrearse 9 animales: 3 de terneros mayores de 8 meses, 3 de novillas preñadas y 3 de novillas de primer parto seleccionados al azar. Niskanen *et al.* (1991) encontraron que el estudio de Acs en el tanque de mezcla de leche con un método ELISA era particularmente útil para estimar el estado de infección de una explotación. Usando un ELISA indirecto Niskanen (1993), encontró una excelente correlación entre los valores de absorbancia y los títulos de Acs en la leche. Además, demostró que existía una relación positiva entre la prevalencia de animales seropositivos en la explotación y los valores de absorbancia obtenidos en las muestras de leche del tanque, lo que permite estimar la proporción de animales seropositivos en la explotación (ver tabla I.10), y esto, a su vez, puede utilizarse como un indicio de la presencia o no de animales PI en la explotación. Un método semejante al de Niskanen se utiliza en los programas de control de varios países escandinavos.

**Tabla I.10.** Relación entre los valores de absorbancia obtenidos por un método ELISA indirecto de detección de Acs en muestras de leche del tanque y el porcentaje estimado de animales seropositivos en la explotación (Niskanen, 1993).

VALOR ABSORBANCIA	CLASIFICACIÓN SEGÚN ESTADO DE INFECCIÓN	% ESTIMADO DE ANIMALES SEROPOSITIVOS
< 0.05	Clase 0	< 5%
0.05-0.25	Clase 1	5-25%
0.25-0.55	Clase 2	25-65%
> 0.55	Clase 3	> 65%

La detección del virus se intentará en aquellos animales que tengan más probabilidades de estar PI: (a) animales de cualquier edad que nacieron durante o poco después de un episodio de abortos, de nacimientos de terneros débiles o de nacimiento de terneros con malformaciones y (b) animales de cualquier edad que presentan retraso en el crecimiento, un mal aspecto general o que son más sensibles a padecer enfermedades.

En las explotaciones lecheras una alternativa es intentar primero detectar el virus en muestras del tanque de mezcla mediante la técnica RT-PCR (Radwan *et al.*, 1995) y, si el resultado es negativo, muestrear a los animales con más probabilidades de estar PI.

En función de los resultados obtenidos en los muestreos realizados las explotaciones se clasificarán como infectadas, en cuyo caso deberá procederse al análisis individual de los animales como se expuso antes, o como probablemente no infectadas.

### I.6.1. Medidas para evitar la infección o reinfección de las explotaciones

Para evitar que las explotaciones libres del VDVB se infecten o que las explotaciones que eliminaron los animales PI se reinfecten deben adoptarse las siguientes medidas:

- Control estricto de todos los animales que se incorporan a la explotación. Recordemos que la forma más frecuente de introducción de la infección en una explotación es a través de la incorporación de animales PI (generalmente novillas) o de hembras gestantes que portan un feto infectado. Sólo se admitirán en la explotación los animales analizados con una técnica apropiada que resulten no estar PI. Si se trata de hembras gestante se hará, además, un análisis serológico y si son seropositivas se las aislará en el momento del parto y los terneros no se incorporarán a la explotación hasta que no se haya demostrado que no están PI.

Por otra parte, para evitar la incorporación de animales que padezcan una infección aguda, y que pudieran no haber sido detectados en el análisis de sangre, se recomienda mantener a los nuevos animales aislados durante 3 semanas antes de incorporarlos a la explotación. Además, si algún animal de la explotación sale transitoriamente de ella, por ejemplo para acudir a mercados o exhibiciones, al volver se le considerará como un animal nuevo.

- Evitar la transmisión a través de la inseminación artificial y el trasplante de embriones. El control del semen está regulado por normativas internacionales. Las normativas comunitarias establecen un riguroso control sanitario sobre los sementales de los centros de inseminación artificial exigiendo pruebas de aislamiento del virus, las cuales deben ser confirmadas por inmunofluorescencia directa o por inmunoperoxidasa, en todos aquellos animales con edad superior a los seis meses (Real-Decreto 2256/1994). Aunque estos métodos de diagnóstico tienen utilidad en la detección de los animales portadores del virus, pueden producirse falsos negativos (Afshar y Eaglesome, 1990). Por lo tanto, los métodos de detección en los centros de inseminación artificial deberían ser más rigurosos, incluyéndose pruebas de mayor sensibilidad, como por ejemplo la RT-PCR (Ackermans *et al.*, 1990). Recientemente Da Silva *et al.* (1995) han desarrollado un protocolo de RT-PCR para la detección del VDVB en muestras de semen que elimina las sustancias inhibidoras de la PCR presentes en el semen y que presenta una elevada sensibilidad y alta especificidad.

En la transferencia de embriones debe controlarse que ni la hembra donadora ni la receptora estén PI y que, si el líquido de lavados de los embriones contiene suero fetal bovino, éste no esté contaminado con el VDVB.

- Evitar los pastos comunales y el contacto con animales de explotaciones vecinas siempre que no se tenga la seguridad de que no existen animales PI.

- Evitar el contacto con otras especies animales que sean potenciales reservorios del VDVB o de otros pestivirus, especialmente con los pequeños rumiantes y los cerdos.

- Dado que existe la posibilidad de una transmisión indirecta de la infección a través de instrumentos o ropas contaminados, los veterinarios y otras personas que rutinariamente visitan granjas deberán tomar las precauciones pertinentes para no propagar la infección de una explotación a otra. Especial cuidado deben poner los veterinarios en desinfectar adecuadamente sus instrumentos de trabajo.

Algunos autores han propuesto como método de control propiciar deliberadamente el contacto de los animales de la explotación, sobre todo de las novillas antes de la primera cubrición, con animales PI (Roeder y Harkness, 1986). La estrategia consiste en retener a los animales PI en la explotación y utilizarlos como "vacunadores" del resto de los animales por contacto estrecho. Los riesgos asumidos por esta práctica son tan elevados si no se realiza un control riguroso de la infección que hacen que no sea aconsejable (Reid, 1995).

## **I.6.2. Profilaxis médica**

Una primera cuestión que queremos destacar es que resulta relativamente difícil evaluar la inmunidad inducida por las vacunas frente al VDVB (Potgieter, 1995). Para medir la respuesta protectora inducida por las vacunas se utilizan la inoculación experimental postvacunal y la respuesta serológica. Sin embargo, las cepas que se utilizan actualmente para inocular los animales con frecuencia no producen una enfermedad experimental que sea fácilmente cuantificable. Debido a ello y a que los estudios de protección frente al VDVB en animales que sean válidos estadísticamente son muy caros, la atención de los investigadores para evaluar la eficacia de las vacunas se ha concentrado en la producción de Acs neutralizantes por los animales vacunados (Potgieter, 1995). Los Acs neutralizantes probablemente representan una respuesta inmune frente a algunos epítomos de la proteína gp53 del virus, pero no se sabe si esta respuesta, en sí misma, es adecuada para proporcionar protección a los animales frente al VDVB, máxime teniendo en cuenta la variabilidad antigénica del VDVB (Potgieter, 1995). La protección de los animales, además de una respuesta inmune de base humoral, incluye una respuesta de base celular. La importancia relativa de esta última respuesta no se conoce, pero probablemente contribuya en gran medida al estado inmune de los animales frente al virus.

Actualmente se dispone de dos tipos de vacunas frente a la DVB: atenuadas e inactivadas.

### ***I.6.2.1. Vacunas atenuadas***

Las vacunas atenuadas fueron las primeras producidas frente al VDVB y prácticamente desde que comenzaron a utilizarse se han visto envueltas en una fuerte controversia sobre su seguridad.

Las vacunas atenuadas generalmente contienen una única cepa del biotipo CP. Las cepas usadas con más frecuencia son la NADL, la Singer y la C24V. La atenuación del virus, que se realiza por pases seriados en células bovinas o porcinas, disminuye su virulencia y restringe su capacidad de replicación en los animales reduciendo la eliminación de virus vacunal por los animales.

También se ha utilizado la inducción de mutaciones para atenuar el VDVB. En varios países europeos, incluido España, se comercializa una vacuna atenuada por este procedimiento que contiene una cepa mutante termo-sensible genéticamente estable. Esta vacuna proporciona una protección adecuada y es más segura que las atenuadas por pases en cultivos celulares (Lobmann *et al.*, 1986). Puede administrarse a hembras gestantes puesto que no infecta al feto.

### ***Ventajas de las vacunas atenuadas***

- Dado que estas vacunas contienen virus con capacidad de replicarse en los animales, sólo se necesita un pequeño número de partículas víricas infectivas para la inmunización (Kahrs, 1966).

- Son baratas de producir.
- La mayoría de las vacunas atenuadas se administran por vía subcutánea o intramuscular en una sola dosis, lo que simplifica el manejo de los animales a vacunar.
- Las vacunas atenuadas estimulan una respuesta inmune rápida, lo que supone una ventaja cuando se necesita obtener una rápida protección. Los anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacunación aparecen entre los 10-14 días postinmunización y alcanzan el máximo a las 6 semanas postvacunación.
- La inmunidad que inducen estas vacunas es de larga duración. Aunque la duración de los anticuerpos en el suero después de la vacunación no se conoce, es probable que sea similar a la que produce el virus de campo durante la infección natural. Los anticuerpos inducidos por la infección natural se detectan en altas concentraciones durante más de un año y, en la mayoría de los animales, persisten durante varios años (Kahrs, 1966; Coria *et al.*, 1978).
- La inmunidad es efectiva frente a una gama más amplia de cepas víricas que en el caso de las vacunas inactivadas. A las tres semanas postvacunación se detectan anticuerpos capaces de neutralizar una serie de cepas del VDVB antigénicamente diversas. Sin embargo, en algunos animales no se detectan Acs neutralizantes frente a cepas antigénicamente distintas a la vacunal a los dos años de la vacunación (Bolin, 1995b).

### ***Desventajas de las vacunas atenuadas***

- Pueden producir una enfermedad postvacunal si la vacuna mantiene una virulencia residual o si está contaminada con algún agente patógeno. El ejemplo clásico de este segundo caso es la contaminación con cepas de campo NCP del VDVB de las líneas celulares y el suero fetal utilizados para producir vacunas bovinas. Varios trabajos han descrito brotes clínicos tras la aplicación de vacunas contaminadas con el VDVB (Bolin, 1995b). Además, la aplicación de vacunas atenuadas en animales PI puede desencadenar la enfermedad de las mucosas entre 1 y 4 semanas postvacunación. Este hecho está ampliamente documentado y ocurre cuando la cepa citopática vacunal es homóloga a la cepa NCP que infecta al animal PI.
- Los virus vacunales, excepción hecha de los mutantes termo-sensibles, pueden atravesar la placenta e infectar al feto con las mismas consecuencias de la infección natural: muerte fetal, abortos, alteraciones congénitas, nacimiento de terneros PI, etc. (Orban *et al.*, 1983; Liess *et al.*, 1984; Trautwein *et al.*, 1986) (ver apartado de patogenia). Por lo tanto, estas vacunas no deben aplicarse en animales gestantes.
- Estas vacunas pueden ocasionar una inmunosupresión transitoria que se manifiesta poco después de la vacunación (Roth y Kaeberle, 1983). La inmunosupresión puede potenciar la patogenicidad de otros agentes infecciosos dando lugar a una enfermedad postvacunal. Por lo tanto, se desaconseja el uso de

estas vacunas en animales sometidos a un alto grado de estrés y, por supuesto, en animales enfermos.

- Pueden producirse fallos vacunales cuando la vacuna se almacena o se maneja de forma inadecuada.

- Existe la posibilidad de que el ARN del virus vacunal recombine con ácidos nucleicos de otros virus o del animal vacunado (Meyers *et al.*, 1991; Meyers *et al.*, 1992) y que, como consecuencia de ello, se origine un virus capaz de producir enfermedad.

- La vacunación durante el período de incubación de la enfermedad puede dar lugar a la explosión clínica de la DVB por lo que la vacunación de emergencia se considera de escaso valor.

### ***1.6.2.2. Vacunas inactivadas***

Las vacunas inactivadas frente al VDVB se desarrollaron varios años después de las atenuadas y surgieron como respuesta a las desventajas asociadas con estas últimas (especialmente su seguridad).

La diversidad de cepas utilizadas en la producción de estas vacunas es muchísimo mayor que en el caso de las atenuadas. Numerosas vacunas inactivadas son bivalentes y contienen cepas citopáticas y no citopáticas del VDVB. Estas vacunas también contienen diversos adyuvantes para reforzar la inmunogenicidad. Se han utilizado varios métodos para inactivar las partículas víricas en diferentes prototipos de vacunas inactivadas. Así, se ha usado cloroformo o detergentes para romper las partículas víricas produciendo vacunas que constan de antígeno vírico soluble (Fernelius *et al.*, 1971; Mohanty *et al.*, 1989). Asimismo, se han producido vacunas que contienen virus muertos intactos utilizando como agentes inactivantes formalina, beta-propiolactona, acetiletlenamina o etilenamina binaria (Fernelius *et al.*, 1972; Kolar *et al.*, 1972; McClurkin y Coria, 1978; McClurkin y Coria, 1980). Actualmente la etilenamina binaria es el agente más utilizado para inactivar al VDVB. Las vacunas inactivadas se administran por vía subcutánea o intramuscular y generalmente se aplican dos dosis con 2 a 4 semanas de intervalo.

### ***Ventajas de las vacunas inactivadas***

- Las vacunas inactivadas no tienen muchas de las desventajas asociadas con las vacunas atenuadas y su principal ventaja es que son muy seguras, por lo que pueden administrarse a todos los animales, incluidos los gestantes.

- Los métodos utilizados para inactivar estas vacunas probablemente inactivan también cualquier otro posible agente contaminante, lo que minimiza el riesgo de que se produzca una enfermedad postvacunal.

- Estas vacunas no producen inmunodepresión ni alteran el número de linfocitos circulantes (Ellis *et al.*, 1988; Larsson y Fossum, 1992).

- Dado que el virus se ha inactivado, es muy improbable que se produzca una reversión de la virulencia o una recombinación genética con otros virus

### ***Desventajas de las vacunas inactivadas***

- Los dos principales inconvenientes de estas vacunas son: (a) que la protección que confieren es poco duradera (distintas evidencias sugieren que la protección puede durar sólo de 4 a 6 meses, Potgieter, 1995) y (b) que la inmunidad frente a cepas heterólogas puede ser inadecuada (Bolin *et al.*, 1991; Dubovi, 1992; Martin *et al.*, 1994). El factor crítico responsable de la menor inmunidad inducida por las vacunas inactivadas en comparación con las atenuadas muy posiblemente sea la respuesta de base celular, pues, mientras que las vacunas atenuadas estimulan eficazmente esta respuesta, las inactivadas no inducen una respuesta sólida de las células T (Potgieter, 1995). En cualquier caso hay autores que consideran que las vacunas inactivadas probablemente sean suficientemente protectoras cuando la presión de infección no es muy elevada. Otros autores, sin embargo, opinan que las vacunas inactivadas no pueden proporcionar una inmunidad efectiva (Potgieter, 1995).

Martin *et al.* (1994) investigaron la protección cruzada inducida en terneros con diferentes cepas del VDVB. En el estudio incluyeron una cepa de cada uno de los cuatro serogrupos definidos por Bolin *et al.* (1988) (NADL, TGAN, C24V y Singer), una cepa patogénica del genotipo II y un aislado de campo NCP. Con cada uno de los virus, una vez inactivados, inmunizaron cuatro terneros aplicando dos dosis con tres semanas de intervalo. En el estudio se incluyeron además como controles un grupo de terneros no inmunizados, otro grupo inmunizado con una vacuna atenuada comercial (preparada con una cepa del genotipo I) y un grupo de terneros convalecientes a los que se había infectado experimentalmente con la cepa 890 del VDVB. A las dos semanas de la segunda vacunación todos los terneros se sometieron a una infección experimental con la cepa 890 del VDVB valorándose la respuesta clínica y hematológica. Asimismo, se midió la producción de Acs neutralizantes con todas las cepas. Los autores consideraron que se conseguía una respuesta protectora completa cuando, tras la infección experimental, se producía una mínima elevación de la temperatura y no se producía linfopenia. Únicamente los terneros vacunados con la cepa homóloga inactivada, los convalecientes y los inmunizados con la vacuna atenuada comercial estaban completamente protegidos frente a la infección. Además, tres de las cepas (C24V, NADL y Singer) indujeron una buena respuesta de Acs neutralizantes frente a cepas heterólogas pero no produjeron una protección total frente a la infección experimental. Los resultados de este estudio cuestionan la eficacia de las vacunas inactivadas, al menos para proteger frente al genotipo II del VDVB, e indican que la existencia de Acs neutralizantes en un animal puede no ser un indicador preciso de la inmunidad frente al virus, especialmente si los anticuerpos proceden de una inmunización con virus inactivado.

- Las vacunas inactivadas con frecuencia no previenen la infección fetal o sólo lo hacen durante un corto periodo. Así lo demuestran diferentes estudios

experimentales (McClurkin *et al.*, 1975; Roeder *et al.*, 1986; Harkness *et al.*, 1987b; Meyling *et al.*, 1987) y de campo (Bolin *et al.*, 1991). Recientemente se ha descrito una nueva vacuna inactivada que en un estudio experimental consiguió prevenir la infección fetal en 15 hembras gestantes infectadas con una cepa fetopatogena entre los días 25 y 75 de gestación (Brownlie *et al.*, 1995). Los resultados esperanzadores de este estudio, dado que se utilizaron pocos animales y una única cepa del VDVB para infectar los animales, deben tomarse con cautela.

- Las vacunas inactivadas son más caras que las atenuadas.

- La primovacunación exige dos dosis de vacuna administradas con un intervalo de 3 a 5 semanas. Esto hace que, en comparación con las atenuadas, se alargue el tiempo necesario para obtener una mínima protección, lo que supone una desventaja cuando se necesita obtener una rápida protección. Además, para mantener el nivel de protección debe revacunarse con una periodicidad no superior a un año y según algunos autores cada 5-6 meses (Bolin, 1995b), lo que, además de encarecer los programas de vacunación, puede suponer una complicación a la hora de manejar los animales.

- Aunque con estas vacunas no se produce enfermedad postvacunal a menos que la inactivación viral sea incompleta, en ocasiones pueden presentarse reacciones adversas tales como inflamación local en el punto de inoculación o reacciones anafilácticas. Además, en el vacuno lechero puede producirse un descenso transitorio de la producción láctea poco tiempo después de la vacunación (Bolin, 1995b).

Actualmente se intenta aumentar el poder inmunógeno de estas vacunas mediante la incorporación de nuevos adyuvantes que potencien la respuesta inmune inducida por este tipo de vacunas.

En la mayoría de las vacunas comerciales frente al VDVB, sean atenuadas o inactivadas, se incluyen también otros agentes infecciosos. En la actualidad en el mercado español se comercializan vacunas frente al VDVB monovalentes y, sobre todo, polivalentes. Estas últimas pueden ser bivalentes (VDVB y VRIB), trivalentes (VDVB, VRIB y VPI-3) o tetravalentes (VDVB, VRIB, VPI-3 y VRSB). En las vacunas atenuadas se usan principalmente cepas termo-sensibles del VDVB. Las vacunas polivalentes inactivadas combinan cepas tanto CP como NCP. En la tabla I.11 se resumen las características de estas vacunas y sus principales ventajas y desventajas.

**Tabla I.11.** Características de las vacunas atenuadas e inactivadas frente al VDVB con sus ventajas y desventajas.

	ATENUADAS	INACTIVADAS
CARACTERÍSTICAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Generalmente contienen una única cepa del biotipo CP</li> <li>. Se requiere una sólo dosis inicial</li> <li>. Una revacunación anual puede ser suficiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Muchas son bivalentes y contienen cepas CP y NCP</li> <li>. Incorporan diversos adyuvantes</li> <li>. La primovacuna requiere dos dosis con 2 a 4 semanas de intervalo</li> <li>. Debe revacunarse como mínimo cada 6 meses</li> </ul>
VENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Estimulan una respuesta inmune rápida</li> <li>. La inmunidad inducida es de larga duración</li> <li>. La inmunidad es efectiva frente a una gama más amplia de cepas</li> <li>. Son baratas de producir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Son muy seguras</li> <li>. Mínimo riesgo de enfermedad postvacunal</li> <li>. No producen inmunosupresión</li> <li>. Muy improbable la recombinación con otros ácidos nucleicos</li> </ul>
DESVENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Pueden producir enfermedad postvacunal incluida la EM</li> <li>. Los virus vacunales, a excepción de los termo-sensibles, pueden atravesar la placenta con las mismas consecuencias de la infección natural</li> <li>. Pueden ocasionar inmunosupresión transitoria</li> <li>. Pueden producirse fallos vacunales por almacenamiento o manejo inadecuado</li> <li>. Existe la posibilidad de que el ARN del virus recombine con ácidos nucleicos de otros virus o del animal vacunado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. La protección que confieren es poco duradera.</li> <li>. La inmunidad frente a cepas heterólogas puede ser inadecuada</li> <li>. Con frecuencia no previenen la infección fetal</li> <li>. Ocasionalmente pueden producirse reacciones adversas (inflamación local o reacciones anafilácticas)</li> <li>. Son más caras que las atenuadas</li> </ul>

### I.6.2.3. Recomendaciones de vacunación

Con la excepción de unos pocos países en los que la vacunación no está permitida, la utilización de vacunas frente al VDVB en la mayoría de los países ha ido aumentando a medida que se han ido conociendo con precisión las diferentes alteraciones asociadas con la infección. España no es ajena a este fenómeno general y puede decirse que, especialmente en la última década, el uso de vacunas frente al VDVB se ha extendido muchísimo, sobre todo en el ganado lechero y en los cebaderos de terneros.

Es preciso insistir en que el control de la infección en las explotaciones no debería basarse exclusivamente en un programa de vacunación, pues la experiencia demuestra que en este caso los avances en la lucha contra la infección pueden ser muy lentos, sobre todo si se utilizan vacunas inactivadas. Bolin *et al.* (1991) detectaron 2 animales PI de 2 y 3 años de edad en una explotación que llevaba 7 años realizando un programa de inmunización con una vacuna inactivada (cepa Singer). El programa consistía en realizar una primovacuna de los terneros con dos dosis de vacuna a las 4 semanas del destete, aplicar una dosis única 2 a 3 semanas antes de la primera cubrición y posteriormente revacunación anual antes de la cubrición. Dado que ni la madre de uno de los animales PI ni los hermanos del otro estaban PI, los autores consideraron que los dos animales PI nacieron como consecuencia de una infección transplacentaria durante una infección aguda transitoria de sus madres. Esto indicaría que el programa de vacunación utilizado no consiguió prevenir la circulación del virus en la explotación ni, por supuesto, la infección fetal.

De lo expuesto en el apartado dedicado a las vacunas puede deducirse que no existe un programa de vacunación estándar aceptado con carácter general. La idea general mas bien es que los programas de vacunación deben adaptarse a las circunstancias particulares de cada explotación. En este sentido, nos limitaremos a hacer algunas consideraciones generales que deben tenerse presentes a la hora de decidir el programa de vacunación. El veterinario responsable de diseñar un programa particular de vacunación deberá tener en cuenta las siguientes cuestiones:

- El tipo de explotación al que se destina. En la situación española podemos considerar, en general, tres grandes grupos de explotaciones: intensivas de leche, extensivas de carne y cebaderos de terneros.
- El manejo de los animales en la explotación.
- La situación epidemiológica de la explotación con respecto al VDVB, si se conoce, o al menos si ha habido o no brotes clínicos (diagnosticados o presuntivos) asociados con el VDVB.
- La edad de los animales a vacunar. En los terneros habrá que considerar la posible interferencia con los anticuerpos maternos.
- Si existen o no animales gestantes en el grupo a vacunar.
- El historial de vacunaciones previas frente al VDVB en la explotación, esto es, si es o no la primera vez que se instaura un programa de vacunación.

Las consideraciones anteriores deberían condicionar el tipo de vacuna a emplear (atenuada, inactivada o ambas) y su frecuencia. No obstante, la experiencia previa del veterinario con las vacunas y sus propias preferencias suelen pesar en gran medida en esta decisión.

Con independencia de que la vacuna seleccionada sea atenuada o inactivada, y muy especialmente en este segundo caso, debe optarse preferentemente por las vacunas que

combinan dos o más cepas del VDVB (citopáticos o no) en detrimento de las que sólo importaron una. El creciente reconocimiento de la diversidad antigénica existente entre los aislados del VDVB ha llevado a algunos veterinarios en los últimos años a modificar los programas de vacunación aumentando la frecuencia de las vacunaciones (con lo que se pretende mantener constantemente niveles altos de Acs) y recurriendo a la rotación de vacunas elaboradas por diferentes casas comerciales (con lo que se amplía la gama de cepas vacunales y, consiguientemente, se reduce el riesgo de infección de los animales vacunados con cepas heterólogas) (Bolin, 1995b). En definitiva estas modificaciones persiguen proporcionar una protección más amplia y de más larga duración.

Según Hjerpe (Hjerpe, 1990) la preocupación sobre la seguridad de las vacunas atenuadas con frecuencia se ha exagerado. Este autor considera que, cuando están claramente indicadas, no debería dudarse en su administración.

En los terneros los Acs calostrales pueden interferir con la vacunación. En teoría, por lo tanto, la edad para iniciar la vacunación de los terneros debería depender de su tasa de Acs calostrales, si bien en condiciones de campo no es fácil ni práctico hacer diferenciaciones. Cuando se tiene la certeza de que los terneros carecen de Acs calostrales por nacer de hembras seronegativas pueden vacunarse por primera vez a las 2-4 semanas de vida y después revacunar con la frecuencia apropiada de acuerdo con el tipo de vacuna empleada. En los terneros que nacen de hembras seropositivas (por infección o vacunación) los Acs calostrales persisten más o menos tiempo, generalmente entre 2 y 8 meses, en función del título inicial de Acs, que a su vez depende del título de Acs de la madre y de la cantidad de calostro ingerido durante las primeras 36 horas de vida. Se ha comprobado que la inmunización de terneros con vacuna atenuada no se inhibe cuando el título de Acs neutralizantes del ternero es 1:32 o inferior (Brar *et al.*, 1978; Menanteau-Horta *et al.*, 1985). Teniendo en cuenta la vida media de los Acs calostrales y su probable título inicial, se considera que la inmunización debe tener éxito en la mayoría de los terneros que tengan 4 a 6 meses de edad (Schultz, 1993). Los fabricantes de vacunas frecuentemente recomiendan comenzar a vacunar a los terneros a los 3 meses. Si se hace esto deberá tenerse en cuenta que la inmunización puede fallar en un buen número de terneros, especialmente en los nacidos de madres con títulos altos de Acs y que tomen calostro normalmente. Para solventar este problema se recomienda revacunar a los terneros a los 7-8 meses de edad si se utiliza vacuna atenuada y con más frecuencia si se usa inactivada.

La inmunización efectiva de las hembras reproductoras debe ser un objetivo prioritario de los programas de vacunación. Las novillas de reposición, independientemente de las inmunizaciones que hayan recibido desde el inicio a los 3-6 meses del programa de vacunación, deben revacunarse un mes antes de la primera cubrición. Posteriormente si se usa vacuna atenuada puede ser suficiente una revacunación anual antes de la cubrición. Si se utiliza vacuna inactivada lo recomendable es revacunar como mínimo cada 6 meses (hay quien utiliza hasta 3 ó 4 revacunaciones anuales, Bolin, 1995b), pues la revacunación anual, como a veces se recomienda, no será suficiente en muchos casos para alcanzar una protección adecuada.

El uso de vacunas atenuadas en las explotaciones extensivas minimiza el manejo de los animales, lo que en muchas ocasiones supone una ventaja decisiva.

Algunas pautas de inmunización recomiendan vacunar o revacunar a las hembras durante el tercer trimestre de la gestación para reforzar la inmunidad de los terneros (las vacunas atenuadas ya no tendrían efectos adversos sobre el feto). Cuando se usan vacunas atenuadas no parece que esta práctica sea necesaria.

Cuando se vacuna por primera vez una explotación pueden emplearse vacunas atenuadas en las hembras vacías y vacunas inactivadas o atenuadas termo-sensibles en las preñadas.

Mucho más complejo resulta elaborar un programa apropiado de vacunación en los cebaderos de terneros. El control de la infección por el VDVB en estas explotaciones, por su propia naturaleza, es un problema completamente distinto al caso de las explotaciones lecheras y de carne, y la vacunación es prácticamente la única medida de prevención que cabe aplicar. En muchas ocasiones el interés preferente que existe en los cebaderos de terneros por inmunizar frente a las infecciones respiratorias víricas, para lo cual se recurre con mucha frecuencia al uso de vacunas polivalentes (en las que también se incluye el VDVB), condiciona los programas de vacunación frente al VDVB.

En teoría los programas de vacunación de los cebaderos deberían adaptarse en función de la edad a la que los animales entran en la explotación, del tiempo de permanencia y de su inmunidad pasiva. No obstante, dada la diversa procedencia de los terneros que se incorporan a los cebaderos, con frecuencia no se tiene una idea clara del estado inmune de los animales y lo más normal es que varíe mucho de unos animales a otros. Si los animales entran en los cebaderos con más de 3 meses de edad lo ideal sería que el programa de vacunación se hubiera iniciado en la explotación de origen.

Por otra parte, dada la situación epidemiológica de la infección por el VDVB en España, el riesgo de que los animales en los cebaderos entren en contacto con el virus, a través de algún animal PI o de algún animal que sufra la infección aguda, es muy alto. Si la experiencia del cebadero demuestra que la exposición al virus es prácticamente segura, convendría que los animales estuvieran inmunizados lo antes posible, para lo cual se ha recomendado vacunar a los terneros a la llegada al cebadero con una vacuna atenuada (Hjerpe, 1990). No obstante, hay que tener en cuenta que los terneros han estado y seguirán estando sometidos a un gran estrés, lo que hace que no sean candidatos ideales para el empleo de vacunas atenuadas.

Se ha sugerido que cuando la vacunación frente a otros agentes infecciosos coincide con una infección con el VDVB, esta infección puede disminuir la eficacia de las vacunas. Esto puede tener especial importancia en los cebaderos de terneros en relación con el uso de vacunas frente a las infecciones respiratorias víricas. Edwards, (1996b) inmunizó terneros con una vacuna frente al VRIB dos días después de haberlos infectado por vía intranasal con el VDVB. La infección experimental posterior de los terneros con un aislado virulento del VRIB indicó que el grado de protección frente a la enfermedad clínica fue similar al de los terneros controles (vacunados frente al VRIB pero no infectados con el VDVB). Sin embargo, los terneros infectados dos días antes con el VDVB eliminaron por la secreción nasal 140 veces más el VRIB que los controles, lo que sugiere que la

infección previa con el VDVB tuvo algún efecto modulador sobre la inmunidad inducida por la vacuna.

Los programas de vacunación diseñados adecuadamente tendrán éxito si se incluye a todo el efectivo de la explotación y si se es constante en su aplicación.

#### I.6.2.4. Vacunas del futuro

El reciente reconocimiento de dos genotipos dentro de los aislados del VDVB, ha motivado la inquietud de si las vacunas comerciales actuales, que contienen sólo el genotipo I, protegen o no frente al genotipo II. La cuestión no está todavía clara. Se ha argumentado que sí protegen puesto que los brotes de enfermedad aguda grave asociados con el genotipo II se han producido en explotaciones vacunadas inadecuadamente pero no en las vacunadas correctamente (Cortese, 1994). Además, los resultados de un estudio reciente indican que terneros a los que se administró una vacuna atenuada comercial preparada con una cepa del genotipo I desarrollaron una respuesta inmune protectora frente a una inoculación experimental posterior con una cepa del genotipo II (Martin *et al.*, 1994). Sin embargo, para otros autores, que admiten que las vacunas comerciales disponibles pueden proporcionar alguna protección cruzada frente a los aislados del genotipo II, una cuestión todavía sin aclarar es si estas vacunas también son capaces de prevenir la viremia y la infección transplacentaria. El genotipo II del VDVB se ha aislado de terneros nacidos de madres vacunadas (Ridpath *et al.*, 1994), lo que indicaría que la protección cruzada no fue suficiente para prevenir la infección transplacentaria. Teniendo en cuenta que se ha encontrado que la reactividad serológica cruzada entre los genotipos I y II es relativamente baja, cada vez son más los investigadores que abogan porque las futuras vacunas incluyan también cepas del genotipo II (Pellerin *et al.*, 1994).

Los avances en biotecnología y en la formulación de vacunas posiblemente den lugar en un futuro cercano a una nueva generación de vacunas frente al VDVB y otros pestivirus. En diferentes artículos se ha descrito el uso de nuevos enfoques para la inmunización frente al VDVB. Un ejemplo es el uso de complejos inmunoestimulantes (ISCOMs). Estos ISCOMs son mezclas de colesterol, saponina y proteína. Se han usado proteínas parcialmente purificadas del VDVB para preparar ISCOMs que son capaces de estimular la producción de títulos elevados de anticuerpos neutralizantes cuando se inoculan en bóvidos y óvidos (Carlsson *et al.*, 1991; Kamstrup *et al.*, 1992). Otro nuevo enfoque es el uso de anticuerpos antiidiotípicos para la inmunización (Xue *et al.*, 1991; Onisk *et al.*, 1992). Un anticuerpo antiidiotípico actúa como una réplica del antígeno y sirve como vacuna. Finalmente, se ha usado la tecnología del ADN recombinante para incorporar secuencias del genoma del VPPC tanto en el virus vacuna como en el virus de la enfermedad de Aujeszky (Rümenapf *et al.*, 1991; Van Zijl *et al.*, 1991). Estos virus recombinantes se han utilizado para inmunizar cerdos, que resultaron protegidos frente a la infección experimental con aislado virulento del VPPC.



## II. OBJETIVOS

---

La amplia difusión del virus de la Diarrea Vírica Bovina (VDVB) en las poblaciones bovinas de prácticamente todos los países con una producción bovina importante (incluido España), las diferentes, y en ocasiones complejas, manifestaciones clínicas que puede producir y su importante repercusión económica sobre la producción justifican el que la Diarrea Vírica Bovina (DVB) se considere una de las principales enfermedades infecciosas de los bóvidos a escala mundial.

El VDVB da lugar a importantes pérdidas económicas en la mayoría de los países incluido España. Las pérdidas directas derivan fundamentalmente de las menores tasas de concepción, de los abortos, de la mortalidad perinatal y de la mortalidad de los animales que sufren la Enfermedad de las Mucosas (EM). A esto habría que añadir otras pérdidas asociadas a la infección producida por este virus como son la disminución de la producción de los animales que sufren la DVB, las menores producciones en las explotaciones lecheras derivadas de los problemas reproductivos, la pérdida del valor genético de la cabaña como consecuencia de las muertes de animales jóvenes, el aumento de los costes de reposición, etc. Asimismo, hay que tener en cuenta que en un estudio longitudinal realizado recientemente la infección subclínica se ha asociado con una disminución de la producción de leche (Moermann *et al.* 1994).

Por otra parte, en los costes ocasionados por el VDVB hay que incluir los destinados al diagnóstico y muy especialmente, dada su cuantía, los destinados al control de la infección.

Para conseguir una reducción en la repercusión económica y sanitaria producida por el VDVB es necesario conocer, entre otros factores, las características antigénicas de este virus. Así, el conocimiento de los tipos antigénicos del VDVB presentes en un país es importante para el desarrollo de vacunas eficaces dado que si las diferencias antigénicas entre las cepas de campo y las cepas vacunales son importantes la vacunación no será eficaz.

Al mismo tiempo, ese conocimiento de los tipos antigénicos permitirá el desarrollo de

anticuerpos monoclonales (AcMos), en particular aquellos dirigidos contra la proteína p80/NS3, para ser usados en las pruebas de diagnóstico. El disponer de pruebas de diagnóstico suficientemente sensibles y razonablemente específicas es fundamental para llevar a cabo los programas de control.

Por último, y no menos importante, la identificación de los distintos tipos antigénicos es importante para la obtención de anticuerpos (Acs) específicos útiles para los estudios epidemiológicos del VDVB.

Por todo ello, un objetivo de este trabajo fue la caracterización de diversos aislados de campo del VDVB en bovinos en nuestro país. Para ello, hemos utilizado un amplio panel de AcMos frente a estos aislados. Estos AcMos están dirigidos frente a una de las siguientes proteínas víricas: 1) gp48/E0: proteína de la envoltura altamente conservada entre los aislados del VDVB, 2) gp53/E2: proteína de la envoltura que induce la aparición de Acs neutralizantes y 3) p80/I25: proteína no estructural altamente conservada entre los pestivirus y que además permite diferenciar entre los aislados no citopáticos (NCP) y citopáticos (CP) del VDVB. Los resultados obtenidos los analizamos con dos paquetes informáticos, uno de los cuales permite establecer las relaciones filogenéticas (PHYMLIP) mientras que el otro indica la distancia antigénica entre las distintas cepas (MAP).

Asimismo, comparamos estos resultados con los obtenidos previamente en el "Central Veterinary Laboratory" (CVL) de Weybridge (Inglaterra) usando el mismo panel de AcMos frente a aislados de campo del VDVB y distintas cepas de referencia de otros pestivirus. Con esta comparación pretendimos conocer si los aislados españoles están antigénicamente relacionados con las cepas de referencia del VDBV y si forman un grupo aparte de la mayoría de los aislados ingleses y de otros países. Además, investigamos si los aislados procedentes de distintas áreas españolas pueden o no formar linajes geográficos diferentes del resto de los aislados de otros países y cepas de referencia del VDVB.

El control de una enfermedad en el ganado se dirige generalmente a la actuación sobre el rebaño en el marco de un área geográfica determinada. Para ello, es de suma importancia el conocimiento de la prevalencia de la infección y de los factores de riesgo que contribuyen a la transmisión de la enfermedad, y la definición de una política de intervención para eliminar, o al menos reducir, la infección existente y/o reducir la transmisión.

En los últimos años en la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) el sector ganadero en general se ha visto desplazado por el incremento de los sectores industrial y de servicios, así como por la creciente urbanización, lo que ha supuesto para este sector ganadero una importante pérdida de peso específico. Sin embargo, tanto la Unión Europea (UE) como la propia CAM quieren conseguir que la agricultura sirva de soporte para conseguir la conservación de los recursos naturales y la preservación de los hábitats. Por tanto, es importante para esta Comunidad Autónoma la erradicación o en su defecto el control de las principales enfermedades infecciosas, entre ellas la DVB, que afectan a la ganadería.

En la CAM no se han realizado estudios previos sobre la prevalencia y factores de riesgo de la infección producida por el VDVB. Por ello, otro objetivo de nuestra tesis ha sido el estudio de la prevalencia de Acs frente al VDVB en los rebaños bovinos de la CAM y el estudio de los posibles factores de riesgo que condicionan la transmisión de la infección.

La detección de Acs frente al VDVB la realizamos mediante una prueba ELISA de bloqueo comercial en la cual las placas están tapizadas con una proteína común (p80/120) a todas las cepas del VDVB. Dentro de los posibles factores de riesgo que condicionan la transmisión de la infección analizamos la zona geográfica, la aptitud y el tamaño de la explotación. Para el estudio de la zona geográfica dividimos el territorio de la CAM en 4 áreas geográficas teniendo en cuenta, además de consideraciones geográficas, el censo de vacuno en esas comarcas. Con respecto a la aptitud, separamos la población en 3 grupos: vacuno de leche, vacuno de carne y vacuno de cebo. Por último, dentro del tamaño de la explotación establecimos únicamente 2 tipos de explotaciones: con más de 100 animales y con menos de 100 animales.

Los resultados de este estudio permitirán aproximarnos a la cuantificación de las pérdidas económicas producidas por la DVB, las cuales serán las que marquen el interés del establecimiento de medidas de control de esta enfermedad.



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

---

#### **III.A.1. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES DE AISLADOS ESPAÑOLES DEL VDVB**

En este capítulo se describe material y métodos utilizados para la caracterización antigénica de diferentes aislados españoles del Virus de la Diarrea Vírica Bovina (VDVB).

##### **III.A.1.1. Cultivos Celulares**

###### **III.A.1.1.1. Líneas celulares**

Para el cultivo de todas las cepas del VDVB estudiadas se utilizaron las líneas celulares estables BT de cornetes bovinos y MDBK de riñón bovino.

La línea celular BT fue proporcionada por el "Central Veterinary Laboratory" (CVL) de Weybridge, que a su vez la obtuvo originalmente de la "American Type Culture Collection" (ATCC), Ames, Iowa, Estados Unidos, y la línea celular MDBK usada fue proporcionada por el Laboratorio de Sanidad Animal de Barcelona.

###### **III.A.1.1.2. Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares BT y MDBK**

Las líneas celulares BT y MDBK se utilizaron para la replicación del VDVB y se mantuvieron mediante pases seriados en frascos tipo "Falcon" (Falcon, Becton Dickinson & Co) de 25, 75 y 150 cm<sup>2</sup> de superficie para cultivos celulares, empleando como medio de crecimiento el "Minimal Essential Medium" (MEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB).

Como medio de cultivo se utilizó el siguiente medio sintético, según las recomendaciones del fabricante: "Minimal Essential Medium" - MEM - (10x),

(Gibco/BRL), con sales de Earles, L-glutamina 2mM y sin NaHCO<sub>3</sub>.

Para su preparación, los 9,5 gr de MEM se disolvieron en 1000 ml de agua destilada y desionizada (dde) (agua Milli - RO PLUS 30, Millipore), bajo agitación constante añadiéndose a continuación el NaHCO<sub>3</sub>, el hidrolizado de lacto-albúmina y el piruvato sódico en las cantidades indicadas.

La composición de la solución concentrada se detalla a continuación:

- NaHCO <sub>3</sub> al 7,5% (Imperial).....	25,0	ml
- Hidrolizado de lacto-albúmina al 5% (Gibco).....	10,0	ml
- Piruvato sódico 0,1 M (Gibco).....	10,0	ml
- MEM (10x) concentrado.....	9,5	gr
- Agua destilada y desionizada (dde).....	1000	ml

Se ajustó el pH a 7,2 - 7,4 con HCl 1N, se filtró con un filtro de 0,22 μ (Polydisc<sup>TM</sup> AS, Whatman International Ltd.), y se sometió a las pruebas de esterilidad en medios sólidos (agar sangre, Difco) y líquidos (caldo tioglicolato, Difco), en estufa a 37°C durante 48-72 horas. Después de este tiempo se añadieron 5 ml de la solución antibiótica-antimicótica para conseguir una concentración final de:

- Penicilina G.....	100	Unidades Internacionales/ml
- Estreptomicina.....	100	μg/ml
- Micostatina.....	25	Unidades Internacionales/ml

El medio de cultivo así preparado se mantuvo en nevera a +4°C.

Los pases sucesivos para el mantenimiento de las líneas celulares BT y MDBK se realizaron tripsinizando el tapiz celular de 4-5 días de desarrollo con tripsina-versene, empleando una solución que contenía:

- Solución A:

- NaCl.....	160,0	gr
- KCl.....	8,0	gr
- Agua dde.....	1000	ml

Se disolvió en agitación magnética constante y, posteriormente, la solución se fraccionó en alícuotas de 200 ml para congelar a -20°C.

- Solución B:

- Glucosa.....	20,0	gr
- NaHPO <sub>4</sub> (12 H <sub>2</sub> O).....	2,4	gr
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,2	gr
- Rojo fenol 0,2% (Imperial).....	20,0	ml
- Agua dde.....	1000	ml

Se disolvió en agitación magnética y después se repartió en frascos de 200 ml para congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La solución final de tripsina-versene se preparó, mezclando 200 ml de la solución A (sin  $\text{Ca}^{++}$  ni  $\text{Mg}^{++}$ ) y 200 ml de la solución B en 3600 ml de agua dde en constante agitación, añadiéndose a continuación:

- Tripsina 1:250 (Gibco).....	10,0	gr
- $\text{NaHCO}_3$ .....	5,6	gr
- EDTA (Sigma).....	1,1	gr

La mezcla se mantuvo en agitación magnética durante 3 horas, ajustándose el pH con  $\text{NaOH}$  1N, y esterilizándose por filtración con un filtro de  $0,22\ \mu\text{m}$ . Después de las pruebas de esterilidad en caldo tioglicolato y agar sangre, se añadió la solución antibiótica-antimicótica en una cantidad de 10 ml por cada litro y se almacenó para su uso a  $+4^{\circ}\text{C}$ .

Para tripsinizar el tapiz celular se retiró el medio de cultivo y se lavó dos veces con la solución de tripsina-versene (20 ml) precalentada a  $37^{\circ}\text{C}$ . Un tercer volumen de tripsina-versene se añadió en suficiente cantidad (1-2 ml) para cubrir las células y se llevó a la estufa de  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Cuando el tapiz comenzaba a desprenderse se añadieron 10 ml de medio de cultivo (MEM) con un 10% de suero fetal bovino (SFB).

Las células se disgregaron pipeteando sucesivas veces. Se comprobó que las células se habían desprendido y flotaban y se añadió la cantidad de medio de crecimiento necesaria para subcultivar en una relación 1:2. La concentración celular del inóculo se ajustó a una concentración aproximada de 100000 células/ml.

### **III.A.1.1.3. Conservación de líneas celulares por congelación**

A partir de un tapiz celular formado se tripsinizó y las células desprendidas se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. El sedimento celular se resuspendió en el medio de congelación consistente en MEM con SFB al 10% y un 10% de dimetilsulfóxido - DMSO - (Sigma), esterilizado por autoclavado a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. La concentración celular se ajustó a  $3 \times 10^7$  células/ml. La suspensión celular en el medio de congelación se repartió en volúmenes de 1 ml en crioviales de plástico de 1,5 ml y tapón de rosca (DeltaLab) sin que se formara espuma. Los viales así preparados se introdujeron en un contenedor apropiado para congelación (por ejemplo una caja de poliestireno) y se mantuvieron 24 horas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente se introdujeron en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Este proceso de congelación gradual evita la formación de cristales en el citoplasma de las células.

### **III.A.1.1.4. Descongelación de líneas celulares**

Siempre que fue necesario se descongelaron las líneas celulares. La descongelación se llevó a cabo poniendo los viales rápidamente en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$ . A continuación se resuspendieron las células en 10 ml de medio de crecimiento (MEM) con 10% de SFB en "Falcon" de 25 cm de superficie. Pasadas 24 horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera con un 5% de  $\text{CO}_2$ , y una vez que las células estaban adheridas, se

renovó el medio de cultivo para eliminar los residuos de dimetilsulfóxido, tóxico para las células. La viabilidad de las células recién descongeladas fue del 50 al 80%. Esta se determinó diluyendo las células 1:1 en una solución de azul tripano (0,2 % en solución salina fosfato -PBS-, pH 7,6). Las células muertas aparecían teñidas de azul al microscopio invertido.

La solución salina fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,6 se preparó como se indica a continuación:

- NaCl.....	8,5	gr
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2H <sub>2</sub> O).....	1,55	gr
- NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2H <sub>2</sub> O).....	0,203	gr
- Agua dde.....	1000	ml

Esta solución se autoclavó a 120 °C durante 20 minutos y se almacenó a + 4°C.

### **III.A.1.2. Producción y titulación de los inóculos víricos del VDVB**

#### **III.A.1.2.1. Virus de referencia utilizados**

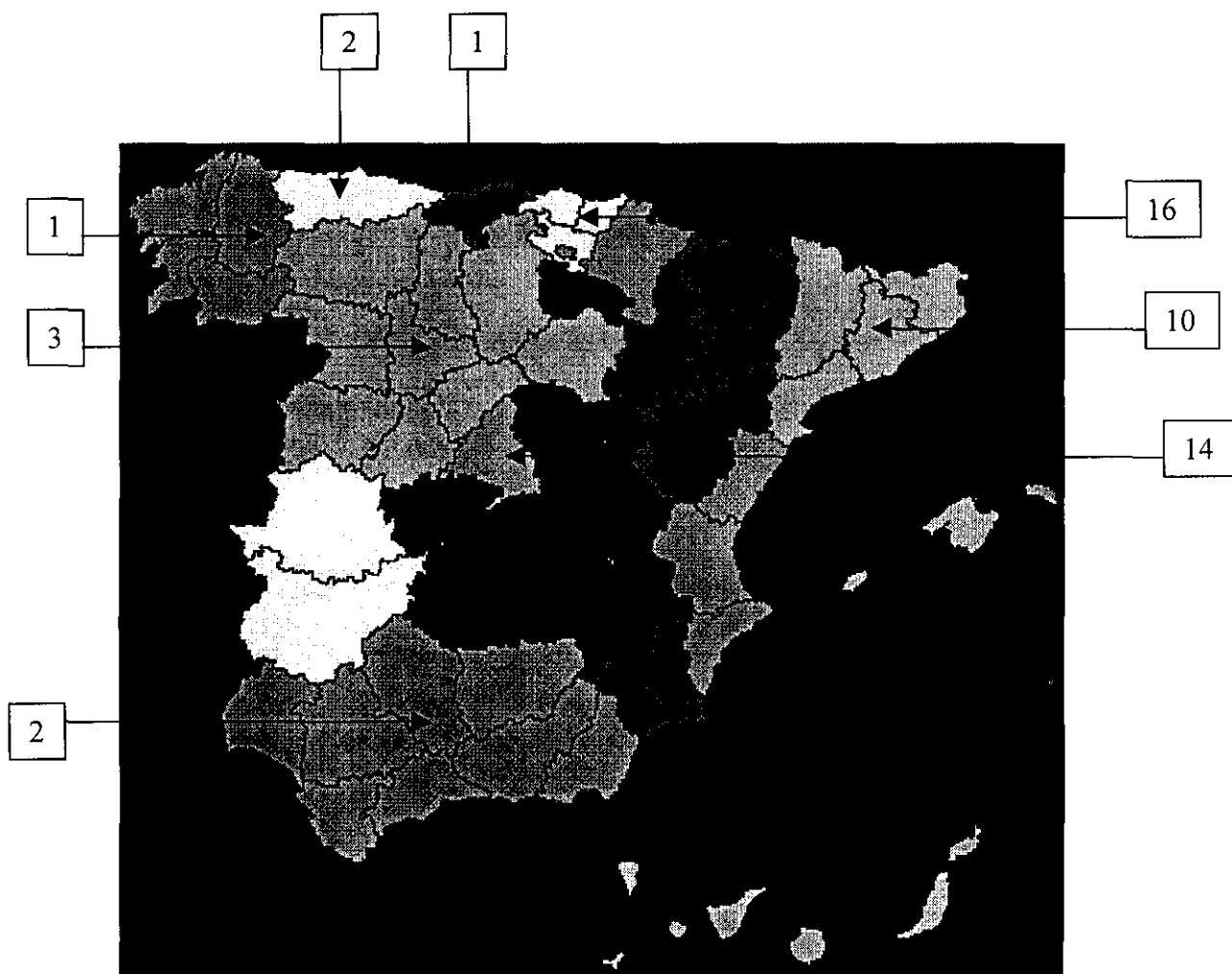
Los pestivirus de referencia que se enfrentaron al panel de anticuerpos monoclonales se encuadran en cuatro grandes grupos: 1) Virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC), 2) Virus de la Diarrea Vírica Bovina (VDVB), 3) Virus de la Enfermedad de Border (VEB), y 4) Virus Atípicos (Paton *et al.*, 1995). Asimismo, se incluyeron los aislados Giraffe y Deer que, aunque parecen ligeramente diferentes de los VDVB, aun no puede establecerse si constituyen o no un grupo aparte. El VPPC al presentarse sólo en cerdos puede suprimirse en una caracterización antigénica de aislados de rumiantes. La mayoría de las cepas de referencia de ganado vacuno son similares antigénicamente al VDVB, existiendo unos pocos que son atípicos. Los aislados británicos procedentes de ovejas son similares al VDVB o a virus Atípicos o similares al VEB. Las cepas de referencia utilizadas fueron las siguientes:

- Cepas de VDVB de ganado vacuno: NADL (Gutekunst y Malmquist, 1963), C24V (Gillespie *et al.*, 1960), Osloss (Hafez *et al.*, 1976), 1138 (Hafez *et al.*, 1976), A1050, 150022, 168485, 156672, 153735, 144800, 154540, 154985, 178003, 162903, 172984, 173481, 179725 y 116962 (Paton *et al.*, 1995).
- Cepa de VDVB aislado de ovejas: Weybridge (Harkness *et al.*, 1977).
- Cepas de VEB: Moredun (Vantsis *et al.*, 1976) y S137 (Paton *et al.*, 1995).
- Cepas Atípicas: Vosges (porcino) (Wensvoort y Terpstra, 1988), 166312 (bovino) (Paton *et al.*, 1995).
- Cepas sin clasificar: Giraffe (Plowright, 1969), Deer (Paton *et al.*, 1995), 144584 (Paton *et al.*, 1995).

### III.A.1.2.2. Aislados españoles del VDVB

Las cepas del VDVB investigadas se aislaron en distintos laboratorios españoles a partir de diversas muestras de tejidos bovinos. La descripción de los 49 aislados españoles estudiados junto con algunas de sus características se muestran en la tabla III.A.1. El origen geográfico de los virus aparece reflejado en la figura 6.

Figura 6. Origen geográfico de los aislados españoles del VDVB.



Las cepas 1/89, 2/90, 3/90, 5/91, 6/91, 7/91, 8/91, 9/91, 10/92, 11/93, 12/93, 13/93, 15/93, 16/93, 17/94, 19/94, 20/94, 21/94, 22/94, 23/94, 25/94, 26/94, 31/94, 32/94, 33/95, 34/95, 35/95, 37/95, 38/95, 39/95, 41/95, 42/95, 43/95, 45/95, 46/95, 47/95, 15/93 fueron aisladas por la Dra. Rosa Rosell (Laboratorio de Sanidad Animal de Barcelona), las cepas León1, León2 y León3 fueron aisladas por el Dr. Marcelino Álvarez (Facultad de Veterinaria de León), la cepa RIBO fue aislada por el Dr. Juan Plana Durán (Cyanamid-Sobrino). Las cepas 14, 3002, 8SV, 9SV, 13SV, 14SV, 16SV y E1494/92 fueron aisladas por nosotros. La cepa E1494/92 también se aisló por nosotros a partir de una muestra de intestino enviada por el Dr. G. Aduriz (SIMA, Derio, Vizcaya).

### III.A.1.2.3. Preparación de las muestras para el aislamiento del VDVB

Las muestras para el aislamiento vírico (tejidos o suero) se procesaron a su llegada al laboratorio o después de haberlas mantenido almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Los tejidos (pulmón, bazo, hígado, riñón, intestino, ganglios linfáticos) y coágulos de sangre se homogeneizaron por trituración con arena de mar estéril (Panreac) en un homogeneizador de Griffith o de Potter. Posteriormente se añadieron aproximadamente 10 ml de PBS 0,01 M, pH 7,2 enriquecido con una suspensión de antibióticos (10x) por gramo de muestra.

La solución PBS 0,01M, pH 7,2 se preparó como se indica a continuación:

- NaCl.....	8,5	gr
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 (2\text{H}_2\text{O})$ .....	1,37	gr
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 (2\text{H}_2\text{O})$ .....	0,36	gr
- Agua dde.....	1000	ml

Este tampón se autoclavó a  $120^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos y se almacenó a  $+4^{\circ}\text{C}$ .

El sobrenadante se dejó expuesto a la acción de los antibióticos durante 1 hora a temperatura ambiente antes de proceder como en los demás casos.

Una vez homogeneizado el tejido se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se pasó por un filtro de  $0,45\ \mu$  para esterilizarlo o se utilizó directamente como muestra a analizar.

Tabla III.A.1 Aislados españoles del VDVB utilizados en este estudio.

Identificación	Año de aislamiento	Comentarios
1/89	1989	Cepa NCP aislada de un riñón de feto bovino. Comunidad Autónoma de Cataluña
2/90	1990	Cepa NCP aislada de un riñón de feto bovino. Comunidad Autónoma de Cataluña
3/90	1990	Cepa NCP aislada de un riñón de feto bovino. Comunidad Autónoma de Cataluña
5/91	1991	Cepa NCP aislada de leucocitos. Comunidad Autónoma de Madrid
6/91	1991	Cepa NCP aislada de leucocitos. Comunidad Autónoma de Madrid
7/91	1991	Cepa NCP aislada de leucocitos. Comunidad Autónoma de Madrid
8/91	1991	Cepa NCP aislada de leucocitos. Comunidad Autónoma de Madrid
9/91	1991	Cepa NCP aislada de leucocitos de una novilla de 3 meses. Madre positiva al VDVB. Comunidad Autónoma de Madrid
10/92	1992	Cepa NCP aislada de leucocitos de un semental que no presentaba sintomatología clínica. Comunidad Autónoma del País Vasco
11/93	1993	Cepa NCP aislada de leucocitos de un ternero de 15 meses. El animal presentaba retraso en el crecimiento. Comunidad Autónoma de Madrid
12/93	1993	Cepa NCP. Comunidad Autónoma del País Vasco
13/93	1993	Cepa NCP aislada de leucocitos de un ternero de 14 meses. El animal presentaba retraso en el crecimiento. Comunidad Autónoma de Madrid
15/93	1993	Cepa NCP aislada de leucocitos de un ternero. La granja presentaba problemas de abortos y retraso en el crecimiento. Comunidad Autónoma de Cataluña (Girona)
16/93	1993	Cepa NCP. Comunidad Autónoma del País Vasco
17/94	1994	Cepa NCP aislada de una línea celular establecida (GBK). Comunidad Autónoma de Madrid
19/94	1994	Cepa NCP aislada de leucocitos de un ternero. Comunidad Autónoma de Cataluña (Girona)
20/94	1994	Cepa NCP aislada de leucocitos. Comunidad Autónoma de Galicia (Lugo)

(Continuación)

Identificación	Año de aislamiento	Comentarios
21/94	1994	Cepa NCP aislada de leucocitos. Comunidad Autónoma de Castilla y León (Salamanca)
22/94	1994	Cepa NCP aislada de leucocitos. Comunidad Autónoma de Castilla y León (Salamanca)
23/94	1994	Cepa NCP aislada de leucocitos. Comunidad Autónoma de Castilla y León (Salamanca)
24/94	1994	Cepa NCP aislada de leucocitos de un semental. Comunidad Autónoma del País Vasco (Derio)
25/94	1994	Cepa NCP aislada de leucocitos de un semental. Comunidad Autónoma del País Vasco (Derio)
26/94	1994	Cepa NCP aislada de leucocitos de un semental sangrado dos meses antes (25/94)
31/94	1994	Cepa NCP aislada de leucocitos de un ternero. Comunidad Autónoma de Cataluña (Girona)
32/94	1994	Cepa NCP aislada de leucocitos de un ternero. Comunidad Autónoma de Cataluña (Girona)
33/95	1995	Cepa NCP aislada de leucocitos de un semental. Comunidad Autónoma del País Vasco (Derio)
34/95	1995	Cepa NCP aislada de leucocitos de un semental. Comunidad Autónoma del País Vasco (Derio)
35/95	1995	Cepa NCP aislada de leucocitos de un semental. Comunidad Autónoma del País Vasco (Derio)
37/95	1995	Cepa NCP aislada de leucocitos de un semental. Comunidad Autónoma del País Vasco (Derio)
38/95	1995	Cepa NCP aislada de leucocitos de un semental. Comunidad Autónoma del País Vasco (Derio)
39/95	1995	Cepa NCP aislada de leucocitos de un semental. Comunidad Autónoma del País Vasco (Derio)
41/95	1995	Cepa NCP. Comunidad Autónoma de Madrid
42/95	1995	Cepa NCP aislada de vísceras de un buey adulto. Comunidad Autónoma del País Vasco (Derio)
43/95	1995	Cepa NCP aislada de leucocitos de un semental. Comunidad Autónoma del País Vasco (Derio)

(Continuación)

Identificación	Año de aislamiento	Comentarios
45/95	1995	Cepa NCP aislada de leucocitos de un semental. Comunidad Autónoma del País Vasco (Derio)
46/95	1995	Cepa NCP aislada de leucocitos de un ternero de 13 meses. Comunidad Autónoma de Cataluña (Girona)
47/95	1995	Cepa NCP aislada de un toro. Comunidad Autónoma de Cataluña (Girona)
E1494/92	1992	Cepa CP aislada de intestino. Comunidad Autónoma del País Vasco
14	?	Cepa NCP aislada de una línea celular establecida (GBK). Comunidad Autónoma de Madrid.
3002	1996	Cepa NCP. Comunidad Autónoma de Madrid
8SV	1996	Cepa NCP. Comunidad Autónoma de Madrid
9SV	1996	Cepa NCP. Comunidad Autónoma de Andalucía (Córdoba)
13SV	1996	Cepa NCP. Comunidad Autónoma de Andalucía (Córdoba)
14SV	1996	Cepa NCP. Comunidad Autónoma de Madrid
16SV	1996	Cepa NCP. Comunidad Autónoma de Madrid
León1	1989	Cepa CP aislada de un caso clínico de la enfermedad de las mucosas. Comunidad Autónoma de Asturias
León2	?	Cepa CP aislada de un animal persistentemente infectado. Comunidad Autónoma de Asturias
León3	?	Cepa NCP aislada de un animal persistentemente infectado. Comunidad Autónoma de Cantabria
RIBO	1986	Cepa CP aislada de un ternero. Otros animales de la granja presentaban síntomas clínicos. Comunidad Autónoma de Cataluña (Lleida)

Cuando se remitió un feto, se tomaron como muestras para el aislamiento vírico sangre de corazón, tejidos y/o líquido amniótico. Las muestras de sangre entera conservada con heparina se centrifugaron y se tomó el sobrenadante.

En los animales menores de 6 meses el aislamiento se realizó a partir de leucocitos.

Para ello la sangre con heparina se mezcló con tampón de hemólisis a partes iguales, se dejó actuar durante 5-10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 1000-2000 rpm durante 10 minutos. El botón de leucocitos quedaba en el fondo.

La composición del tampón de hemólisis es la siguiente:

- NH <sub>4</sub> Cl.....	16,6	gr
- NaH CO <sub>3</sub> .....	2,0	gr
- di Na EDTA.....	0,185	gr
- Agua dde.....	1000	ml

Se ajustó el pH a 7,2 - 7,4 y se conservó en nevera a +4°C.

El sobrenadante se tiró y los leucocitos se resuspendieron en 0,5 ml de medio de cultivo o PBS pH 7,2 estéril. Si se almacenaron en congelación a -70°C se añadió un 10% de DMSO.

#### **III.A.1.2.4. Obtención de inóculos víricos de los aislados del VDVB**

Los inóculos víricos se obtuvieron inoculando 1 ml de las diferentes cepas del VDVB<sub>2</sub> y/o de las muestras enviadas al laboratorio para aislamiento en frascos "Falcon" de 25 cm con cultivos confluentes de la línea celular BT (Paton *et al.*, 1991b) en medio de cultivo (MEM) y un 10% de SFB. Los cultivos se incubaron durante 4 días a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Los frascos se observaron todos los días al microscopio óptico para comprobar la presencia de efecto CP, caracterizado por vacuolización o por la muerte celular. Pasado este tiempo, los cultivos celulares infectados con VDVB se sometieron a tres ciclos sucesivos de congelación y descongelación, desprendiéndose las células de la superficie. A continuación se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se homogeneizó y se repartió en alícuotas de 1-2 ml en ampollas de plástico que se congelaron a -80°C. Se eligió un vial de cada cepa vírica para la titulación del virus.

#### **III.A.1.2.5. Titulación de los aislados víricos mediante la técnica de Inmunoperoxidasa**

A partir de sobrenadantes de los cultivos víricos mantenidos en congelación a -80°C se realizaron diluciones decimales hasta la dilución 10<sup>-10</sup>. En placas de cultivos celulares de 96 pocillos (Nunclon Microwell plates) se depositaron 50 µl de la dilución 10<sup>-10</sup> en cada uno de los pocillos de la columna 10, haciendo lo mismo con la dilución 10<sup>-9</sup> en la columna 9 y así sucesivamente hasta la dilución 10<sup>-1</sup>. Se utilizaron las 8 filas de la placa de microtitulación. La columna 12 se utilizó como testigo y en ella se añadieron 50 µl del medio de cultivo.

En todos los pocillos de la placa se añadieron 100 µl de una suspensión de células (a una concentración de 1-3 x 10<sup>5</sup> células/ml) de la línea celular BT en medio MEM con un 10% de SFB. Las placas se cubrieron con una película de plástico adhesiva y se incubaron a 37°C en estufa con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 días. Seguidamente se determinó el título mediante una técnica de Inmunoperoxidasa (Peroxidasa Linked Assay -PLA-; Holm Jensen, 1981).

### III.A.1.2.5.1. Reactivos utilizados

#### 1.- Solución de fijación.

Se empleó acetona al 20% diluida en PBS 0,01M, pH 7,6.

#### 2.- Solución de lavado. Esta solución se compone de:

- PBS 0,01M, pH 7,6 .....1000 ml
- Polioxietilen glicol (80) sorbitan monolaurato (Tween 80).....0,5 ml

#### 3.- Diluyente del suero y del conjugado. Este diluyente se compone de:

- NaCl..... 29,5 gr
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O)..... 1,5 gr
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O)..... 0,2 gr
- Tween 80..... 0,5 ml
- Agua dde.....1000 ml

#### 4.- Tampón ácido acético (0,05M, pH 5,0):

- Acetato sódico..... 2,89 gr
- Ácido acético glacial..... 0,89 ml
- Agua dde.....1000 ml

#### 5.- Substrato:

- Solución madre: 0,1 gr de 3-amino-9-etilcarbazol disuelto en 15 ml de dimetil formamida.

- Solución de uso: 0,3 ml de solución madre en 5 ml de tampón substrato y 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.

### III.A.1.2.5.2. Realización de la técnica

El medio de cultivo de las placas se tiró y las mismas se fijaron con acetona al 20% en PBS 0,01M, pH 7,6, durante 10 minutos. Las placas se desecaron bajo una lámpara de mesa a 30°C aproximadamente durante 3 ó 4 horas y se almacenaron en bolsas de plástico a -20°C si no iban a ser teñidas inmediatamente. Las microplacas fijadas y secadas se rehidrataron añadiendo 50 µl por pocillo de PBS 0,01M, pH 7,6. Tras dejar reposar las placas 5 minutos a temperatura ambiente se añadieron en cada pocillo 50 µl de suero policlonal bovino anti-VDVB proporcionado por el CVL a la dilución de 1/100 y se incubó a 37°C durante 10 minutos.

A continuación las placas se lavaron tres veces con la solución de lavado (PBS-Tween 80).

Después, en cada pocillo se añadieron 50 µl de suero de conejo anti-bovino conjugado con peroxidasa (Horse Radish Peroxidase, Dako).

Finalmente, se añadieron 50 µl por pocillo de la solución de sustrato preparada en el momento de su utilización y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Cuando la intensidad de color fue la adecuada el sustrato se tiró y la reacción se frenó con solución de lavado.

El título de virus se calculó por el método de Reed y Muench (1938) expresado en  $DI_{50}CT$ . Este método, como otros métodos estadísticos para calcular el punto final de una titulación, se basa en la definición del punto final como la dilución del virus que infecta al 50% de los hospedadores inoculados, expresándose el título de la suspensión vírica original como dosis infectiva 50% ( $DI_{50}CT$  en cultivos celulares) por mililitro (tabla III.A.2).

**Tabla III.A.2.** Ejemplo de una titulación de un aislado vírico por el método de Reed y Muench .

Dilución vírica	Resultados de un ensayo (efecto citopático)
$10^{-2}$	+ + + + +
$10^{-3}$	+ + + + +
$10^{-4}$	+ + + + +
$10^{-5}$	- + - - -
$10^{-6}$	- - - - -
Título	$10^{-5.2} DI_{50}CT/ml$

### III.A.1.3. Anticuerpos monoclonales utilizados

Para la caracterización antigénica de los aislados se usó en todos los casos un panel de 23 anticuerpos monoclonales (AcMos) cedidos generosamente por el “Central Veterinary Laboratory” (CVL) de Weybridge (Inglaterra), estos anticuerpos monoclonales se utilizaron para comparar la reactividad antigénica de los virus y se dirigían frente a las glicoproteínas gp53/E2 y gp48/E0 y la proteína p80/NS3/125/NS23 de los virus (tabla III.A.3).

La producción y caracterización de los anticuerpos monoclonales usados ha sido ampliamente descrita por Edwards *et al.* (1988), Edwards y Sands (1990) y Paton *et al.* (1991a, 1994).

En la tabla III.A.3 figuran las diluciones de uso de los 23 anticuerpos monoclonales, la cepa vírica frente a la que fueron obtenidos y la proteína vírica que

reconocen.

Los AcMos se diluyeron a la mitad con glicerol para almacenarse en fase líquida a -20°C. Cada preparación de AcMos se tituló por PLA frente al virus homólogo. Se tomó como punto final la dilución más alta antes de que el color comenzara a disminuir marcadamente. La dilución de trabajo seleccionada para el análisis de los virus de campo fue una dilución doble de la que marcaba el punto final (tablas III.A.3 y III.A.4)

**Tabla III.A.3.** Anticuerpos monoclonales cedidos por el CVL. Dilución de uso del panel de cada uno de los anticuerpos monoclonales, cepa vírica frente a la que fueron obtenidos y proteína vírica frente a la que se dirigen (Edwards *et al.*, 1988).

AcMo	Dilución	Virus origen	Proteína Viral	AcMo	Dilución	Virus origen	Proteína viral
WB105	1/320	C24V	p80/125	WA536	1/40	59386	gp48/E0
WB115	1/160	C24V	gp53/E2	WA538	1/160	59386	gp53/E2
WB162	1/160	C24V	gp53/E2	WA548	1/320	59386	p80/125
WB163	1/640	C24V	gp53/E2	WH216	1/80	VPPC Baker/A	gp48/E0
WB165	1/320	C24V	gp53/E2	WH303	1/320	VPPC 86/2	gp53/E2
WB210	1/40	C24V	gp48/E0	WS363	1/80	VEB 87/6	gp48/E0
WB215	1/320	C24V	gp53/E2	WS381	1/160	VEB 87/6	gp53/E2
WB160	1/160	NADL	p80/125	WS384	1/160	VEB 87/6	gp53/E2
WB166	1/320	NADL	gp53/E2	WV433	1/160	Vosges	gp48/E0
WB170	1/80	NADL	gp53/E2	WV437	1/320	Vosges	p80/125
WB212	1/80	NADL	p80/125	WV438	1/160	Vosges	gp53/E2
WB214	1/80	NADL	gp53/E2				

La clase de inmunoglobulina y la subclase de cada anticuerpo monoclonal fue determinada en el laboratorio de Weybridge por agar gel inmunodifusión (AGID) frente a antiseros de referencia como muestra la tabla III.A.4, donde también se describen los títulos de neutralización para cada anticuerpo monoclonal para las dos cepas de VDVB de procedencia NADL y Oregon C24V (Sand, comunicación personal).

En la tabla III.A.5. se describe el comportamiento observado en el CVL de las cepas de referencia que forman los cuatro grandes grupos de pestivirus usando una técnica de Inmunoperoxidasa frente al panel de AcMos usado para investigar los aislados españoles. La especificidad del panel de anticuerpos monoclonales del CVL frente a 187 pestivirus diferentes fue determinada por Edwards y Sand (Edwards *et al.*, 1987, 1988; Edwards y Sands, 1990; Sand, comunicación personal) usando una técnica de

Inmunoperoxida (PLA) y analizando cada anticuerpo monoclonal a una dilución simple y predeterminada.

**Tabla III.A.4.** Clase y subclase y títulos de neutralización para cada anticuerpo monoclonal para las dos cepas de VDVB de procedencia NADL y Oregon C24V (Sand, comunicación personal).

**Cepa NADL**

Anticuerpo Monoclonal	Clase y subclase de Ig	Título de neutralización	
		NADL	Oregon C24V
WB160	IgG 1	50	50
WB166	IgG 1	6400	50
WB170	IgG 1	50	50
WB212	IgG 1	50	50
WB214	IgG 1	6400	6400

**Cepa Oregon C24V**

Anticuerpo Monoclonal	Clase y subclase de Ig	Título de neutralización	
		NADL	Oregon C24V
WB103	IgG 1	50	50
WB105	IgG 2a	50	50
WB106	IgG 2a	50	50
WB109	IgG 1	50	50
WB112	IgG 2a	50	50
WB115	IgG 1	50	50
WB162	IgG 1	50	1600
WB163	IgG 2a	50	3200
WB165	IgG 2a	50	50
WB210	IgG 1	50	50
WB215	IgG 2b	50	1200

**Tabla III.A.5.** Detalle de los resultados obtenidos y del comportamiento de las cepas de referencia con el panel de anticuerpos cedidos por el “Central Veterinary Laboratory” de Weybridge (Inglaterra) que fueron usados para caracterizar los virus de este estudio (Sand, comunicación personal).

AcMo	VDVB	VEB	Virus Atípicos	VPPC
WB105	Todos	Todos	Todos	Todos
WB115	Algunos	x	x	x
WB162	Algunos	x	x	x
WB163	Algunos	Algunos	x	x
WB165	Pocos	x	x	x
WB210	Algunos	x	x	x
WB215	Algunos	x	x	x
WB160	Mayoría	Mayoría	x	x
WB166	Algunos	Algunos	Algunos	Pocos
WB170	Específico NADL	x	x	x
WB212	Mayoría	Mayoría	Mayoría	Mayoría
WB214	Algunos	x	x	x
WS363	x	Todos	x	x
WS381	Pocos	Todos	x	Pocos
WS384	Algunos	Todos	x	Algunos
WV433	x	x	Todos	x
WV437	x	x	Todos	Todos
WV438	x	x	Algunos	x
WA536	x	x	Algunos	x
WA538	x	x	Algunos	x
WA548	x	x	Algunos	x
WH216	VDVB cepas CP	x	x	Mayoría
WH303	x	x	x	Todos

x: el anticuerpo monoclonal no reacciona con ese grupo de pestivirus de referencia.

### III.A.1.3.2. Caracterización de los aislados del VDVB mediante el panel de anticuerpos monoclonales

Con los diferentes aislados se infectaron células BT y/o MDBK cultivadas en microplacas de 96 pocillos con un inóculo final de 300 DI<sub>50</sub> CT/pocillo. La dilución de trabajo para los aislados del VDVB/ml requerida según el título obtenido aparece descrita en la tabla III.A.6. Las cepas no citopáticas se incubaron durante 3-4 días y las citopáticas durante 2 días. A continuación el medio se retiró y las placas se fijaron con acetona al 20% en PBS 0,01M, pH 7,6 durante 10 minutos, se desecaron bajo una lámpara de mesa a 30°C durante 3 ó 4 horas, y se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización. Las microplacas fijadas y secadas se rehidrataron añadiendo 50 µl por pocillo de PBS 0,01M, pH 7,6 y se esperó durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron 50 µl de cada AcMo por duplicado con el panel de anticuerpos monoclonales del “Central Veterinary Laboratory” de Weybridge. Los anticuerpos ligados se detectaron por la técnica de Inmunoperoxidasa, usando las diluciones óptimas determinadas previamente para cada uno de los anticuerpos (tabla III.A.3). Las placas se mantuvieron en incubación a 37°C durante 15 minutos y posteriormente las placas se lavaron tres veces con la solución de lavado (PBS-Tween 80).

A continuación se añadieron 50 µl por pocillo de una dilución 1/100 del conjugado (anti-Igs de ratón marcadas con peroxidasa, Dako) y se incubaron a 37°C durante 15 minutos.

Las placas se lavaron tres veces con la solución de lavado (PBS-Tween 80) y una cuarta vez con agua destilada.

Finalmente, se añadieron 50 µl por pocillo de la solución de sustrato preparada en el momento de su utilización, y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Cuando la intensidad de color fue la adecuada el sustrato se tiró y la reacción se frenó con solución de lavado.

Las placas se leyeron bien inmediatamente o bien después de una noche mantenidas en nevera a +4°C utilizando un microscopio de objetivo invertido. La tinción de las células infectadas se valoró microscópicamente en función de la intensidad de la tinción y del número de células teñidas con referencia a pocillos controles negativos. Microscópicamente las células infectadas presentaron un citoplasma teñido de un color marrón-rojizo. Los resultados se registraron cualitativamente como se detalla en el apartado siguiente.

**Tabla III.A.6.** Dilución de virus por ml utilizada para infectar células BT o MDBK en microplacas de 96 pocillos para obtener un inóculo final de 300 DI<sub>50</sub>CT/pocillo requerida según el título obtenido para la Inmunoperoxidasa en placa.

Título por 50 µl	Dilución del virus por µl
10 <sup>-2.5</sup>	1000 µl
10 <sup>-2.75</sup>	560 µl
10 <sup>-3.0</sup>	300 µl
10 <sup>-3.25</sup>	180 µl
10 <sup>-3.5</sup>	100 µl
10 <sup>-3.75</sup>	56 µl
10 <sup>-4.0</sup>	30 µl
10 <sup>-4.25</sup>	18 µl
10 <sup>-4.5</sup>	10 µl
10 <sup>-4.75</sup>	5,6 µl
10 <sup>-5.0</sup>	3 µl
10 <sup>-5.25</sup>	2 µl
10 <sup>-5.5</sup>	1 µl
10 <sup>-5.75</sup>	0,56 µl
10 <sup>-6.0</sup>	0,3 µl
10 <sup>-6.25</sup>	0,18 µl
10 <sup>-6.5</sup>	0,1 µl
10 <sup>-6.75</sup>	0,056 µl

#### III.A.1.4. Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos se analizaron con dos paquetes informáticos (MAP y PHYLIP). En el primero de ellos (MAP), ideado por el Profesor Smith de la Universidad de Londres y que establece la distancia antigénica entre las cepas, se introdujeron unos valores normalizados obtenidos en base a la intensidad de la tinción según el criterio expuesto en la tabla III.A.7.

**Tabla III.A.7.** Normalización de los valores según la intensidad de la tinción para los distintos anticuerpos monoclonales utilizados.

SIGNO	DESCRIPCIÓN TINCIÓN	VALOR NORMALIZADO	VALOR ASIGNADO
++	MUY INTENSA	1	3
+	INTENSA	0,66	2
+/-	INDETERMINADA	0,33	1
0	NEGATIVA	0	0
(++)	GRUPOS CELULARES MUY INTENSOS	0,5	1,5
(+)	GRUPOS CELULARES INTENSOS	0,33	1
(+/-)	GRUPOS CELULARES INDETERMINADOS	0,16	0,5

El segundo programa (PHYLIP, Phylogeny Inference Package versión 3.5c), ideado por Josep Felsestein de la Universidad de Washington, se utilizó para analizar los resultados cualitativamente. En este caso los datos se introdujeron en forma binaria (positivo=1, negativo=0) de acuerdo con el criterio que se muestra en la tabla III.A.8.

**Tabla III.A.8.** Valores asignados introducidos en el programa PHYLIP según la intensidad de la tinción para los distintos anticuerpos monoclonales utilizados.

SIGNO	DESCRIPCIÓN TINCIÓN	VALOR ASIGNADO
++	MUY INTENSA	1
+	INTENSA	1
+/-	INDETERMINADA	0
0	NEGATIVA	0
(++)	GRUPOS CELULARES MUY INTENSOS	0
(+)	GRUPOS CELULARES INTENSOS	0
(+/-)	GRUPOS CELULARES INDETERMINADOS	0

En las tablas III.9 a III.12 se detalla el comportamiento observado en el CVL con cada una de las cepas de referencia que forman los cuatro grandes grupos de pestivirus (pestivirus bovinos, ovinos, porcinos atípicos y no clasificados) usando la técnica de Inmunoperoxidasa. Los datos de las tablas III.9 a III.12 se introdujeron en los dos paquetes

informáticos utilizados para el análisis de los resultados, usándose como referencia comparativa para los aislados españoles. Los programas informáticos utilizados permiten exponer los resultados bien como diagrama de árbol o bien en forma de mapa de distancias antigénicas.

		anti-gp48	anti-p80/125	anti-gp53
		4 3 3 2 2 5	4 5 1 2	1 1 2 1 3 1 1 3 3 4 5 2 1 1
		3 6 6 1 1 3	3 4 6 1	6 6 1 6 0 1 6 8 8 3 3 1 7 0
		3 3 8 6 0 6	7 8 0 2	3 5 5 6 3 5 2 1 4 8 8 4 0 5
P E S T I V I R U S  B O V I N O S	NADL			
	C24V			
	OSLOSS			
	1138			
	A1050			
	150022			
	168485			
	156672			
	153735			
	144800			
	154540			
	154985			
	178003			
	162903			
	172984			
	173481			
	179725			
	116962			
WEYBRIDGE				

**Tabla III.A.9.** Descripción de la reactividad de los anticuerpos monoclonales usados en el experimento con los pestivirus bovinos de referencia mediante una prueba de Inmunoperoxidasa. Los cuadros en blanco indican una reacción negativa, los cuadros en negro indican una reacción positiva y los cuadros en gris indican que la reacción positiva afecta a menos del 50% de las células infectadas. Weybridge es una cepa de VDVB aislado de ovejas. El monoclonal sombreado no fué introducido en los paquetes informáticos utilizados para el análisis de los resultados.

		anti-gp48					anti-p80/125				anti-gp53																
P E S T I V I R U S	O V I N O S		4	3	3	2	2	5	4	5	1	2	1	1	2	1	3	1	1	3	3	4	5	1	2	1	1
			3	6	6	1	1	3	3	4	6	1	6	6	1	6	0	1	6	8	8	3	3	5	1	7	0
			3	3	8	6	0	6	7	8	0	2	3	5	5	6	3	5	2	1	4	8	8	8	4	0	5
	MOREDUN																										
	S137																										

**Tabla III.A.10.** Descripción de la reactividad de los anticuerpos monoclonales usados en el experimento con los pestivirus ovinos de referencia mediante una prueba de Inmunoperoxidasa. Los cuadros en blanco indican una reacción negativa, los cuadros en negro indican una reacción positiva y los cuadros en gris indican que la reacción positiva afecta a menos del 50% de las células infectadas. El monoclonal sombreado no fue introducido en los paquetes informáticos utilizados para el análisis de los resultados.

		anti-gp48					anti-p80/125				anti-gp53																
P E S T I V I R U S	C L A S I F I C A D O S		4	3	3	2	2	5	4	5	1	2	1	1	2	1	3	1	1	3	3	4	5	1	2	1	1
			3	6	6	1	1	3	3	4	6	1	6	6	1	6	0	1	6	8	8	3	3	5	1	7	0
			3	3	8	6	0	6	7	8	0	2	3	5	5	6	3	5	2	1	4	8	8	8	4	0	5
	GIRAFFE																										
	DEER																										
	144584																										

**Tabla III. A.11.** Descripción de la reactividad de los anticuerpos monoclonales usados en el experimento con los pestivirus no clasificados de referencia mediante una prueba de Inmunoperoxidasa. Los cuadros en blanco indican una reacción negativa, los cuadros en negro indican una reacción positiva y los cuadros en gris indican que la reacción positiva afecta a menos del 50% de las células infectadas. El monoclonal sombreado no fue introducido en los paquetes informáticos utilizados para el análisis de los resultados.

		anti-gp48					anti-p80/125				anti-gp53															
P E S T I V I C R O S	A T I P I C O S	4	3	3	2	2	5	4	5	1	2	1	1	2	1	3	1	1	3	3	4	5	1	2	1	1
		3	6	6	1	1	3	3	4	6	1	6	6	1	6	0	1	6	8	8	3	3	5	1	7	0
		3	3	8	6	0	6	7	8	0	2	3	5	5	6	3	5	2	1	4	8	8	8	8	4	0
VOSGES 166312																										

**Tabla III.A.12.** Descripción de la reactividad de los anticuerpos monoclonales usados en el experimento con los pestivirus atípicos de referencia mediante una prueba de Inmunoperoxidasa. Los cuadros en blanco indican una reacción negativa, los cuadros en negro indican una reacción positiva y los cuadros en gris indican que la reacción positiva afecta a menos del 50% de las células infectadas. El monoclonal sombreado no fue introducido en los paquetes informáticos utilizados para el análisis de los resultados.

### III.B.1. SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE AL VDVB EN EL GANADO BOVINO DE LA CAM

#### III.B.1.1. Zona de estudio

El estudio se desarrolló dentro del ámbito de la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM). Los 179 términos municipales que la constituyen se encuentran agrupados en 11 delegaciones de acuerdo con la organización administrativa de los servicios de producción y sanidad animal de la Dirección General de Agricultura y Alimentación de la CAM, y éstas a su vez se agrupan en 6 Comarcas Agrarias de conformidad con la Comarcalización Agraria de España (tabla III.B.1. y Figura 7). Esta división en comarcas parece la más adecuada cuando como en nuestro caso se plantea un muestreo estratificado por localización geográfica, ya que una comarca agraria se define como “todo aquel territorio caracterizado por cierta uniformidad en sus rasgos físicos y biogeográficos: caracteres geológicos, climáticos y botánicos”.

**Tabla III.B.1.** Resumen por Comarcas de la Organización Administrativa de la CAM. (Servicio de Coordinación Agraria y Tramitación de Ayudas de la Dirección General de Agricultura y Alimentación de la Comunidad de Madrid -no publicados-).

Comarca Número	Denominación	Superficies Ha.	Nº Términos. Municipales
1	Lozoya-Somosierra	153363	48
2	Guadarrama	97224	21
3	Área Metropolitana	174546	24
4	Campaña	108013	31
5	Suroccidental	138842	34
6	Las Vegas	130804	21
Total Provincial: 802792			179

**III.B1.2. Muestra**

La población diana de este estudio fue el ganado bovino de la CAM con una edad superior al año. La población objeto de estudio estaba identificada en el censo ganadero de 1995 del Servicio de Coordinación Agraria y Tramitación de Ayudas de la Dirección General de Agricultura y Alimentación de la Comunidad de Madrid (no publicado), y que nos fue proporcionado por dicho organismo en soporte informático (tabla III.B.2.). Dicho soporte informático contenía datos detallados de las explotaciones de la CAM, tales como ubicación, (municipio y comarca), número de vacas de ordeño (VOR), de vacas de no ordeño (VNO), de plazas de cebo de bovino (PCV) y tipología (vacuno de leche, carne y cebo), entre otras. Asimismo se disponía del nombre, la dirección y el teléfono del titular de la explotación.

**Tabla III.B.2.** Censo Ganadero de la Comunidad de Madrid (1995). Fuente Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaria General Técnica. Entre paréntesis peso con el que ponderan las poblaciones parciales sobre el total del Censo de la CAM.

Comarca Nº	Vacuno Ordeño (%)	Vacuno No Ordeño (%)	Cebo (%)
1	4398 (27,8)	13484 (46,1)	3150 (26,1)
2	2269 (14,3)	9523 (32,6)	3549 (29,4)
3	4614 (29,2)	3440 (11,8)	2611 (21,6)
4	1107 (7,0)	158 (0,5)	278 (2,3)
5	2592 (16,4)	1821 (6,2)	1687 (14,0)
6	834 (5,3)	796 (2,7)	793 (6,6)
TOTAL ANIMALES POR TIPOLOGIAS	15814 (27,7)	29222 (51,2)	12068 (21,1)
TOTAL ANIMALES	57104		

**III.B.1.2.1. Tamaño de la muestra**

El tamaño muestral estimado necesario para estudiar la seroprevalencia de anticuerpos frente al VDVB en el ganado bovino de la CAM se determinó utilizando la fórmula (Cochran, 1977):

$$n = \frac{Z^2_{\alpha} \cdot P(1-P)}{d^2}$$

Donde:

**n** = Número de muestras necesarias.

**Z** = Valor de la *t* de Student, que para un nivel de confianza del 95% ( $\alpha=0,05$ ) fijado en este estudio  $Z\alpha$  es igual a 1,96.

**P** = Valor de la prevalencia que se espera en la población. De acuerdo con los resultados de seroprevalencia publicados por otros investigadores españoles (Ovejero, 1971; Castro *et al.*, 1984; Prieto *et al.*, 1988 y Álvarez *et al.*, 1994a) la seroprevalencia esperada se fijó en un 45%.

**d** = Precisión con la que se desea estimar el parámetro. En nuestro caso la precisión absoluta se fijó en 1,8% (lo que equivale a una precisión relativa en la estimación del 4%).

Aplicando la fórmula a las condiciones fijadas:

$$n = \frac{1.96^2 \cdot 0,45 (1-0,45)}{(0,018)^2} = 2.988 \cong 3.000$$

### III.B1.2.2. Técnica de muestreo

Para la selección de la muestra se recurrió a un muestreo aleatorio polietápico, en nuestro caso en dos etapas. En una primera etapa se realizó un muestreo estratificado por un factor y en una segunda se tomaron como conglomerados las explotaciones de forma equiprobabilística (muestreo por conglomerados).

#### III.B.1.2.2.1. Primera etapa del muestreo: muestreo estratificado

La población a muestrear se estratificó por los 3 factores que inicialmente consideramos que podían influir en la prevalencia de anticuerpos frente al VDVB:

- Zona geográfica
- Aptitud (tipología)
- Tamaño de la explotación

### *Zona geográfica*

Para realizar el muestreo, la división de la CAM en 6 comarcas se simplificó a 4 áreas geográficas reuniendo las comarcas 4, 5 y 6 de la tabla III.B.1 en una única área (Figura 7). Esta decisión se tomó teniendo en cuenta, además de las consideraciones geográficas (las comarcas unificadas engloban la zona suroeste de la CAM), el censo de vacuno de estas comarcas (ver tabla III.B.2.).

### *Aptitud (tipología)*

Con respecto a la aptitud, la población se dividió en tres grupos:

- Vacuno de leche
- Vacuno de carne
- Vacuno de cebo

Esta clasificación se hizo por explotaciones siguiendo los criterios del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) sobre la base de la cuantificación de la capacidad productiva de la explotación, para lo que se tiene en cuenta el número de vacas de ordeño (VOR), el número de vacas de no ordeño (VNO) y las plazas de cebo de bovino (PCV). La tipología de una explotación se fija de acuerdo con la sistemática siguiente:

$$(O) = \text{VOR} \times 1,5$$

$$(N) = \text{VNO}$$

$$(C) = \text{PCV} \times 0,6$$

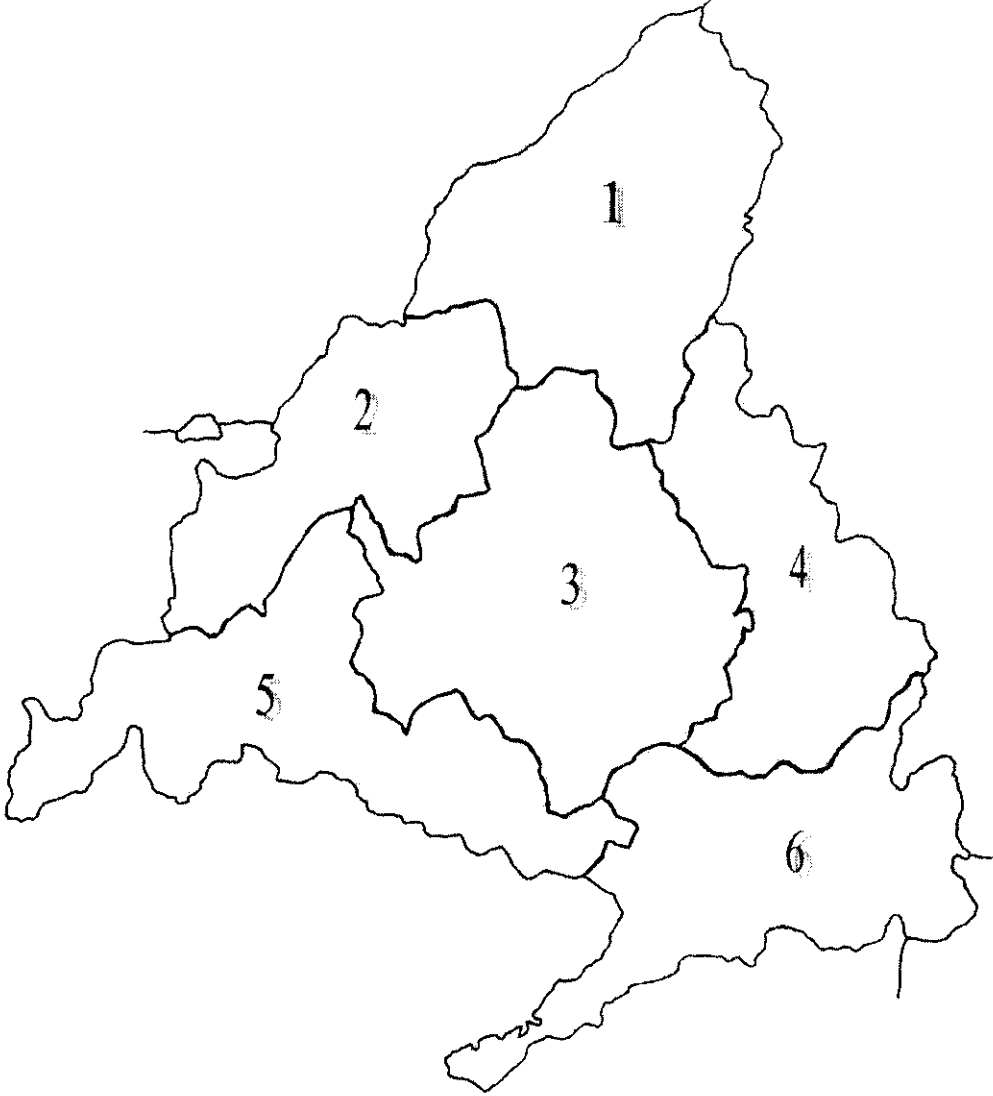
- |    |                         |         |                        |
|----|-------------------------|---------|------------------------|
| 1) | Si $O = N = C = 0$      | TIP = 0 |                        |
| 2) | Si $O > N$ y $O \geq C$ | TIP = 1 | Tipología VACUNO LECHE |
| 3) | Si $N > O$ y $N \geq C$ | TIP = 2 | Tipología VACUNO CARNE |
| 4) | Si $C > O$ y $C > N$    | TIP = 3 | Tipología VACUNO CEBO  |

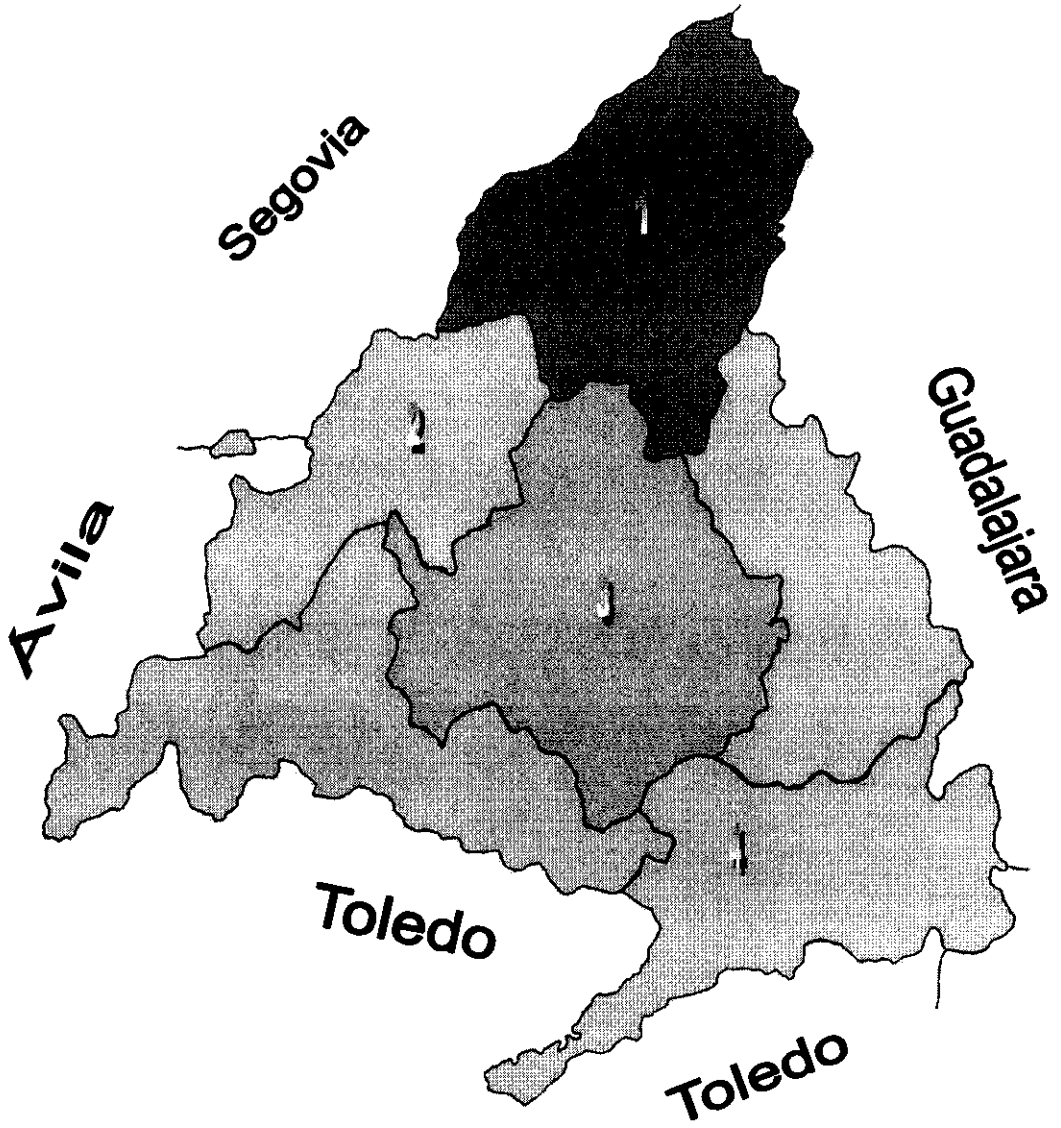
### *Tamaño de la Explotación*

En las tres tipologías definidas se establecieron dos únicos estratos de tamaño (tabla III.B.3):

- Explotaciones con menos de 100 animales.
- Explotaciones con más de 100 animales.

**Figura 7.-** División de la CAM en 6 comarcas y simplificación a 4 áreas geográficas reuniendo las comarcas 4, 5 y 6 en una única área para realizar el muestreo.





**Tabla III.B.3.** Distribución de las explotaciones de la CAM en función del área geográfica, la tipología, y el tamaño.

Áreas geográficas	VACUNO ORDEÑO		VACUNO NO ORDEÑO		CEBO		N° Explotaciones/ áreas geográficas
	N° Explotaciones		N° Explotaciones		N° Explotaciones		
	< 100	> 100	< 100	> 100	< 100	> 100	
01	91	10	552	25	35	0	713
02	71	2	318	11	21	2	425
03	69	8	96	4	33	1	211
04	68	12	74	3	62	2	221
<b>N° Explotaciones</b>	<b>299</b>	<b>32</b>	<b>1040</b>	<b>43</b>	<b>151</b>	<b>5</b>	<b>1570</b>

El número de muestras a tomar por área geográfica y por tipología se calculó linealmente, es decir, de cada área geográfica se tomaron 1/4 y de cada tipología 1/3 de las muestras totales (tabla III.B.5). El número de muestras a tomar en función del tamaño de la explotación, y dado que existían diferencias importantes en el número de animales presentes en las explotaciones de más de 100 animales y menos de 100 animales, se calculó proporcionalmente al número de animales existentes en cada uno de estos grupos (tabla III.B.5).

Así por ejemplo, de las 249 muestras que corresponde tomar de acuerdo con el reparto lineal de los animales de leche del área geográfica 1, un 59,5% (148) se tomaron de las explotaciones de menos de 100 animales y un 40,5% (101) de las de más de 100 (tabla III.B.5), puesto que este es el reparto proporcional de los animales lecheros en el área geográfica 1 entre las explotaciones menores de 100 (2617 de 4398, 59,5%) y mayores de 100 (1781 de 4398, 40,5%) animales (ver tabla III.B.4).

**Tabla III.B.4.** Distribución del ganado vacuno de la CAM en función del área geográfica, la tipología, y el tamaño.

Áreas geográficas	VACUNO ORDEÑO		VACUNO NO ORDEÑO		CEBO		Total/áreas geográficas
	N° Animales		N° Animales		N° Animales		
	< 100	> 100	< 100	> 100	< 100	> 100	
01	2617	1781	10266	3218	1610	1540	21032
02	1901	368	7678	1845	2559	990	15341
03	2875	1739	2789	651	2131	480	10665
04	1742	2791	2265	510	2333	425	10066
<b>Total</b>	<b>9135</b>	<b>6679</b>	<b>22998</b>	<b>6224</b>	<b>8633</b>	<b>3435</b>	<b>57104</b>

La distribución teórica final del tamaño muestral, de acuerdo con el criterio de reparto mencionado antes, se expone en la tabla III.B.5.

**Tabla III.B.5.** Distribución del tamaño muestral según los criterios antes establecidos.

Áreas geográficas	VACUNO ORDEÑO		VACUNO NO ORDEÑO		CEBO		Total /Áreas geográficas
	Nº Animales		Nº Animales		Nº Animales		
	< 100	> 100	< 100	> 100	< 100	> 100	
01	148	101	190	59	127	122	747
02	209	40	201	48	180	69	747
03	155	94	202	47	204	45	747
04	96	153	204	45	211	38	747
<b>Total</b>	<b>608</b>	<b>388</b>	<b>797</b>	<b>199</b>	<b>722</b>	<b>274</b>	<b>2988</b>

**III.B.1.2.2.2. Segunda etapa del muestreo: muestreo por conglomerados**

Con el fin de simplificar el procedimiento de muestreo, se decidió seleccionar un número representativo de explotaciones por cada trinomio Área-Aptitud-Tamaño, y de éstas seleccionar linealmente el número de animales precisos para alcanzar el tamaño muestral requerido en cada caso (mínimo 5).

La selección de la explotación y de los animales a muestrear se hizo al azar utilizando una tabla de números aleatorios.

En la tabla III.B.6 figura el número y el porcentaje de explotaciones seleccionadas inicialmente para cada trinomio Área-Aptitud-Tamaño. El porcentaje de explotaciones a muestrear de cada conglomerado se selecciono por razones de factibilidad. Cuando el número de explotaciones en un trinomio dado era bajo (menos de 5) se seleccionaron todos.

**Tabla III.B.6.** Número y porcentaje de explotaciones seleccionadas en cada uno de los grupos establecidos.

Áreas geográficas	VACUNO ORDEÑO		VACUNO NO ORDEÑO		CEBO		Total /Áreas geográficas
	Nº Explotaciones / Seleccionadas (%)		Nº Explotaciones / Seleccionadas (%)		Nº Explotaciones / Seleccionadas(%)		
	< 100	> 100	< 100	> 100	< 100	> 100	
01	91/30 (33,0)	10/5 (50)	519/28 (5,4)	58/9 (15,5)	35/15 (42,8)	0/0 (0)	713/92 (12,9)
02	71/24 (33,8)	2/2 (100)	318/25 (7,8)	11/5 (45,4)	21/15 (71,4)	2/2 (100)	425/73 (17,2)
03	69/23 (33,3)	8/5 (62,5)	96/20 (20,8)	4/4 (100)	33/20 (60,6)	1/1 (100)	211/73 (34,6)
04	68/23 (33,8)	12/6 (50)	74/18 (24,3)	3/3 (100)	62/25 (40,3)	2/2 (100)	221/77 (34,8)
<b>Nº Explot</b>	<b>299/100 (33,4)</b>	<b>32/18 (56,2)</b>	<b>1007/91 (9,0)</b>	<b>76/21 (27,6)</b>	<b>151/75 (49,6)</b>	<b>5/5 (100)</b>	<b>1570/310 (19,7)</b>

En la tabla III.B.7 figura el número de animales que nos propusimos muestrear inicialmente en las explotaciones seleccionadas.

**Tabla III.B.7.** Número de explotaciones seleccionadas aleatoriamente por estrato y número de animales que se tomó de cada una de ellas.

Áreas geográficas	VACUNO ORDEÑO		VACUNO NO ORDEÑO		CEBO		Total/ Áreas geográficas
	Nº Explot (Animales Explot)		Nº Explot (Animales Explot)		Nº Explot (Animales Explot)		
	< 100	> 100	< 100	> 100	< 100	> 100	
01	30 (5)	5 (21)	28 (9)	9 (5)	15 (9)	0 (0)	87
02	24 (9)	2 (20)	25 (9)	5 (10)	15 (12)	2 (40)	73
03	23 (7)	5 (19)	20 (11)	4 (12)	20 (10)	1 (45)	73
04	23 (5)	6 (26)	18 (12)	3 (15)	25 (9)	2 (20)	77
<b>Nº Explot</b>	<b>100</b>	<b>18</b>	<b>91</b>	<b>21</b>	<b>75</b>	<b>5</b>	<b>310</b>

Como consecuencia de la sistemática del muestreo usada los animales de una explotación con una tipología diferente a la que definía la explotación quedaron excluidos del muestreo. En la tabla III.B.8 se detalla el número de animales excluidos del muestreo en cada uno de los grupos por esta causa. Como puede apreciarse en dicha tabla el número de animales de leche y de carne excluidos fue muy bajo, pero, en el caso de los animales de cebo quedaron excluidos el 61,5% del censo total.

**Tabla III.B.8.** Animales que quedaron fuera del muestreo por ser de una tipología diferente a la que definía la explotación.

Áreas geográficas	VACUNO ORDEÑO		VACUNO NO ORDEÑO		CEBO		Total/Áreas geográficas
	Nº Animales		Nº Animales		Nº Animales		
	< 100	> 100	< 100	> 100	< 100	> 100	
01			30		1117	1540	2687
02	28		80	276	1746	689	2819
03				130	1110	279	1519
04			13	64	805	140	1022
<b>Total</b>	<b>28</b>		<b>123</b>	<b>470</b>	<b>4778</b>	<b>2648</b>	<b>8047</b>

### III.B.1.2.3. Fuente de las muestras

Las muestras de suero correspondientes a los animales seleccionados según lo expuesto en el apartado anterior se obtuvieron del banco regional de sueros (BRS) del laboratorio regional agrario de la CAM. Las muestras de suero utilizadas correspondieron a la Campaña de Saneamiento Ganadero del año 1995. Los sueros estaban catalogados según los principios generales establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (OMS, 1959, 1970) y por Moorhouse y Hugh-Jones (1981).

### III.B.1.3. Análisis de los sueros

La detección de anticuerpos frente al VDVB se realizó con una prueba ELISA de bloqueo comercial (Serelisa BVD/BD Ab, Rhône Mérieux diagnostics, Lyon, Francia). Las placas estaban tapizadas con una proteína no estructural (p80/120) común a todas las cepas de VDVB.

La realización de la prueba y la interpretación de los resultados se hicieron siguiendo las instrucciones del fabricante. El modo de empleo de este ELISA comercial es común a otros enzimoimmunoensayos y se basa en añadir sucesivamente las muestras, el conjugado específico y el cromógeno, con las correspondientes incubaciones y lavando entre cada paso.

Así, en primer lugar, se añaden 100  $\mu$ l de los sueros a estudiar, previamente diluidos al 1:10 con el tampón de dilución que proporciona el fabricante, y 100  $\mu$ l de los testigos (por duplicado) positivo y negativo. Después, la placa se incuba a  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 14 a 18 horas y se lava cuatro veces con la solución de lavado. A continuación se añade el conjugado, un anticuerpo monoclonal anti-VDVB conjugado con peroxidasa, diluido al 1:10 con el diluyente del conjugado que proporciona el fabricante, y se incuba de nuevo durante 1 hora a  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Tras un nuevo lavado (x 4), se añade la solución cromógena preparada en el momento, se incuba en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente y, por último, se añade la solución de parado.

La lectura de la densidad óptica (DO) de los pocillos se realiza en un lector de ELISA a 450 nm e inmediatamente después de añadir la solución de parado, dado que el cromógeno puede cristalizar en los pocillos con señales fuertes.

La intensidad de la reacción (cantidad de conjugado fijado) será inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-VDVB presentes en la muestra de suero, por lo que los controles positivos serán incoloros y los negativos intensamente coloreados.

De acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante pueden utilizarse dos métodos para la interpretación de los resultados:

- Mediante el cálculo del porcentaje de competición.
- Mediante el análisis de las DO.

En este trabajo se utilizó este segundo criterio que consiste en calcular las DO de los puntos de corte (PC) correspondientes al 30 (DOPC30) y 50% (DOPC50) del porcentaje de competición de acuerdo con las fórmulas siguientes:

$$DOPC30 = 0,70 \overline{DO} TN + 0,30 \overline{DO} TP$$

$$DOPC50 = 0,50 \overline{DO} TN + 0,50 \overline{DO} TP$$

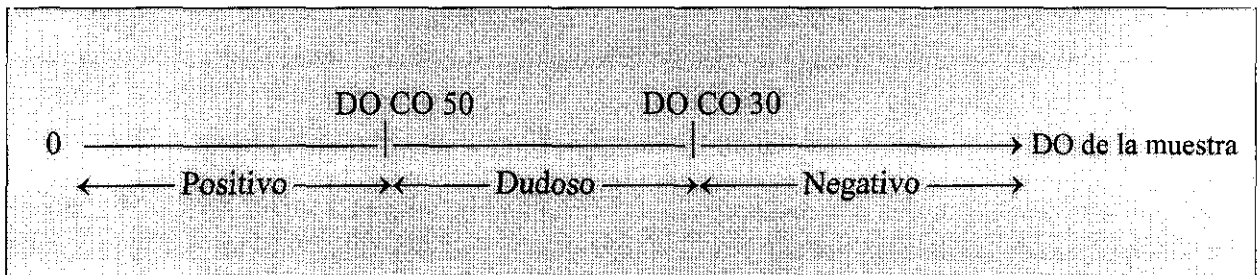
Donde:

$\overline{DO} TN$  = Media de la densidad óptica de los dos testigos negativos.

$\overline{DO} TP$  = Media de la densidad óptica de los dos testigos positivos.

Una muestra se considera positiva si su DO es menor que la DO PC 50 y negativa si su DO es mayor que la DO PC 30. Los sueros problema cuya DO esta entre estos dos valores se consideraron dudosos (Figura 8).

**Figura 8.** Interpretación de los resultados del ELISA.



En la interpretación de los resultados para que un ensayo fuera considerado válido debía cumplir las siguientes dos condiciones:

- La  $\overline{DO} TN > 0.500$ .
- El porcentaje de competición del TP  $\geq 80\%$ .

En este estudio los sueros dudosos se consideraron como negativos para el cálculo de la seroprevalencia. A los positivos, y en función de su DO, se les asignó un valor semicuantitativo (+, ++, +++, +++++, ++++++) de acuerdo con el siguiente criterio:

$$\frac{\overline{\text{DO PC 50}} - \overline{\text{DO TP}}}{4} = X$$

Valor de la DO:

De	0		a	$\overline{\text{DO TP}}$	-----	=	+++++
de	$\overline{\text{DO TP}}$		a	$\overline{\text{DO TP}} + X$	-----	=	++++
de	$\overline{\text{DO TP}} + X$		a	$\overline{\text{DO TP}} + 2X$	-----	=	+++
de	$\overline{\text{DO TP}} + 2X$		a	$\overline{\text{DO TP}} + 3X$	-----	=	++
de	$\overline{\text{DO TP}} + 3X$		a	$\overline{\text{DO TP}} + 4X$	-----	=	+

Los sueros con DO correspondientes a 3 ó más cruces se consideraron que tenían un título alto de anticuerpos frente al VDVB y este criterio se utilizó para calcular la seroprevalencia de título alto (TA) en la población y en los diferentes estratos considerados.

Finalmente, por conveniencia, en el conjunto de los animales y en los diferentes grupos se calculó lo que se denominó título medio (TM) de anticuerpos asignando un valor numérico a las diferentes categorías (+ = 1, ++ = 2, +++ = 3, +++++ = 4, ++++++ = 5, - y ± = 0) y aplicando la fórmula siguiente:

$$\text{TM} = \frac{a + b \cdot 2 + c \cdot 3 + d \cdot 4 + e \cdot 5}{N}$$

Donde:

a, b, c, .....= número de animales con reacción correspondiente 1, 2, 3, ...cruces.

N = número de animales analizados en el total de la muestra o en un grupo o subgrupo dado.

#### III.B.1.4. Análisis Estadístico

Los resultados de los análisis fueron codificados y posteriormente analizados con la aplicación estadística Epi Info, versión 6.04 (Dean *et al.*, 1994).

Las prevalencias y las prevalencias de TA de los diferentes estratos y substratos se compararon con la prueba de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . En los casos en los que los datos a comparar no cumplían las condiciones de aplicación del  $\chi^2$  se usó la prueba exacta de Fisher's.

Para la comparación de los TM se utilizó un análisis de varianza de un factor ("oneway") para datos independientes. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . En el caso de encontrarse diferencias significativas entre las medias comparadas se realizaba un análisis complementario denominado contraste *a posteriori* por el procedimiento de Bonferroni para comparaciones múltiples consistente en realizar comparaciones dos a dos con las medias obtenidas para cada uno de los grupos. Los cálculos se realizaron con el programa estadístico SPSS.

#### III.B.1.5. Cuestionario

De las explotaciones de aptitud lechera y cárnica seleccionadas al azar para el muestreo, según se expuso antes, se decidió recabar información, entre otros temas, sobre el grado de conocimiento del ganadero de la DVB, sobre las prácticas de manejo (especialmente las que suponen un riesgo de introducción de la infección con el VDVB en las explotaciones) y sobre las prácticas de vacunación. Para ello se elaboró un cuestionario con 40 preguntas, agrupadas en los siguientes bloques temáticos: I) datos generales de la explotación, II) manejo general de la explotación, III) antecedentes de enfermedad, IV) antecedentes diarrea vírica bovina, V) prácticas habituales de vacunación y desparasitación, VI) datos del ganadero (Figura 9). Las respuestas a las preguntas del cuestionario fueron prácticamente en todos los casos cerradas, es decir, con opciones prefijadas por nosotros mutuamente excluyentes, lo que facilita la codificación de la información y evita sesgos de interpretación (Schukken *et al.*, 1989; Edwards, 1990). Las preguntas relativas a enfermedades o síndromes fueron diseñadas de tal forma que los ganaderos pudiesen reconocerlos fácilmente (Simpson y Wright, 1979).

El cuestionario, antes de su uso general, se ensayó en un número limitado de ganaderos para evaluar su diseño, el grado de comprensión de los entrevistados de cada pregunta y el tiempo requerido para su realización. Este ensayo previo posibilitó, además, el adiestramiento del encuestador (Waltner-Toews, 1982).

Para la realización de las encuestas se contactó telefónicamente con los responsables de las explotaciones para conocer su disposición o no a responder al cuestionario y, en su caso, fijar una cita con el entrevistador. Las encuestas se realizaron por el método de entrevista al ganadero responsable de la explotación, siempre por la misma persona y en la propia explotación.



**ANTECEDENTES DE ENFERMEDAD**

**Enfermedades de Control Oficial. Se han diagnosticado en los últimos 3 años:**

**11 Brucelosis:** Sí  No  No sabe  Fecha último diagnós. \_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES DIARREA VIRICA BOVINA**

**12 ¿Conoce la Enfermedad Diarrea Vírica Bovina?:** Sí  No  No sabe

**13 ¿Se ha diagnosticado en la explotación?:** Sí  No  No sabe

**14 Fecha aproximada diagnóstico:** \_\_\_\_\_

**15 Tipo:** 1 Clínico   
2 Laboratorial

**16 Nombre del veterinario:** \_\_\_\_\_ **Tel.:** \_\_\_\_\_

**17 Nombre del Laboratorio:** \_\_\_\_\_

**Antecedentes de sintomatología/problemática compatibles con DVB:**

**18 Abortos:** Sí  No  No sabe  último diagnóstico

**19 N ° (%) abortos:**

1 Último año	%
2 Penúltimo año	%
3 Antepenúltimo año	%

**20 ¿Se han observado abortos con fetos momificados?:**  
Sí  No  No sabe

**21 ¿Se hizo diagnóstico laboratorial?:**  
Sí  No  No sabe   
Resultado \_\_\_\_\_

**22 ¿Ha observado disminuciones importantes de la fertilidad en el último año?:**  
Sí  No  No sabe   
Desde cuando: \_\_\_\_\_

**23 ¿Ha observado repetición de celos con ciclos largos?:**  
Sí  No  No sabe

**Han nacido terneros con:**

**24 Problemas motores (ataxia):** Sí  No  No sabe   
Fecha: \_\_\_\_\_

**25 Problemas oculares:** Sí  No  No sabe   
Fecha: \_\_\_\_\_

**26 Anormalidades congénitas, del SNC:** Sí  No  No sabe   
Fecha: \_\_\_\_\_

**27 Pequeños y que no crecen normalmente:** Sí  No  No sabe   
Fecha: \_\_\_\_\_

**28 ¿Han observado en algún animal (6 a 24 meses) evidente retraso en el crecimiento respecto al resto de animales de su edad?:**  
Sí  No  No sabe   
Fecha: \_\_\_\_\_

**29 ¿Han observado en animales de 6 a 24 meses diarreas persistentes que no respondan al tratamiento?:**  
Sí  No  No sabe   
Fecha: \_\_\_\_\_

**30 ¿Han muerto animales entre 6 y 24 meses con úlceras en boca y otros órganos digestivos?:**  
Sí  No  No sabe   
Fecha: \_\_\_\_\_

**PRACTICAS HABITUALES DE VACUNACIÓN Y DESPARASITACIÓN**

Vacuna frente a:

- 31 DVB:      Sí  No  No sabe   
 Vacuna utilizada: \_\_\_\_\_  
 Pauta utilizada: \_\_\_\_\_  
 Ultima vacunación: \_\_\_\_\_
- 32 RIB:      Sí  No  No sabe       vacuna \_\_\_\_\_
- 33 PI-3:     Sí  No  No sabe       vacuna \_\_\_\_\_
- 34 VRSB:    Sí  No  No sabe       vacuna \_\_\_\_\_
- 35 Diarr-neonat.:    Sí  No  No sabe       vacuna \_\_\_\_\_
- 36 Desparasita:    Sí  No  No sabe
- Producto \_\_\_\_\_  
 Frecuencia \_\_\_\_\_

**DATOS DEL GANADERO**

- 37 Nombre \_\_\_\_\_  
 38 Domicilio \_\_\_\_\_ 39 Teléfono \_\_\_\_\_  
 40 Localidad \_\_\_\_\_



## **IV.A.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

### **IV.A.1. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES DE AISLADOS ESPAÑOLES DEL VDVB**

#### **IV.A.1.1. Titulación de los aislados españoles del vdvb**

Todos los virus fueron titulados en las líneas celulares MDBK y/o BT mediante la técnica de la Inmunoperoxidasa en microplaca -PLA- (Holm Jensen, 1981). El título obtenido para cada uno de los aislados españoles estudiados se detalla en la tabla IV.A.1.

#### **IV.A.1.2. Biotipos observados en los aislados españoles del vdvb**

En tres de las cepas españolas descritas previamente como citopáticas (León1, RIBO y E1494/92INT) se confirmaron los biotipos citopáticos y se observaron vacuolas citoplasmáticas y muerte celular, los cuales son efectos característicos del biotipo citopático del VDVB. La cepa León2 que venía descrita como citopática no se comportó como tal en nuestros cultivos celulares, al no observarse vacuolización o muerte celular. En el aislado León1 el efecto citopático se observó a las 48 horas postinoculación, mientras que en los aislados RIBO y E1494/92INT el efecto citopático se detectó a los tres días. El resto de las cepas españolas investigadas (46 cepas, 93,9%) se comportaron como biotipo no citopático. Esto confirma los resultados obtenidos en estudios previos en el sentido de que estas cepas NCP se aíslan de la gran mayoría de las infecciones producidas por el VDVB (Dubovi, 1992).

**Tabla IV.A.1.** Resultados de la titulación de las cepas de VDVB aisladas en España y utilizadas en este estudio.

Cepa	DI <sub>50</sub> CT/ml.	Cepa	DI <sub>50</sub> CT/ml
1/89	10 <sup>-4,0</sup>	32/94	10 <sup>-5,5</sup>
2/90	10 <sup>-4,25</sup>	33/95	10 <sup>-4,75</sup>
3/90	10 <sup>-4,5</sup>	34/95	10 <sup>-4,75</sup>
5/91	10 <sup>-3,5</sup>	35/95	10 <sup>-5,5</sup>
6/91	10 <sup>-3,5</sup>	37/95	10 <sup>-4,5</sup>
7/91	10 <sup>-4,75</sup>	38/95	10 <sup>-5,5</sup>
8/91	10 <sup>-3,0</sup>	39/95	10 <sup>-5,5</sup>
9/91	10 <sup>-3,5</sup>	41/95	10 <sup>-5,5</sup>
10/92	10 <sup>-4,75</sup>	42/95	10 <sup>-6,25</sup>
E1494/92INT	10 <sup>-4,50</sup>	43/95	10 <sup>-5,0</sup>
11/93	10 <sup>-3,75</sup>	45/95	10 <sup>-2,5</sup>
12/93	10 <sup>-4,0</sup>	46/95	10 <sup>-4,50</sup>
13/93	10 <sup>-4,5</sup>	47/95	10 <sup>-6,0</sup>
15/93	10 <sup>-3,50</sup>	14	10 <sup>-4,50</sup>
16/93	10 <sup>-4,25</sup>	3002	10 <sup>-5,7</sup>
17/94	10 <sup>-5,25</sup>	8SV	10 <sup>-5,25</sup>
19/94	10 <sup>-4,75</sup>	9SV	10 <sup>-2,25</sup>
20/94	10 <sup>-5,25</sup>	13SV	10 <sup>-6,0</sup>
21/94	10 <sup>-5,5</sup>	14SV	10 <sup>-6,0</sup>
22/94	10 <sup>-4,75</sup>	16SV	10 <sup>-6,25</sup>
23/94	10 <sup>-4,75</sup>	León1	10 <sup>-4,50</sup>
24/94	10 <sup>-3,5</sup>	León2	10 <sup>-4,25</sup>
25/94	10 <sup>-4,5</sup>	León3	10 <sup>-4,75</sup>
26/94	10 <sup>-5,5</sup>	RIBO	10 <sup>-4,75</sup>
31/94	10 <sup>-5,5</sup>		

#### IV.A.1.3. Reactividad de los aislados españoles del VDVB frente a los anticuerpos monoclonales agrupados según la cepa vírica utilizada para producirlos

Analizado el comportamiento de los AcMos en función de la cepa de referencia utilizada para su producción se comprobó que:

1.- El grupo de anticuerpos monoclonales preparados por Edwards *et al.* (1988) a partir de la cepa del VDVB Oregon C24V y dirigidos frente a la proteína viral gp53 (WB115, WB162, WB163 y WB165) mostraron mayoritariamente una reactividad negativa. El anticuerpo monoclonal WB215 mostró una reactividad intermedia (tabla IV.A.2).

2.- Con el AcMo WB210 dirigido frente a la proteína gp48, y obtenido igualmente a partir de la cepa Oregon C24V, los aislados españoles mostraron mayoritariamente una reactividad positiva (tabla IV.A.2).

**Tabla IV.A.2.** Reactividad de los aislados españoles con los AcMos obtenidos frente a la cepa Oregon C24V y que reaccionan con las proteínas virales gp53 y gp48.

AcMo	Proteína viral	Reactividad de los aislados españoles	
		Nº Positivos (%)	Nº Negativos (%)
WB115	gp53	4 (8,2)	45 (91,8)
WB162	gp53	1 (2,0)	48 (98)
WB163	gp53	1 (2,0)	48 (98)
WB165	gp53	0 (0)	49 (100)
WB215	gp53	18 (36,8)	31 (63,2)
WB210	gp48	42 (85,8)	7 (14,2)

3.- Los dos AcMos (WB160 y WB212) preparados por Edwards *et al.* (1988) a partir de la cepa del VDVB NADL y dirigidos frente a la proteína viral p80/125 mostraron mayoritariamente una reactividad positiva (tabla IV.A.3).

4.- Del grupo de anticuerpos monoclonales preparados por Edwards *et al.* (1988) a partir de la cepa NADL y que reaccionan con la proteína viral gp53 (WB166, WB170 y WB214) dos de ellos mostraron mayoritariamente una reactividad positiva mientras que el otro no reaccionó con ninguno de los aislados estudiados (tabla IV.A.3).

**Tabla IV.A.3.** Reactividad de los aislados españoles con los AcMos obtenidos frente a la cepa NADL y que reaccionan con las proteínas virales p80/125 y gp53.

AcMo	Proteína viral	Reactividad de los aislados españoles	
		Nº Positivos (%)	Nº Negativos (%)
WB160	p80/125	46 (93,9)	3 (6,1)
WB212	p80/125	48 (98)	1 (2,0)
WB166	gp53	46 (93,9)	3 (6,1)
WB170	gp53	0 (0)	49 (100)
WB214	gp53	46 (93,9)	3 (6,1)

5.- El AcMo (WB216) preparado por Edwards y Sands (1990) a partir de la cepa del VPPC Baker/A y dirigido frente a la proteína viral gp48 mostró una reactividad alta (tabla IV.A.4).

**Tabla IV.A.4.** Reactividad de los aislados españoles frente al AcMo obtenido frente a la cepa de referencia Baker/A y dirigido frente a la proteína viral gp48.

AcMo	Proteína viral	Reactividad de los aislados españoles	
		Nº Positivos (%)	Nº Negativos (%)
WH216	gp48	31 (63,3)	18 (36,7)

6.- El AcMo (WH303) preparado por Edwards y Sands (1990) a partir de la cepa del VPPC 86/2 y dirigido frente a la proteína viral gp53 mostró una reactividad negativa (tabla IV.A.5).

**Tabla IV.A.5.** Reactividad de los aislados españoles frente al AcMo obtenido de la cepa de referencia 86/2 y dirigido frente a la proteína viral gp53.

AcMo	Proteína viral	Reactividad de los aislados españoles	
		Nº Positivos (%)	Nº Negativos (%)
WH303	gp53	0 (0)	49 (100)

7.- De los dos AcMos (WS381 y WS384) preparados por Paton *et al.* (1994) a partir de la cepa 87/6 del VEB de origen porcino y dirigidos frente a la proteína viral gp53, uno de ellos reaccionó con más de la mitad de las cepas mientras que el otro mostró una reactividad mayoritariamente negativa (tabla IV.A.6).

8.- El AcMo (WS363) preparado por Paton *et al.* (1994) a partir de la cepa del VEB 87/6 y dirigido frente a la proteína viral gp48 mostró una reactividad negativa (tabla IV.A.6).

**Tabla IV.A.6.** Reactividad de los aislados españoles frente a los AcMos obtenidos frente a la cepa 87/6 y que reaccionan con las proteínas virales gp53 y gp48.

AcMo	Proteína viral	Reactividad de los aislados españoles	
		Nº Positivos (%)	Nº Negativos (%)
WS381	gp53	2 (4,1)	47 (95,9)
WS384	gp53	26 (53,1)	23 (46,9)
WS363	gp48	0 (0)	49 (100)

9.- El AcMo (WV437) preparado por Paton *et al.* (1994) a partir de la cepa atípica porcina Vosges y dirigido frente a la proteína viral p80/125 sólo reconoció a las dos cepas pertenecientes al grupo de pestivirus atípicos (ver identificación de las cepas en el apartado IV.A.1.4) (tabla IV.A.7).

10.- El AcMo (WV438) preparado por Paton *et al.* (1994) a partir de la cepa atípica Vosges y dirigido frente a la proteína viral gp53 no reconoció ninguno de los aislados estudiados (tabla IV.A.7).

11.- El AcMo (WV433) preparado por Paton *et al.* (1994) a partir de la cepa atípica Vosges y dirigido frente a la proteína viral gp48 mostró una reactividad baja (tabla IV.A.7).

**Tabla IV.A.7.** Reactividad de los aislados españoles frente a los anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la cepa Vosges y dirigidos frente a las proteínas virales p80/125, gp53 y gp48.

AcMo	Proteína viral	Reactividad de los aislados españoles	
		Nº Positivos (%)	Nº Negativos (%)
WV437	p80/125	2 (4,1)	47 (95,9)
WV438	gp53	0 (0)	49 (100)
WV433	gp48	7 (14,3)	42 (85,7)

12.- El AcMo (WA548) preparado por Paton *et al.* (1994) a partir de la cepa atípica ovina 59386 y dirigido frente a la proteína viral p80/125 mostró una reactividad mayoritariamente negativa y reaccionó sólo con las dos cepas pertenecientes al grupo de pestivirus atípicos (tabla IV.A.8.).

13.- El AcMo (WA538) preparado por Paton *et al.* (1994) a partir de la cepa atípica ovina 59386 y dirigido frente a la proteína viral gp53 no reconoció ninguno de los aislados estudiados (tabla IV.A.8).

14.- El AcMo (WA536) preparado por Paton *et al.* (1994) a partir de la cepa atípica ovina 59386 y dirigido frente a la proteína viral gp48 mostró una reactividad baja (tabla IV.A.8).

**Tabla IV.A.8.** Reactividad de los aislados españoles frente a los anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la cepa 59386 y dirigidos a las proteínas virales p80/125, gp53 y gp48.

AcMo	Proteína viral	Reactividad de los aislados españoles	
		Nº Positivos (%)	Nº Negativos (%)
WA548	P80/125	2 (4,1)	47 (95,9)
WA538	gp53	0 (0)	49 (100)
WA536	gp48	5 (10,2)	44 (89,8)

#### IV.A.1.4. Caracterización de los aislados españoles del VDVB con los anticuerpos monoclonales utilizados

En 1986, Peter *et al.* describieron por primera vez el uso de AcMos para el estudio de los pestivirus. Estos primeros AcMos permitieron establecer la relación entre los epitopos y su función, la presentación de reacciones cruzadas y la localización de epitopos dentro de la estructura antigénica de estos virus.

La mayoría, sino todos, de aquellos primeros AcMos estaban dirigidos frente a proteína p80/125 y tuvieron una amplia utilización en las pruebas diagnósticas. Después han sido numerosos los grupos investigadores que han desarrollado paneles de anticuerpos monoclonales frente al VDVB y otros pestivirus. Uno de estos paneles es el desarrollado por Edwards *et al.* (1988) y es el que hemos utilizado en este trabajo.

Edwards *et al.* (1988) utilizando los AcMos WB115, WB160, WB162, WB163, WB165, WB166, WB170, WB210, WB212, WB214, WB215 y WB216 para caracterizar pestivirus aislados de rumiantes en el Reino Unido comprobaron que este panel de AcMos presentaba una gran variabilidad de reacciones con los aislados analizados. Nosotros también hemos comprobado esta gran variabilidad con los aislados españoles estudiados como queda reflejado en las tablas IV.A.9 a IV.A.11.

Como cabía esperar, todos los aislados estudiados reaccionaron positivamente con el AcMo no competitivo (reconoce todos los tipos de pestivirus) WB105, el cual ha reconocido todos los pestivirus analizados hasta la fecha en el CVL (Edwards *et al.*, 1988). Este AcMo nos sirvió como control positivo para establecer si los aislados pertenecían al grupo de los pestivirus.

Exceptuando el AcMo WB105, cinco son los AcMos que reaccionaron con más del 80% de los aislados españoles estudiados (WB160, WB166, WB210, WB212 y WB214). Uno de ellos se obtuvo de la cepa Oregon C24V y los otros cuatro a partir de la cepa NADL (tablas IV.A.2 y IV.A.3). En un estudio realizado por Paton *et al.* (1991a) estos AcMos también reconocieron a la mayoría de los aislados del VDVB.

Aunque algunos AcMos dirigidos frente a las proteínas gp53 y p80/125 reconocieron a más del 90% de los aislados (tabla IV.A.3) ningún AcMo salvo el anticuerpo no competitivo WB105, reconoció a todos los aislados estudiados. Este dato coincide con los resultados obtenidos por diversos grupos de investigación que tampoco encontraron ningún AcMo que reconociera de forma exclusiva a todos los aislados del VDVb (Bolin *et al.*, 1988; Corapi *et al.*, 1990; Deregt *et al.*, 1994; Edwards *et al.*, 1988; Paton *et al.*, 1991a; Xue *et al.*, 1990). Sin embargo, otros autores han descrito AcMos que reconocen a todos los aislados del VDVb (Cay *et al.*, 1989; McHugh *et al.*, 1988; Moennig *et al.*, 1987) pero probablemente esto se debe a que el número de cepas analizadas por estos investigadores fuera escaso.

El conjunto de los resultados con los AcMos utilizados permite afirmar que la mayoría de los aislados estudiados son similares entre sí y muy probablemente pertenecen a los aislados clásicos del VDVb. Estos datos apoyan lo manifestado por Edwards (1996a) en el sentido de que, a pesar de la considerable variabilidad antigénica descrita dentro de los aislados del VDVb, los aislados predominantes de este virus en el ámbito mundial son similares y parecidos a las cepas tipo del VDVb aislados de los Estados Unidos (p. ej. cepa NADL).

Dos de los aislados estudiados (14 y 17/94) se pueden encuadrar dentro del grupo de pestivirus atípicos por su patrón de reactividad con el panel de AcMos utilizado pero sobre todo con los AcMos obtenidos a partir de la cepa atípica porcina Vosges y de la cepa atípica ovina 59386 (Paton *et al.*, 1995). Hay que reseñar que estas dos cepas no se aislaron de muestras de animales sino de una línea celular establecida (GBK) procedente de la "American Type Culture Collection" (ATCC). Dado que las dos muestras de dicha línea celular nos llegaron de dos laboratorios españoles diferentes, los cuales la habían adquirido de la ATCC, pensamos que la línea celular venía contaminada de origen. Estas cepas pertenecen al biotipo NCP y su presencia en una línea celular no es extraña dado que la contaminación de líneas y cultivos celulares por cepas NCP del VDVb es relativamente frecuente (Dubovi, 1990).

El no haber encontrado ningún aislado de campo perteneciente al grupo de pestivirus atípicos no es extraño y coincide con los resultados obtenidos en otros países en los que la presencia de aislados pertenecientes a este grupo es vestigial (Edwards, 1996a).

Edwards y Sands (1990) estudiando aislados del VPPC describieron variaciones antigénicas entre aislados de diferentes países y entre aislados europeos de la fecha del estudio con respecto a aislados 10 años más antiguos. Sin embargo, con los AcMos y aislados estudiados en este trabajo no hemos encontrado variaciones antigénicas entre cepas según la zona geográfica del aislamiento.

Para hacer más comprensible la presentación de los resultados y discusión de nuestro estudio con los anticuerpos monoclonales utilizados hemos dividido a los mismos en tres grupos según la proteína que reconocen (gp53, gp48 y p80/125).

El primer grupo de AcMos se dirige frente a la glicoproteína de la envoltura gp53, la cual contiene una región hipervariable (Bolin, 1988; Bolin y Ridpath, 1989; Bolin *et al.*, 1991; Donis *et al.*, 1987a, 1991) y es la responsable de la generación de los anticuerpos

neutralizantes (Bolin *et al.*, 1988; Donis *et al.*, 1988; Magar *et al.*, 1988). Por ello, esta proteína tiene muchas posibilidades de ser utilizada como vacuna de subunidades (Paton *et al.*, 1996). Al parecer, son múltiples los epitopos de esta proteína implicados en la neutralización del virus (Bohr *et al.*, 1988) y, por ello, es importante conocer las diferencias antigénicas en esta proteína entre cepas del VDVB para evitar fallos vacunales.

Dentro del grupo de AcMos que reconocen la proteína gp53, dos anticuerpos (WB166 y WB214) reaccionaron con casi todos los aislados estudiados (93,9%), otros dos presentaron una reactividad intermedia (WS384 un 53,1% y WB215 un 36,8%) y el resto de AcMos presentaron una reactividad escasa o nula (0-8,2%). Esto confirma los datos publicados por diversos autores que señalan que los aislados del VDVB presentan un alto grado de variabilidad antigénica en esta proteína de la envoltura (Corapi *et al.*, 1990, 1991), a diferencia de lo que ocurre con los aislados del VPPC que presentan dominios más conservados para esta glicoproteína (Edwards y Sands, 1990; Paton *et al.*, 1995).

El que haya AcMos frente a la proteína gp53 que reconozcan a casi todos los aislados estudiados mientras que otros AcMos dirigidos frente a esa proteína no reconozcan a ninguno o casi ninguno de los aislados sugiere, además de la variabilidad antigénica de esta proteína, la existencia de epitopos altamente conservados y epitopos muy variables dentro de esta proteína entre aislados del VDVB. Este hecho ya ha sido observado por otros investigadores (Paton *et al.*, 1993).

Los AcMos obtenidos frente al virus de referencia del ganado vacuno Oregon C24V (WB115, WB162, WB163, WB165 y WB215) mostraron una reactividad muy baja con los aislados españoles (0-8,2%), con la excepción de uno de ellos, el WB215 que reconoció el 36,8% de los aislados. Por otra parte, los AcMos obtenidos frente al también virus de referencia bovino NADL (WB166, WB170 y WB214) presentaron valores extremos: uno de ellos (WB170) no reaccionó con ninguno de los aislados estudiados mientras que los otros dos (WB166 y WB214) reconocieron a casi todos los aislados (93,9%). Estos datos muestran una gran variabilidad en los dominios entre estas dos cepas de referencia y confirman otros estudios al respecto (Moennig *et al.*, 1989; Wensvoort *et al.*, 1989; Xue *et al.*, 1990). Además, diversos investigadores han estudiado mediante AcMos los epitopos de la glicoproteína gp53 en las cepas NADL y Oregon C24V y no se ponen de acuerdo en el número de dominios en los que se incluyen estos epitopos: dos según Paton *et al.* (1992), tres según Moennig *et al.* (1989) y cuatro según Xue *et al.* (1990). Según Paton *et al.* (1992) uno de estos dominios sólo está presente en la cepa NADL y otro es común a ambas cepas.

Los AcMos preparados por Edwards y Sands, (1990) y Paton *et al.*, (1994) a partir de las cepas del VPPC 86/2 (WH303), del VEB 87/6 (WS381 y WS384), atípica porcina Vosges (WV438) y atípica ovina 59386 (WA538) mostraron una reactividad mayoritariamente negativa. Sólo el AcMo WS384 mostró una reactividad media (53,1%). Estos datos sugieren que existen diferencias antigénicas significativas en la proteína gp53 entre el VDVB y el resto de los pestivirus. Además, el resultado obtenido con el AcMo WH303 confirma los datos obtenidos por otros investigadores en el sentido de que los AcMos que reconocen la proteína gp53 se pueden utilizar para diferenciar entre los aislados del VDVB y los del VPPC dadas las importantes diferencias antigénicas existentes en esa proteína entre ambos virus (Deregt *et al.*, 1994; Paton *et al.*, 1995).

Por tanto, los AcMos frente a la glicoproteína gp53 pueden ser de gran utilidad para fines diagnósticos, para comprobar la variabilidad antigénica entre aislados y para poder predecir la eficacia de las vacunas.

El segundo grupo de AcMos estudiados es el que se dirige frente a la glicoproteína de la envoltura gp48. Esta proteína induce títulos altos de anticuerpos pero con una capacidad limitada de neutralización del virus (Boulanger *et al.*, 1991; Ridpath *et al.*, 1994).

Los aislados españoles mostraron una reactividad muy variable frente a este grupo de AcMos según cual fuera la cepa de virus frente a la que fueron obtenidos estos anticuerpos. Así, el AcMo WB210 obtenido frente a la cepa del VDVB Oregon C24V presentó una reactividad muy alta (85,8%), el AcMo WH216 obtenido frente a la cepa del VPPC Baker/A presentó una reactividad elevada (63,3%), mientras que los anticuerpos obtenidos frente a la cepa atípica porcina Vosges (WV433), la cepa atípica ovina 59386 (WA536) y la cepa del VEB 87/6 (WS363) mostraron una reactividad escasa o nula.

El último grupo de AcMos estudiados es el que reconoce la proteína p80/125. Esta proteína es la más altamente conservada dentro de los pestivirus y anticuerpos frente a esta proteína del VDVB reaccionan con proteínas similares presentes en el VPPC y en el VEB (Paton *et al.*, 1991b; Wensvoort y Terpstra, 1988, 1989). El alto grado de conservación de la proteína p80/125 se puede deber a que es una proteína no estructural y, por tanto, no está expuesta a la presión selectiva del sistema inmune del hospedador de la misma forma en la que lo están las proteínas estructurales (Moennig *et al.*, 1987). Además, se ha comprobado que los bóvidos infectados por cepas de campo del VDVB, así como los vacunados con cepas vivas, desarrollan una intensa respuesta humoral frente a esta proteína, mientras que los animales vacunados con vacunas inactivadas no desarrollaban anticuerpos frente a esta proteína no estructural (Donis *et al.*, 1995).

Como era de esperar por lo descrito por diversos autores (Edwards, 1988; Paton *et al.*, 1995), los AcMos dirigidos frente a esta proteína y obtenidos frente a la cepa del VDVB NADL (WB160 y WB212) reconocieron mayoritariamente (93,9 y 98,0%, respectivamente) a los aislados españoles estudiados. Sin embargo, los AcMos obtenidos frente a la cepa atípica porcina Vosges (WV437) y frente a la cepa atípica ovina 59386 (WA548) reaccionaron sólo con los dos aislados pertenecientes al grupo de pestivirus atípicos. Estos datos sugieren que a pesar de que la proteína p80/125 está altamente conservada dentro de los pestivirus existen epitopos específicos de los pestivirus atípicos con respecto a los aislados clásicos del VDVB. Por tanto, los AcMos que reconocen dichos epitopos podrían utilizarse para diferenciar los aislados clásicos del VDVB de los pestivirus atípicos.

#### **IV.A.1.5. Representación gráfica de los resultados obtenidos con los anticuerpos monoclonales estudiados y los aislados españoles del VDVB**

Los datos de la reactividad de los AcMos con los aislados españoles del VDVB (tabla IV.A.9) y con las cepas de referencia (tablas III.A.12 a III.A.15) se usaron para construir tanto el árbol que muestra las relaciones filogenéticas de algunos de los pestivirus

de rumiantes (figura 11) como el mapa de la distancia antigénica para los diferentes aislados españoles (figura 12).

En estas dos representaciones gráficas no se incluyeron todos los aislados españoles del VDVB estudiados debido a que muchos de esos aislados son similares y al incluir los datos de todos los aislados muchos de esos datos se superponían unos con otros dificultando la interpretación de estas representaciones gráficas.

Viendo las figuras se observa que la mayoría de los aislados españoles son similares pero que se pueden diferenciar dos grupos de aislados. Casi todos los aislados españoles estudiados (47 de 49 -95,9%-), junto con las cepas de referencia del VDVB y las cepas Deer y Giraffe, pertenecen al grupo de los aislados clásicos del VDVB. Las cepas Deer y Giraffe parecen ligeramente diferentes del resto de los aislados clásicos del VDVB pero no puede establecerse si constituyen o no un grupo aparte (Paton *et al.*, 1995). Es importante destacar que la pertenencia a uno de los grupos de pestivirus no implica que los aislados sean antigénicamente homogéneos (Edwards *et al.*, 1988). Como ya se mencionó en el punto IV.A.4, sólo dos aislados estudiados se incluyen dentro del grupo de pestivirus atípicos y ambos fueron aislados de una línea celular.

Hay que reseñar que las representaciones gráficas de las cepas de referencia del VDVB de ganado vacuno NADL y Oregon C24V quedaron distorsionadas debido a que la mayoría de los AcMos utilizados se han obtenido frente a dichas cepas (Edwards *et al.*, 1988; Paton *et al.*, 1992).

Los paquetes informáticos como el MAP, que sirve para establecer la distancia antigénica entre las cepas, o el PHYLIP, que analiza los resultados cualitativamente y establece las relaciones filogenéticas entre cepas, permiten presentar los resultados de análisis de las cepas con AcMos bien como mapa de distancia antigénica o bien como diagrama de árbol. En su día, estos programas informáticos sirvieron para comprobar que el anterior criterio de clasificación de los pestivirus no era correcto y colaboraron en el establecimiento de la actual propuesta de clasificación de estos virus. Sin embargo, hoy en día, estos paquetes informáticos tienen utilidad casi exclusivamente como forma de clasificación de los aislados en los distintos grupos de pestivirus pero son menos válidos para determinar relaciones de parentesco entre aislados estrechamente relacionados o muy similares antigénicamente.

A modo de resumen podemos decir que los AcMos en el estudio del VDVB y otros pestivirus son útiles para identificar y clasificar los pestivirus, identificar variaciones en la glicoproteína gp53 (responsable de la neutralización del virus) y elaborar árboles filogenéticos de gran utilidad en los estudios epidemiológicos dado que permiten establecer patrones en la propagación de enfermedades. El llegar a conocer qué grado de diversidad existe dentro de las diversas cepas de pestivirus aisladas es un reto importante, aún pendiente de resolver.

		anti-gp48					anti-p80/125			anti-gp53														
		4	3	2	2	5	4	5	1	2	1	1	2	1	3	1	1	3	3	4	5	2	1	1
		3	6	1	1	3	3	4	6	1	6	6	1	6	0	1	6	8	8	3	3	1	7	0
		3	3	6	0	6	7	8	0	2	3	5	5	6	3	5	2	1	4	8	8	4	0	5
E S P A Ñ O L E S A I S L A D O S  V D V B	1/89																							
	2/90																							
	10/92																							
	11/93																							
	15/93																							
	León1																							
	León2																							
	León3																							
	RIBO																							
	E1494/92																							
	3/90																							
	7/91																							
	12/93																							
	13/93																							
	14																							
	16/94																							
	17/94																							
	19/94																							
	20/94																							

**Tabla IV.A.9.** Descripción de la reactividad de los anticuerpos monoclonales usados en el experimento con los aislados españoles del VDVB mediante una prueba de Inmunoperoxidasa. Los cuadros en blanco indican una reacción negativa, los cuadros en negro indican una reacción positiva y los cuadros en gris indican que la reacción positiva afecta a menos del 50% de las células infectadas. Los cuadros rayados horizontalmente corresponden a cepas de las que no se disponen resultados para ese anticuerpo monoclonal correspondiente. El monoclonal sombreado no fué introducido en los paquetes informáticos utilizados para analizar los resultados.

(Continuación)

		anti-gp48					anti-p80/125				anti-gp53													
		4	3	2	2	5	4	5	1	2	1	1	2	1	3	1	1	3	3	4	5	2	1	1
		3	6	1	1	3	3	4	6	1	6	6	1	6	0	1	6	8	8	3	3	1	7	0
		3	3	6	0	6	7	8	0	2	3	5	5	6	3	5	2	1	4	8	8	4	0	5
E S P A Ñ O A I L S D E S	21/94	■		■	■	■				■			■					■						
	22/94	■								■			■					■						
	23/94	■								■			■					■						
	25/94	■								■			■					■						
	26/94	■								■			■					■						
	31/94	■								■			■					■						
	32/94	■								■			■					■						
	33/95									■			■					■						
	34/95									■			■					■						
	35/95									■			■					■						
	37/95									■			■					■						
	38/95									■			■					■						
	39/95									■			■					■						
	41/95									■			■					■						
	42/95	■								■			■					■						
	43/95									■			■					■						
	46/95									■			■					■						
47/95									■			■					■							
5/91									■			■					■							

**Tabla IV.A.9.** Descripción de la reactividad de los anticuerpos monoclonales usados en el experimento con los aislados españoles del VDVB mediante una prueba de Inmunoperoxidasa. Los cuadros en blanco indican una reacción negativa, los cuadros en negro indican una reacción positiva y los cuadros en gris indican que la reacción positiva afecta a menos del 50% de las células infectadas. El monoclonal sombreado no fue introducido en los paquetes informáticos utilizados para analizar los resultados.

(Continuación)

		anti-gp48					anti-p80/125				anti-gp53													
E		4	3	2	2	5	4	5	1	2	1	1	2	1	3	1	1	3	3	4	5	2	1	1
S		3	6	1	1	3	3	4	6	1	6	6	1	6	0	1	6	8	8	3	3	1	7	0
P		3	3	6	0	6	7	8	0	2	3	5	5	6	3	5	2	1	4	8	8	4	0	5
A																								
Ñ																								
A	6/91																							
O	8/91																							
I	9/91																							
S	8SV																							
L	13SV																							
A	14SV																							
D	16SV																							
O	24/94																							
S	3002																							
V	45/95																							
D																								
V																								
B																								

**Tabla IV.A.9.** Descripción de la reactividad de los anticuerpos monoclonales usados en el experimento con los aislados españoles del VDVB mediante una prueba de Inmunoperoxidasa. Los cuadros en blanco indican una reacción negativa, los cuadros en negro indican una reacción positiva y los cuadros en gris indican que la reacción positiva afecta a menos del 50% de las células infectadas. El monoclonal sombreado no fue introducido en los paquetes informáticos utilizados para analizar los resultados

Figura 11. Relación filogenética de alguno de los pestivirus de rumiantes. Este árbol representa un consenso de cientos de árboles derivados de la misma base de datos.

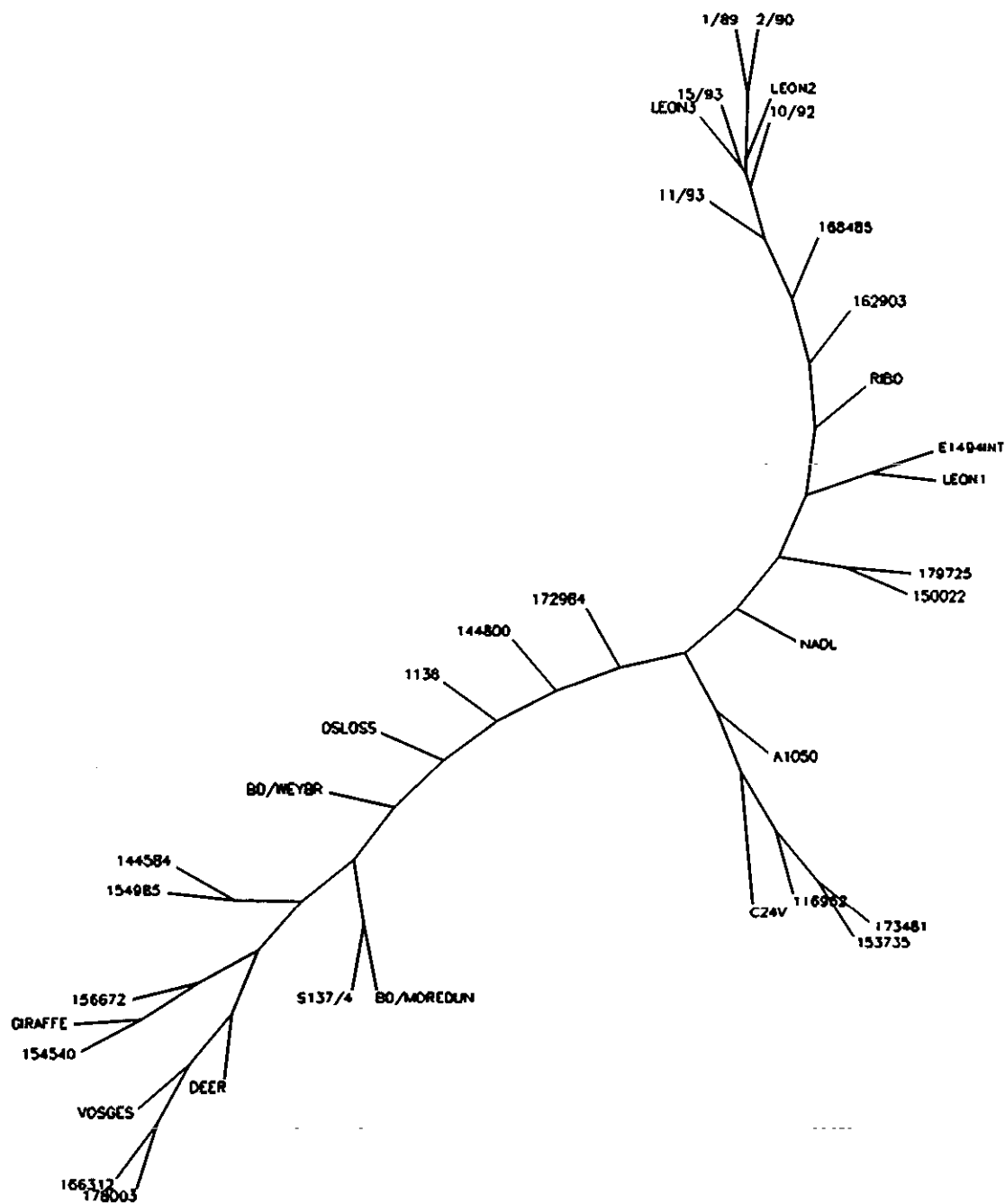
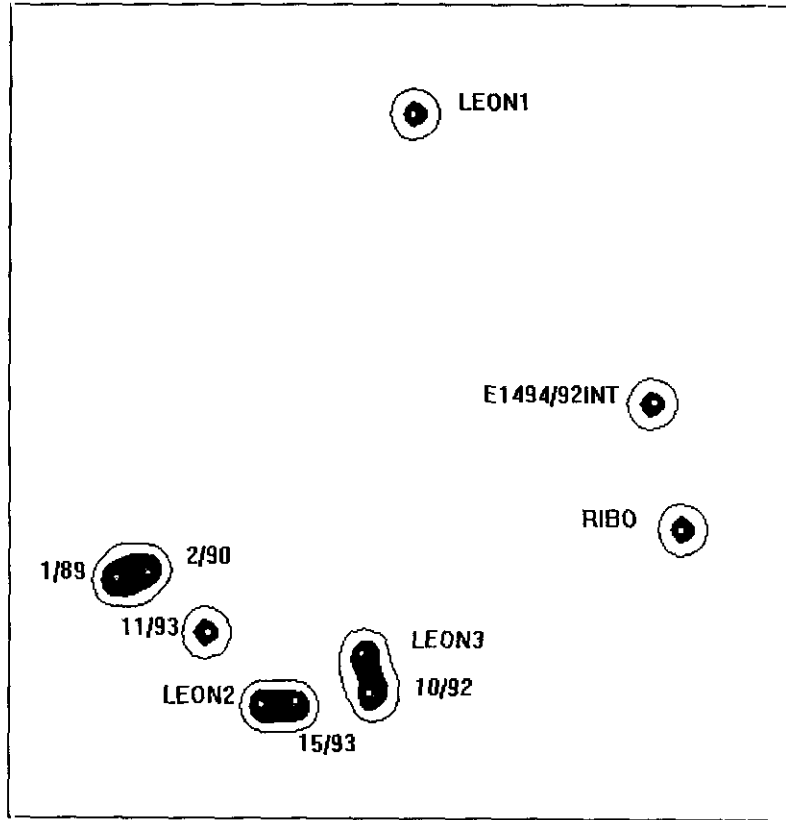


Figura 12. Mapa antigénico correspondiente a los diferentes virus españoles, analizados cualitativamente mediante un programa de distancias antigénicas "MAP".



**Figura 10.** Porcentaje de aislados españoles que reaccionan con los diferentes anticuerpos monoclonales dirigidos frente a las proteínas gp53, gp48 y p80/125

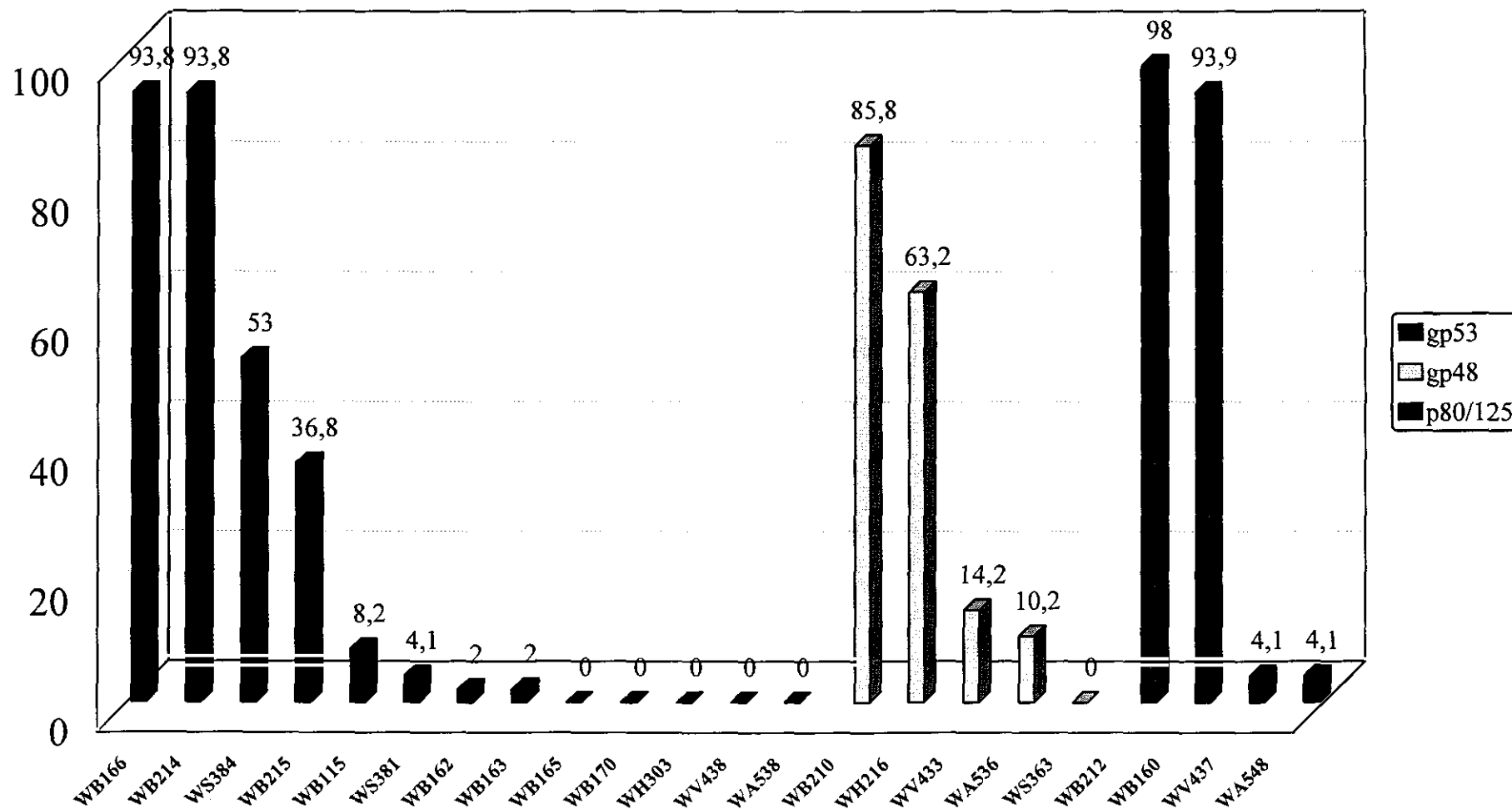
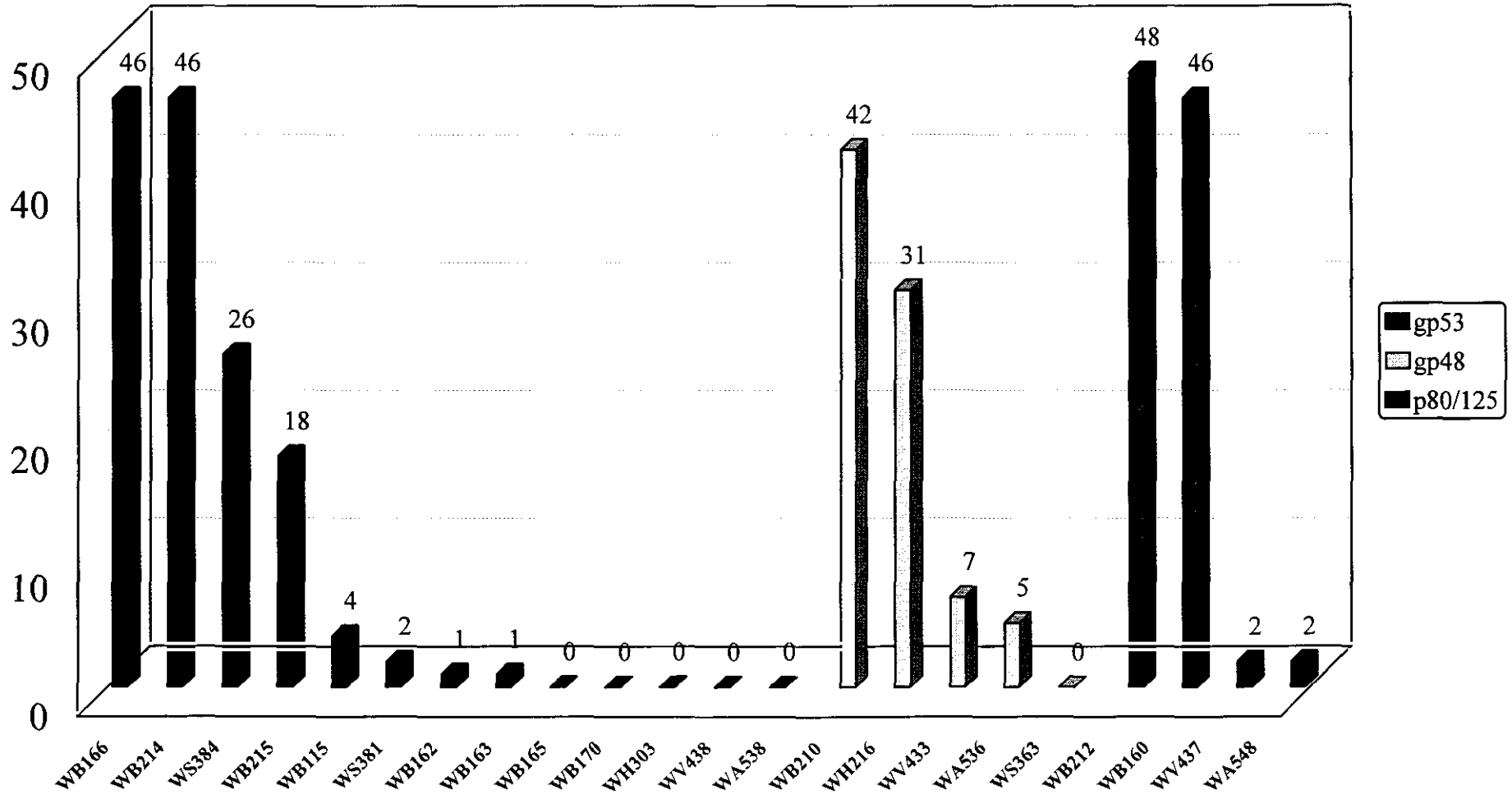


Figura 11. N° de aislados españoles que reaccionan con los anticuerpos monoclonales dirigidos frente a las proteínas gp53, gp48 y p80/125



## IV.B.1. SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE AL VDVB EN EL GANADO BOVINO DE LA CAM

### IV.B.1.1. Muestreo

En el apartado de material y métodos dedicado al muestreo se calculó el número de animales a muestrear con las condiciones fijadas (2988 animales), su reparto teórico en los diferentes estratos considerados, así como la selección ideal por conglomerados de las unidades de muestreo.

En la tabla IV.B.1 se detalla el resultado del muestreo, es decir, la muestra real utilizada específicamente para cada subgrupo, el número de explotaciones y el número de animales muestreados. Como se expone en dicha tabla, se muestrearon en total 2634 animales (1085 de leche, 1042 de carne y 507 de cebo) correspondientes a 242 explotaciones (111 de leche, 97 de carne y 34 de cebo).

**Tabla IV.B.1.** Número de animales y explotaciones que se analizaron por estrato del total de la población.

Áreas geográficas	VACUNO ORDEÑO		VACUNO NO ORDEÑO		CEBO		Total áreas geográficas
	N° Animales/ N° Explotaciones		N° Animales/ N° Explotaciones		N° Animales/ N° Explotaciones		
	< 100	> 100	< 100	> 100	< 100	> 100	
01	174/28	125/4	214/25	71/5	42/4	0/0	626/66
02	156/19	21/1	259/27	55/4	163/7	20/4	674/62
03	236/27	110/5	190/16	50/3	123/10	46/2	755/63
04	117/22	146/5	171/15	32/2	105/6	8/1	579/51
<b>Total Estratos</b>	683/96	402/15	834/83	208/ 14	433/27	74/7	<b>2634/242</b>

La justificación al desvío de la muestra real utilizada (2634 animales) con respecto al número de animales que nos propusimos muestrear inicialmente (2988 animales) se explica porque en las explotaciones seleccionadas hubo algunas muestras que no pudieron encontrarse en el banco de sueros y otras que por conveniencia se añadieron al estudio (por ejemplo si había más de un semental en la explotación).

Asimismo, del tamaño muestral se excluyeron aquellos grupos de animales procedentes de explotaciones con tipologías mixtas que no se correspondían con la cuantificación de la capacidad productiva de la explotación (VOR, VNO, PCV), seleccionándose sólo aquellos animales que entraban dentro de la tipología establecida para cada explotación según la sistemática expuesta en el apartado III.B.1.2.2.1 de material y métodos. Esto explica el que en el área geográfica 01 para la aptitud cebo en explotaciones mayores de 100 animales no se seleccionara explotación alguna a pesar de existir 1540 animales repartidos en explotaciones con una tipología que no se correspondía con la propia del cebo según los criterios expuesto en material y métodos.

#### IV.B.1.2. Seroprevalencia de anticuerpos frente al VDVB

La seroprevalencia de Acs frente al VDVB en el ganado bovino de la CAM estimada en este estudio fue del 65,6% (tabla IV.B.2). La prevalencia de explotaciones con al menos un animal seropositivo fue del 94,2%. Estos resultados son ligeramente superiores a los encontrados en otros estudios realizados en España en el caso de la seroprevalencia de anticuerpos en animales y prácticamente iguales en el caso de la seroprevalencia por explotaciones. Asimismo, nuestros resultados coinciden en general con los publicados en otros países tanto en la proporción de animales como de explotaciones seropositivas. En 1971 Ovejero en una reducida encuesta serológica realizada con 117 sueros bovinos de 5 provincias (Madrid, Navarra, Segovia, Valladolid y León) encontró una seroprevalencia media del 47,8% y más concretamente una seroprevalencia del 50% en la provincia de Madrid. Posteriormente, Castro *et al.* (1984) sobre 2118 sueros de animales en su mayoría de aptitud cárnica de explotaciones con y sin antecedentes de procesos entéricos y respiratorios encontraron una seroprevalencia media del 43,5% que para la Comunidad de Madrid se elevaba al 59,7%. Aunque en ninguno de estos dos trabajos se indicaba el porcentaje de rebaños seropositivos, ambos estudios son de gran valor ya que, cuando se realizaron, todavía en España no se utilizaban vacunas frente al VDVB. Más recientemente, Prieto *et al.* (1988) realizaron una encuesta serológica en vacuno lechero de la región asturiana sobre un total de 180 animales pertenecientes a 45 explotaciones de tamaño pequeño-mediano (entre 12 y 20 hembras adultas) en las que nunca se había vacunado frente al VDVB. Estos autores encontraron una prevalencia de animales seropositivos del 48,8% y una prevalencia de explotaciones con al menos un animal seropositivo del 84,4%. Álvarez *et al.* (1994a) en un estudio reciente sobre 5403 sueros de 188 explotaciones de ganado frisón de la provincia de León encontraron una prevalencia de animales seropositivos del 51,3% y una prevalencia de explotaciones del 91,5%. Del mismo modo, Marín (1997) sobre un total de 2311 animales con trastornos reproductivos de Extremadura encontró una seroprevalencia del 53,3%. Finalmente, Sánchez (1998) sobre 203 sueros pertenecientes a 10 explotaciones de ganado bravo de las 35 existentes en la provincia de Badajoz encontró una prevalencia de animales seropositivos del 65% y una prevalencia de explotaciones del 90%.

Los estudios de prevalencia de rebaños realizados en distintos países demuestran que, salvo en algún país como Finlandia (sólo 3% de explotaciones infectadas), la mayoría de las explotaciones (entre un 73 y un 100%) sufren la infección (Houe, 1995). Como ya hemos indicado, se encontró que la prevalencia por explotación fue del 94,2%, pero con ligeras diferencias según la aptitud de los animales de la explotación. Así, encontramos un 100% de explotaciones seropositivas en el ganado de cebo, un 95,9% en el ganado de carne y un 91% en el de leche. Nuestros resultados, por lo tanto, estarían de acuerdo con lo apuntado por Hjerpe (1990) en el sentido de que lo normal es que sólo ocasionalmente se encuentren explotaciones, especialmente las pequeñas y/o cerradas y/o aisladas, libres de la infección.

En la tabla IV.B.2 se detallan los resultados de la prueba ELISA con el criterio de valoración semicuantitativo empleado en el total de los animales investigados. Entre los animales que fueron positivos a la prueba el resultado semicuantitativo más frecuente fue (++++) (37,8% del total de los animales, un 57,6% de los positivos), seguido de (+++++) (13,1 % del total de los animales, un 19,9% de los positivos) (tabla IV.B.2). La seroprevalencia de título alto (TA) (59,8%) fue ligeramente inferior a la seroprevalencia global. El título medio (TM) de Acs, de acuerdo con el criterio de cálculo expuesto en el apartado correspondiente de material y métodos, en el conjunto de la población fue 2,524 ( $\pm 1,976$ ).

**Tabla IV.B.2.** Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en el total de animales investigados.

<b>RESULTADO</b>	<b>Nº ANIMALES</b>	<b>%</b>
<b>Negativo</b>	906	34,4
(+)	66	2,5
(++)	88	3,3
(+++)	234	8,9
(++++)	996	37,8
(+++++)	344	13,1
<b>Total</b>	<b>2634</b>	<b>100.0</b>
<b>Seroprevalencia:</b>	<b>65,6%</b>	
<b>Seroprevalencia Título Alto:</b>	<b>59,8%</b>	
<b>Título Medio:</b>	<b>2,524</b>	
<b>Desviación Estándar:</b>	<b>1,976</b>	

Paton *et al.* (1991) utilizando un ELISA de competición, similar al usado por nosotros en este estudio y dirigido frente a la proteína p80, encontraron una correlación positiva entre los resultados de absorbancia del ELISA y los títulos de seroneutralización. Dando por buena esta correlación y teniendo en cuenta los estudios realizados por Houe *et al.* (1995a), es posible que el TA, tal y como lo hemos definido en este estudio, pudiera utilizarse para predecir la presencia o no de animales PI en las explotaciones mediante el análisis serológico de un número reducido de animales de la explotación. Y ello en base a que los títulos de Acs de los animales de las explotaciones con animales PI son mayores que los de las explotaciones sin

## Resultados y discusión

animales PI, incluso cuando se utilizan vacunas inactivadas (Houe, *et al.*, 1995a). De acuerdo con los estudios de Houe *et al.* (1995a), si las explotaciones no utilizan vacunas o solo usan vacunas inactivadas, el análisis serológico de un pequeño número de animales de la explotación puede utilizarse como un indicador indirecto de la presencia o no de animales PI. El método propuesto por Houe *et al.* (1995a) consiste en estudiar el título de Acs neutralizantes en cinco animales de la explotación del grupo de 9 a 18 meses y clasificarlos en animales con título alto ( $> 128$ ) o con título bajo ( $< 64$ ). En las explotaciones con animales PI la probabilidad de obtener al menos 3 animales con título alto es mayor del 99% mientras que en las explotaciones sin animales PI la probabilidad es menor del 1% en las que utilizan vacunas inactivadas y menor del 0,1% en las que no usan dichas vacunas.

Los resultados de seroprevalencia global, de seroprevalencia de TA y de TM en los tres estratos en que se dividieron los animales por su aptitud fueron muy homogéneos (tabla IV.B.3) no encontrándose diferencias significativas en ninguno de los casos.

**Tabla IV.B.3.** Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB por aptitudes.

RESULTADOS	APTITUD					
	LECHE		CARNE		CEBO	
	Nº Animales	%	Nº Animales	%	Nº Animales	%
Negativo	380	35,0	357	34,3	169	33,3
(+)	26	2,4	34	3,3	6	1,2
(++)	39	3,6	31	3,0	18	3,6
(+++)	108	10,0	87	8,3	39	7,7
(++++)	425	39,2	361	34,6	210	41,4
(+++++)	107	9,9	172	16,5	65	12,8
<b>Total</b>	<b>1085</b>	<b>100,0</b>	<b>1042</b>	<b>100,0</b>	<b>507</b>	<b>100,0</b>

Seroprevalencia:	64,9%	65,7%	66,7%
Seroprevalencia Título Alto:	59,0%	59,4%	61,9%
Título Medio:	2,454	2,554	2,611
Desviación Estándar:	1,943	2,014	1,966

La seroprevalencia por áreas geográficas osciló entre el 61,7% de la 4 y el 69,2% de la 1 (tabla IV.B.4). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la seroprevalencia del área geográfica 4 y las seroprevalencias de la 1 ( $p < 0,01$ ) y de la 3 ( $p < 0,05$ ). No obstante, ni en la prevalencia de TA ni en el TM se encontraron diferencias significativas entre los resultados de las cuatro áreas geográficas consideradas (tabla IV.B.4)

Tabla IV.B.4. Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB por áreas geográficas.

ÁREAS GEOGRÁFICAS								
RESULTADOS	1		2		3		4	
	Nº Animales	%	Nº Animales	%	Nº Animales	%	Nº Animales	%
Negativo	193	30,8	242	35,9	249	33,0	222	38,3
(+)	28	4,5	11	1,6	15	2,0	12	2,1
(++)	20	3,2	23	3,4	31	4,1	14	2,4
(+++)	59	9,4	52	7,7	76	10,1	47	8,1
(++++)	236	37,7	249	36,9	295	39,1	216	37,3
(+++++)	90	14,4	97	14,4	89	11,8	68	11,7
<b>TOTAL</b>	<b>626</b>	<b>100,0</b>	<b>674</b>	<b>100,0</b>	<b>755</b>	<b>100,0</b>	<b>579</b>	<b>100,0</b>
Seroprevalencia:	69,2%		64,1%		67,0%		61,7%	
Seroprevalencia Título Alto:	61,5%		59,0%		61,0%		57,1%	
Título Medio:	2,618		2,513		2,556		2,392	
Desviación Estándar:	1,949		2,011		1,939		2,009	

Son varios los trabajos que describen diferencias significativas en la prevalencia en función del área geográfica. Así, Harkness *et al.* (1978) en un estudio sobre 1593 animales de 133 rebaños en Inglaterra y Gales encontraron una seroprevalencia de Acs frente al VDVB por animales del 62,5%. Esta prevalencia varió entre el 43 y el 79% entre las diferentes regiones estudiadas. En otro trabajo realizado por Niskanen *et al.* (1991) en Suecia se encontró una diferencia en la seroprevalencia, que osciló entre el 76% en el sur con una mayor producción lechera y el 21% del norte con bajo censo bovino. Similares resultados han sido descritos por Loken *et al.*, (1991) en Noruega, donde una encuesta serológica realizada sobre 1133 animales de 187 rebaños mostró una seroprevalencia baja en el norte (6,5%) y alta en el sureste (24,2%). Estos países nunca han usado la vacunación en sus programas de control. Las altas prevalencias en el sur de Noruega y Suecia comparadas con las regiones del norte de estos países pueden explicarse por el hecho de que la prevalencia de la infección por el VDVB tiende a incrementarse a medida que aumenta el censo de bovinos en una zona (Houe 1995). En nuestro estudio los resultados de prevalencia coinciden con lo manifestado anteriormente y el área geográfica con mayor censo -el área geográfica 01 con 21032 animales (36,83%)- es la que presenta la prevalencia global más alta (69,2%) en contraposición con el área geográfica 04 con 10066 animales (17,62%) y una prevalencia del 61,7%.

Los resultados de seroprevalencia global, de seroprevalencia de TA y de TM de las explotaciones con menos de 100 animales fueron muy similares a las halladas en las explotaciones de más de 100 animales, no encontrándose diferencias significativas entre ellas (tabla IV.B.5).

**Tabla IV.B.5.** Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB por tamaño de explotación.

RESULTADOS	TAMAÑO DE EXPLOTACION			
	<100		>100	
	Nº Animales	%	Nº Animales	%
Negativo	673	34,5	233	34,1
(+)	47	2,4	19	2,8
(++)	63	3,2	25	3,7
(+++)	171	8,8	63	9,2
(++++)	735	37,7	261	38,2
(+++++)	261	13,4	83	12,1
<b>TOTAL</b>	<b>1950</b>	<b>100,0</b>	<b>684</b>	<b>100,0</b>

Seroprevalencia:	65,5%	65,9%
Seroprevalencia Título Alto:	59,9%	59,5%
Título Medio:	2,529	2,510
Desviación Estándar:	1,982	1,961

Estos resultados no coinciden con los encontrados por otros autores como Georgier *et al.* (1996), quienes encontraron diferencias significativas en la seroprevalencia entre granjas dependiendo del tamaño. Así, estos investigadores encontraron que las granjas grandes (600 a 800 vacas lecheras) presentaban una prevalencia del 43,6 al 62,3% y las granjas pequeñas (50 a 60 animales) una prevalencia del 15 al 16%. Houe (1996) sostiene también que el tamaño del rebaño puede jugar un papel importante en la prevalencia de la infección por el VDVB. Y así, cuatro países como Finlandia, Noruega, Suecia y Dinamarca donde el tamaño de los rebaños varía de más a menos en el orden en que aparecen escritos, ven disminuida la prevalencia de la infección en la misma dirección. De acuerdo con Houe (1996) parece razonable asumir que, en cualquier caso y en igualdad de condiciones, los rebaños grandes son infectados más fácilmente que los rebaños pequeños. Además, la infección de un rebaño en una zona con explotaciones grandes tiene un impacto mayor sobre la prevalencia global de la infección en comparación con zonas donde predominan los rebaños pequeños porque una vez que un rebaño, grande o pequeño, es infectado probablemente el resto de animales verá favorecido su infección más pronto o más tarde.

En la tabla IV.B.6 se muestran los resultados de la detección de Acs frente al VDVB en función de la aptitud y del tamaño de la explotación. Comparando los resultados obtenidos en las diferentes aptitudes en los bovinos de explotaciones de más de 100 y menos de 100 animales no se encontraron diferencias significativas en el caso de la leche ni en la prevalencia, ni en la prevalencia de TA ni en el TM. Sin embargo, la prevalencia en el ganado bovino de explotaciones de carne con más de 100 animales (73,1%) fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que la encontrada en el de menos de 100 animales (63,9%), si bien en la prevalencia de TA y en el TM no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Estos datos irían en el sentido de lo manifestado anteriormente con respecto al tamaño de la explotación. Por otra parte, en las explotaciones de cebo menores de 100 animales la

prevalencia, la prevalencia de TA y el TM fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) que los correspondientes a las explotaciones de más de 100 animales (tabla IV.B.6.).

Los resultados de la detección de Acs en los animales de explotaciones lecheras de menos de 100 vacas en las cuatro áreas geográficas consideradas se detallan en la tabla IV.B.7. Tanto la prevalencia, como la prevalencia de TA y como el TM en el área geográfica 4 fueron significativamente menores en comparación con el resto de las áreas geográficas (prevalencia  $p < 0,0001$  en todos los casos, prevalencia TA  $p < 0,001$  con respecto a la 1 y  $p < 0,01$  con respecto a la 2 y 3; TM  $p < 0,05$  con respecto a la 2 y  $p < 0,001$  con la 1 y la 3).

En la tabla IV.B.8 figuran los resultados obtenidos en las explotaciones lecheras con más de 100 animales por áreas geográficas. La prevalencia en el área geográfica 2 (19,1%) fue significativamente menor que en las otras tres áreas geográficas (80,8% en la 1,  $p < 0,0001$ ; 61,8% en la 3,  $p < 0,001$ ; 58,9% en la 4,  $p < 0,01$ ), si bien hay que tener en cuenta que en el área 2 sólo se muestreó una explotación con más de 100 animales. Además, se encontraron diferencias significativas entre la prevalencia en el área geográfica 1 y las prevalencias en el área geográfica 3 ( $p < 0,01$ ) y en la 4 ( $p < 0,001$ ). En la prevalencia de TA se encontraron las mismas diferencias señaladas para la prevalencia. En el TM se encontraron, asimismo, diferencias significativas entre el área geográfica 2 con el resto ( $p < 0,001$  con respecto a la 1 y  $p < 0,01$  con respecto a la 3 y la 4) y entre la 1 y la 4 ( $p < 0,05$ ).

En el ganado bovino de carne de explotaciones de menos de 100 animales no se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos en las distintas áreas geográficas (tabla IV.B.9).

En el ganado bovino de explotaciones de carne mayores de 100 animales se encontró que la prevalencia del área geográfica 3 (96,0%) fue significativamente mayor que en el resto de las áreas geográficas consideradas (67,6% en la 1,  $p < 0,001$ ; 74,5% en la 2,  $p < 0,001$ ; 46,9% en la 4,  $p < 0,001$ ). Además, también se observó que la prevalencia en el área geográfica 2 fue significativamente mayor que en la 4 ( $p < 0,05$ ) (tabla IV.B.10). Las mismas diferencias estadísticas entre áreas geográficas se encontraron al comparar la prevalencia de TA y el TM, excepción hecha del caso del TM entre las áreas geográficas 3 y 2, que no mostró diferencias significativas (tabla IV.B.10).

En la tabla IV.B.11 se muestran los resultados obtenidos en el ganado bovino de cebo de explotaciones de menos de 100 animales por áreas geográficas. Comparando los resultados de prevalencia y de prevalencia de TA se encontró que el área geográfica 4 mantenía diferencias significativas con las otras tres áreas geográficas (prevalencia  $p < 0,01$  con respecto a la 1,  $p < 0,05$  con respecto a la 2 y  $p < 0,001$  con respecto a la 3; prevalencia de TA  $p < 0,001$  con respecto a la 1 y la 2 y  $p < 0,001$  con respecto a la 3). En el TM únicamente se encontraron diferencias significativas entre la 4 y la 3 ( $p < 0,01$ ).

El número de explotaciones de cebo con más de 100 animales así como el número de animales muestreados de estas explotaciones no permiten realizar una comparación por área geográfica.

**Tabla IV.B.6.** Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB por aptitudes y tamaño de explotación.

RESULTADOS	APTITUD											
	LECHE				CARNE				CEBO			
	<100		>100		<100		>100		<100		>100	
	Nº Animales	%	Nº Animales	%	Nº Animales	%	Nº Animales	%	Nº Animales	%	Nº Animales	%
<b>Negativo</b>	237	34,7	143	35,6	301	36,1	56	26,9	135	31,2	34	45,9
<b>(+)</b>	18	2,6	8	2,0	24	2,9	10	4,8	5	1,2	1	1,4
<b>(++)</b>	24	3,5	15	3,7	24	2,9	7	3,4	15	3,5	3	4,1
<b>(+++)</b>	68	10,0	40	10,0	69	8,3	18	8,7	34	7,9	5	6,8
<b>(++++)</b>	268	39,2	157	39,1	279	33,5	82	39,4	188	43,4	22	29,7
<b>(+++++)</b>	68	10,0	39	9,7	137	16,4	35	16,8	56	12,9	9	12,2
<b>Total</b>	683	100,0	402	100,0	834	100,0	208	100,0	433	100,0	74	100,0
<b>Seroprevalencia:</b>	65,3%		64,4%		63,9%		73,1%		68,8%		54,1%	
<b>Seroprevalencia Título Alto:</b>	59,2%		58,8%		58,2%		64,9%		64,2%		48,7%	
<b>Título Medio:</b>	2,463		2,440		2,494		2,793		2,700		2,095	
<b>Desviación Estándar:</b>	1,942		1,948		2,033		1,921		1,938		2,062	

**Tabla IV.B.7.** Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en explotaciones de leche de menos de 100 animales por áreas geográficas.

APTITUD LECHE								
EXPLORACIONES < 100								
ÁREAS GEOGRÁFICAS								
	1		2		3		4	
<b>RESULTADOS</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>
<b>Negativo</b>	50	28,7	54	34,6	68	28,8	65	55,6
(+)	7	4,0	3	1,9	6	2,5	2	1,7
(++)	6	3,4	3	1,9	13	5,5	2	1,7
(+++)	14	8,0	18	11,5	27	11,4	9	7,7
(++++)	73	42,0	62	39,7	103	43,6	30	25,6
(+++++)	24	13,8	16	10,3	19	8,1	9	7,7
<b>Total</b>	<b>174</b>	<b>100,0</b>	<b>156</b>	<b>100,0</b>	<b>236</b>	<b>100,0</b>	<b>117</b>	<b>100,0</b>
<b>Seroprevalencia:</b>		<b>71,3%</b>		<b>65,4%</b>		<b>71,2%</b>		<b>44,4%</b>
<b>Seroprevalencia Título Alto:</b>		<b>63,8%</b>		<b>61,5%</b>		<b>63,1%</b>		<b>41,0%</b>
<b>Título Medio:</b>		<b>2,718</b>		<b>2,506</b>		<b>2,627</b>	<b>1,692</b>	
<b>Desviación Estándar:</b>		<b>1,922</b>		<b>1,949</b>		<b>1,840</b>	<b>1,993</b>	

**Tabla IV.B.8.** Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en explotaciones de leche de más de 100 animales por áreas geográficas.

APTITUD LECHE								
EXPLORACIONES >100 ÁREAS GEOGRÁFICAS								
	1		2		3		4	
RESULTADOS	Nº Animales	%	Nº Animales	%	Nº Animales	%	Nº Animales	%
<b>Negativo</b>	24	19,2	17	81,0	42	38,2	60	41,1
(+)	4	3,2	0	0,0	2	1,8	2	1,4
(++)	6	4,8	1	4,8	4	3,6	4	2,7
(+++)	18	14,4	2	9,5	10	9,1	10	6,8
(++++)	53	42,4	0	0,0	46	41,8	58	39,7
(+++++)	20	16,0	1	4,8	6	5,5	12	8,2
<b>Total</b>	125	100,0	21	100,0	110	100,0	146	100,0
<b>Seroprevalencia:</b>		<b>80,8%</b>		<b>19,1%</b>		<b>61,8%</b>		<b>58,9%</b>
<b>Seroprevalencia Título Alto:</b>		<b>72,8%</b>		<b>14,3%</b>		<b>56,4%</b>		<b>54,7%</b>
<b>Título Medio:</b>		<b>3,056</b>		<b>0,619</b>		<b>2,309</b>		<b>2,274</b>
<b>Desviación Estándar:</b>		<b>1,729</b>		<b>1,396</b>		<b>1,934</b>		<b>2,002</b>

**Tabla IV.B.9.** Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en explotaciones de carne de menos de 100 animales por áreas geográficas.

APTITUD CARNE								
EXPLORACIONES <100 ÁREAS GEOGRÁFICAS								
	1		2		3		4	
RESULTADOS	Nº Animales	%	Nº Animales	%	Nº Animales	%	Nº Animales	%
<b>Negativo</b>	79	36,9	86	33,2	75	39,5	61	35,7
(+)	11	5,1	5	1,9	4	2,1	4	2,3
(++)	2	0,9	9	3,5	8	4,2	5	2,9
(+++)	16	7,5	21	8,1	17	8,9	15	8,8
(++++)	70	32,7	102	39,4	52	27,4	55	32,2
(+++++)	36	16,8	36	13,9	34	17,9	31	18,1
<b>Total</b>	214	100,0	259	100,0	190	100,0	171	100,0
<b>Seroprevalencia:</b>		<b>63,1%</b>		<b>66,8%</b>		<b>60,5%</b>		<b>64,3%</b>
<b>Seroprevalencia Título Alto:</b>		<b>57,0%</b>		<b>61,4%</b>		<b>54,2%</b>		<b>59,1%</b>
<b>Título Medio:</b>		<b>2,444</b>		<b>2,602</b>		<b>2,363</b>		<b>2,538</b>
<b>Desviación Estándar:</b>		<b>2,061</b>		<b>1,977</b>		<b>2,070</b>		<b>2,047</b>

**Tabla IV.B.10.** Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en explotaciones de carne de más de 100 animales por áreas geográficas.

<b>APTITUD CARNE</b>								
<b>EXPLORACIONES &gt;100</b>								
<b>ÁREAS GEOGRÁFICAS</b>								
	<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>		<b>4</b>	
<b>RESULTADOS</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>
<b>Negativo</b>	23	32,4	14	25,5	2	4,0	17	53,1
(+)	5	7,0	1	1,8	1	2,0	3	9,4
(++)	5	7,0	1	1,8	1	2,0	0	0,0
(+++)	9	12,7	2	3,6	6	12,0	1	3,1
(++++)	25	35,2	20	36,4	29	58,0	8	25,0
(+++++)	4	5,6	17	30,9	11	22,0	3	9,4
<b>Total</b>	71	100,0	55	100,0	50	100,0	32	100,0
<b>Seroprevalencia:</b>		<b>67,6%</b>		<b>74,5%</b>		<b>96,0%</b>		<b>46,9%</b>
<b>Seroprevalencia Título Alto:</b>		<b>53,5%</b>		<b>70,9%</b>		<b>92,0%</b>		<b>37,5%</b>
<b>Título Medio:</b>		<b>2,282</b>		<b>3,164</b>		<b>3,840</b>	<b>1,656</b>	
<b>Desviación Estándar:</b>		<b>1,838</b>		<b>2,007</b>		<b>1,113</b>	<b>2,026</b>	

**Tabla IV.B.11.** Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en explotaciones de cebo de menos de 100 animales por áreas geográficas.

<b>APTITUD CEBO</b>								
<b>EXPLORACIONES &lt;100</b>								
<b>ÁREAS GEOGRÁFICAS</b>								
	<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>		<b>4</b>	
<b>RESULTADOS</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>
<b>Negativo</b>	17	40,5	52	31,9	48	39,0	18	17,1
(+)	1	2,4	2	1,2	1	0,8	1	1,0
(++)	1	2,4	9	5,5	3	2,4	2	1,9
(+++)	2	4,8	9	5,5	13	10,6	10	9,5
(++++)	15	35,7	65	39,9	47	38,2	61	58,1
(+++++)	6	14,3	26	16,0	11	8,94	13	12,4
<b>Total</b>	42	100,0	163	100,0	123	100,0	105	100,0
<b>Seroprevalencia:</b>		<b>59,5%</b>		<b>68,1%</b>		<b>61,0%</b>		<b>82,9%</b>
<b>Seroprevalencia Título Alto:</b>		<b>54,8%</b>		<b>61,4%</b>		<b>57,5%</b>		<b>80,0%</b>
<b>Título Medio:</b>		<b>2,357</b>		<b>2,681</b>		<b>2,350</b>		<b>3,276</b>
<b>Desviación Estándar:</b>		<b>2,093</b>		<b>1,984</b>		<b>1,979</b>		<b>1,620</b>

### IV.B.1.3 Cuestionario

Nuestro objetivo inicial era completar el cuestionario en todas las explotaciones de leche y carne de las que se seleccionaron animales en el muestreo para la detección de anticuerpos. No obstante, la información incluida en el cuestionario sólo pudo finalmente obtenerse del 68,5% (76/111) de las explotaciones lecheras y del 20,6% (20/97) de las de carne. Los cebaderos de terneros, por la propia naturaleza de estas explotaciones, se excluyeron de esta parte del estudio.

La casi totalidad de las preguntas del cuestionario fueron de tipo cerrado, es decir, con un número fijo de opciones con el fin de facilitar la codificación de la información y de evitar sesgos de interpretación a la hora de recoger las respuestas (Schukken *et al.*, 1989; Edwards, 1990). Este formato de preguntas es el más recomendable cuando el grado de formación de los entrevistados es bajo (Vaillancourt *et al.*, 1991).

En el caso de las explotaciones de leche, las que no se encuestaron fue porque el ganadero declinó responder al cuestionario. Sin embargo, en las explotaciones de carne la situación fue diferente. En éstas explotaciones por su idiosincrasia el propietario no suele estar en la explotación lo que dificultó el poder establecer contacto telefónico para concertar una entrevista.

En la tabla IV.B.12 se muestra el reparto de las explotaciones en las que se rellenó el cuestionario por áreas geográficas y tamaño de explotación.

**Tabla IV.B.12.** Distribución de las explotaciones encuestadas por áreas geográficas y tamaño de explotación.

Área geográfica	VACUNO ORDEÑO		VACUNO NO ORDEÑO	
	Nº explotaciones encuestadas/Nº explotaciones analizadas		Nº explotaciones encuestadas/Nº explotaciones analizadas	
	< 100	> 100	< 100	> 100
01	22/28 (78,6%)	3/4 (75%)	8/25 (32%)	0/5 (0%)
02	13/19 (68,4%)	0/1 (0%)	4/27 (14,8%)	0/4 (0%)
03	23/27 (85,2%)	4/5 (80%)	6/16 (37,5%)	1/3 (33,3%)
04	7/22 (31,8%)	4/5 (80%)	1/15 (6,7%)	0/2 (0%)
<b>Total Estratos</b>	65/96 (67,7%)	11/15 (73,3%)	19/83 (22,9%)	1/14 (7,1%)

La eficacia conseguida por áreas geográficas y/o estratos para el vacuno de ordeño comparando el número de explotaciones encuestadas con el de las que se habían muestreado para la detección de anticuerpos se mantiene uniforme. Sin embargo, en el

caso del vacuno de no ordeño, la uniformidad entre áreas geográficas y/o estratos sólo se mantiene en el área geográfica 3.

En la tabla IV.B.13 se muestran los resultados de seroprevalencia global, de seroprevalencia de TA y de TM en los animales de las explotaciones de leche y carne encuestadas.

**Tabla IV.B.13.** Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones de leche y carne encuestadas.

<b>EXPLOTACIONES ENCUESTADAS</b>				
	<b>LECHE</b>		<b>CARNE</b>	
<b>RESULTADOS</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>
<b>Negativo</b>	242	31,5	26	13,7
(+)	16	2,1	8	4,2
(++)	28	3,6	4	2,2
(+++)	89	11,6	18	9,5
(++++)	313	40,7	93	49,2
(+++++)	81	10,5	40	21,2
<b>TOTAL</b>	<b>769</b>	<b>100,0</b>	<b>189</b>	<b>100,0</b>

<b>Seroprevalencia:</b>	<b>68,5%</b>	<b>86,2%</b>
<b>Seroprevalencia Título Alto:</b>	<b>62,8%</b>	<b>79,9%</b>
<b>Título Medio:</b>	<b>2,614</b>	<b>3,396</b>
<b>Desviación Estándar:</b>	<b>1,895</b>	<b>1,615</b>

Comparando estos resultados con los obtenidos en el conjunto de los animales de las explotaciones de leche y carne muestreados (ver tabla IV.B.4), no se encontraron diferencias significativas entre los resultados de seroprevalencia global, de seroprevalencia de TA y de TM en el caso de los animales de las explotaciones de leche. Sin embargo, la seroprevalencia en el ganado bovino de carne encuestado fue significativamente mayor que la encontrada en el ganado bovino de la muestra ( $p < 0,001$ ). En la seroprevalencia de TA y de TM se encontraron, asimismo, diferencias significativas entre los animales de carne encuestados y los muestreados ( $p < 0,0001$ ). Estas diferencias, atribuibles en un principio a la baja eficacia conseguida en la respuesta a la encuesta en las explotaciones de carne, no permiten extrapolar los resultados del cuestionario más allá de la muestra encuestada.

El hecho de que la seroprevalencia en los animales de las explotaciones de carne encuestadas sea significativamente mayor que el de los animales de carne muestreados no puede atribuirse a un mayor de vacunas en las primeras que en las segundas (ver más adelante). Por lo tanto, esta diferencia es atribuible a una mayor tasa de infección por el VDVB en las explotaciones encuestadas que en las muestreadas. Previsiblemente esto suponga que en las explotaciones encuestadas había habido más antecedentes de posibles problemas asociados a la infección con el VDVB y ello, a su vez, podría haber motivado a

los ganaderos a acceder a contestar la encuesta con la esperanza de recibir asesoramiento técnico para resolver sus problemas.

El 67,1% (51/76) de las explotaciones lecheras encuestadas eran cerradas, es decir, no incorporaban animales de otras explotaciones, y el 32,9% (25/76) eran abiertas. De las 20 explotaciones de carne encuestadas, 17 (85%) eran cerradas y las 3 restantes (15%) abiertas.

En la tabla IV.B.14 se muestran los resultados de seroprevalencia global, de seroprevalencia de TA y de TM en los animales de las explotaciones lecheras encuestadas en función de que fueran abiertas o cerradas.

**Tabla IV.B.14.** Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones lecheras abiertas y cerradas.

<b>EXPLOTACIONES LECHERAS</b>				
	<b>ABIERTAS</b>		<b>CERRADAS</b>	
<b>RESULTADOS</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>
Negativo	44	18,1	198	37,6
(+)	4	1,6	12	2,3
(++)	12	4,9	16	3,0
(+++)	36	14,8	53	10,1
(++++)	114	46,9	199	37,8
(+++++)	33	13,6	48	9,1
<b>TOTAL</b>	<b>243</b>	<b>100,0</b>	<b>526</b>	<b>100,0</b>

<b>Seroprevalencia:</b>	<b>81,9%</b>	<b>62,4%</b>
<b>Seroprevalencia Título Alto:</b>	<b>75,3%</b>	<b>57,0%</b>
<b>Título Medio:</b>	<b>3,115</b>	<b>2,355</b>
<b>Desviación Estándar:</b>	<b>1,660</b>	<b>1,961</b>

La seroprevalencia global, la seroprevalencia de TA y el TM fueron significativamente menores en las explotaciones lecheras cerradas que en las abiertas ( $p < 0.0001$  en todos los casos). Las diferencias en las seroprevalencias entre las explotaciones abiertas y cerradas son tanto más significativas cuanto que 15 (29,4%) de las explotaciones cerradas y sólo una (4%) de las abiertas usaban vacunas (ver más adelante el efecto de la vacunación en la seroprevalencia en las explotaciones lecheras). El hecho de que la seroprevalencia sea mayor en las explotaciones abiertas que en las cerradas es lógico puesto que la forma más frecuente de introducción de la infección en una explotación es a través de la incorporación de animales infectados bien en la fase aguda, bien infectados persistentemente aparentemente sanos o bien de hembras gestantes que portan un feto infectado.

En la tabla IV.B.15 figuran los resultados de seroprevalencia global, de seroprevalencia de TA y de TM en los animales estudiados en las explotaciones de carne abiertas y cerradas.

**Tabla IV.B.15.** Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones de carne abiertas y cerradas.

EXPLOTACIONES DE CARNE				
	ABIERTAS		CERRADAS	
RESULTADOS	Nº Animales	%	Nº Animales	%
Negativo	7	23,3	19	11,9
(+)	1	3,3	7	4,4
(++)	0	0	4	2,5
(+++)	0	0	18	11,3
(++++)	21	70,0	72	45,3
(+++++)	1	3,3	39	24,5
<b>TOTAL</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>	<b>159</b>	<b>100,0</b>

Seroprevalencia:	76,7%	88,0%
Seroprevalencia Título Alto:	73,3%	81,1%
Título Medio:	3,000	3,471
Desviación Estándar:	1,789	1,582

Al contrario de lo observado en las explotaciones de leche, las prevalencia de anticuerpos fueron superiores en las cerradas que en las abiertas, si bien no se encontraron diferencias significativas entre las abiertas y cerradas ni en la seroprevalencia global, ni en la seroprevalencia de TA ni en el TM. Esto podría deberse al bajo número de animales estudiados en las explotaciones abiertas y al hecho de que, mientras que de las 17 explotaciones cerradas sólo una usaba vacunas, una de las tres explotaciones abiertas también las utilizaba (ver más adelante el efecto de la vacunación en la prevalencia de anticuerpos). En cualquier caso, como ya señalamos antes, los resultados referidos a las explotaciones de carne deben interpretarse con cautela y solo son aplicables a la muestra encuestada.

En las explotaciones lecheras abiertas la edad de incorporación de los animales osciló de 1 a 72 meses predominando los animales con 24 (32%), 30 (12%) y 36 (12%) meses. En el vacuno de carne la edad de incorporación de los animales en las explotaciones abiertas osciló entre 18 y 48 meses.

En 24 de las 76 explotaciones lecheras encuestadas había animales de otras especies diferentes a la bovina. En 21 de estas 24 explotaciones los otros animales eran ovejas (12 explotaciones) o cerdos (9 explotaciones), que como sabemos, se consideran

reservorios potenciales del virus). Si bien, diferentes estudios indican que esta transmisión natural entre especies, se produce sobre todo de los bóvidos a las otras especies. Aunque también se ha demostrado la transmisión natural del virus de las ovejas al ganado vacuno Carlsson, 1991; Carlsson *et al.*, 1994; Loken, 1994; Loken, 1995. La cabra y el cerdo, como potenciales portadores del virus, podrían también difundir la infección a los bóvidos. En cuanto a las explotaciones de carne encuestadas, en 5 había animales de otras especies y en 4 de estas los otros animales eran ovejas.

En las tablas IV.B.16 y IV.B.17 se muestran los resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en los animales de las explotaciones de leche y de carne encuestadas que tenían o no otras especies de riesgo. En dichas tablas únicamente se han considerado especies de riesgo la ovina y la porcina.

**Tabla IV.B.16.** Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones lecheras en función de que hubiera o no otras especies de riesgo (ovejas y cerdos).

<b>EXPLOTACIONES DE LECHE</b>				
<b>RESULTADOS</b>	<b>Si otras especies de riesgo</b>		<b>No otras especies de riesgo</b>	
	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>
<b>Negativo</b>	54	32,5	188	31,2
(+)	5	3,0	11	1,8
(++)	6	3,6	22	3,6
(+++)	21	12,6	68	11,3
(++++)	67	40,4	246	40,8
(+++++)	13	7,8	68	11,3
<b>TOTAL</b>	<b>166</b>	<b>100,0</b>	<b>603</b>	<b>100,0</b>

<b>Seroprevalencia:</b>	<b>67,5%</b>	<b>68,8%</b>
<b>Seroprevalencia Título Alto:</b>	<b>60,8%</b>	<b>63,3%</b>
<b>Título Medio:</b>	<b>2,488</b>	<b>2,623</b>
<b>Desviación Estándar:</b>	<b>1,887</b>	<b>1,907</b>

**Tabla IV.B.17.** Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones de carne en función de que hubiera o no otras especies de riesgo (ovejas y cerdos).

<b>EXPLOTACIONES DE CARNE</b>				
<b>RESULTADOS</b>	<b>Sí otras especies de riesgo</b>		<b>No otras especies de riesgo</b>	
	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>
<b>Negativo</b>	4	14,8	22	13,6
(+)	2	7,4	6	3,7
(++)	1	3,7	3	1,8
(+++)	6	22,2	12	7,4
(++++)	12	44,4	81	50,0
(+++++)	2	7,4	38	23,5
<b>TOTAL</b>	<b>27</b>	<b>100,0</b>	<b>162</b>	<b>100,0</b>
<b>Seroprevalencia:</b>	<b>85,1%</b>		<b>86,4%</b>	
<b>Seroprevalencia Título Alto:</b>	<b>74,1%</b>		<b>80,9%</b>	
<b>Título Medio:</b>	<b>2,960</b>		<b>3,469</b>	
<b>Desviación Estándar:</b>	<b>1,551</b>		<b>1,620</b>	

Tanto en el ganado lechero como en el de carne no se encontraron diferencias significativas ni en la prevalencia global, ni en la prevalencia de TA ni el TM entre las explotaciones que tenían otras especies de riesgo y las que no las tenían. En principio, por lo tanto, en la muestra analizada la presencia de ovejas o cerdos en las explotaciones no parecer afectar a la prevalencia de anticuerpos en los bóvidos. La realización de un análisis multivariante, que no ha sido considerado en este estudio, permitiría hacer una valoración más precisa del posible efecto de la presencia de otras especies de riesgo en las explotaciones sobre la seroprevalencia de anticuerpos frente al VDVB en los bóvidos, ya que con dicho análisis puede calcularse el efecto individual de cada variable corrigiéndose el efecto de otras posibles variables confusoras (en nuestro caso, por ejemplo, el que las explotaciones sean abierta o cerradas, que utilicen o no vacunas, etc.).

En cuanto al método de cubrición empleado, el 42,1% (32/76) de las explotaciones lecheras encuestadas usaban sólo la IA, el 22,4% (17/76) sólo la monta natural y el 35,5% (27/76) utilizaban tanto la monta natural como la IA. Por otra parte, en 17 de las 20 explotaciones de carne (85%) encuestadas se usaba como único método la monta natural, en 2 se utilizaba la IA y en una ambos métodos.

En la tabla IV.B.18 se muestran los resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en los animales de las explotaciones de leche encuestadas en función del método de cubrición empleado.

**Tabla IV.B.18.** Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones de leche en función del método de cubrición (inseminación artificial -IA-, monta natural -MN-, o ambos -IA + MN-) utilizado.

RESULTADOS	EXPLORACIONES DE LECHE					
	IA		MN		IA + MN	
	Nº Animales	%	Nº Animales	%	Nº Animales	%
Negativo	82	23,5	41	25,8	119	45,6
(+)	8	2,3	4	2,5	4	1,5
(++)	10	2,9	7	4,4	11	4,2
(+++)	40	11,5	23	14,5	26	10,0
(++++)	168	48,1	62	39,0	83	31,8
(+++++)	41	11,7	22	13,8	18	6,9
<b>TOTAL</b>	<b>349</b>	<b>100,0</b>	<b>159</b>	<b>100,0</b>	<b>261</b>	<b>100,0</b>

Seroprevalencia:	76,5%	74,2%	54,4%
Seroprevalencia Título Alto:	71,3%	67,3%	48,7%
Título Medio:	2,937	2,789	2,015
Desviación Estándar:	1,786	1,841	1,961

No se encontraron diferencias significativas ni en la seroprevalencia global, ni en la seroprevalencia de TA ni en el TM entre los animales de las explotaciones de leche que usaban sólo IA y las que sólo utilizaban la monta natural. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la seroprevalencia global, en la seroprevalencia de TA y en el TM entre las explotaciones que utilizaban ambos métodos de cubrición tanto con las que sólo utilizaban la IA como con las que sólo usaban la monta natural ( $p < 0,001$  en todos los casos). Estos resultados no son fáciles de interpretar y, posiblemente, las diferencias observadas sean una consecuencia indirecta de algunos otros factores que concurren en las explotaciones que utilizan ambos métodos de cubrición. Así, por ejemplo, el que un 74,1% (20/27) de estas explotaciones fueran cerradas, mientras que sólo eran cerradas un 52,9% (9/17) de las que usaban la monta natural, podría explicar, al menos en parte, las diferencias entre ellas (ver anteriormente el efecto del tipo de explotación -abierta o cerrada- sobre la seroprevalencia). Este razonamiento, sin embargo, sería menos sólido a la hora de explicar las diferencias con las explotaciones que usan sólo IA, dado que un 68,7% de ellas eran cerradas. Como se expuso antes, el uso de un análisis multivariante contribuiría a una interpretación más precisa de estos resultados.

En las explotaciones de carne, dado el absoluto predominio de la monta natural frente a las otras dos posibilidades, no se compararon los resultados de la detección de anticuerpos.

De las explotaciones encuestadas, el 7,9% (6 /76) de las de leche y el 5% (1/20) de las de carne usaban la transferencia de embriones. De las explotaciones de leche que usaban transferencia de embriones, sólo una usaba la inseminación artificial, 2 sólo la monta natural y 3 ambos métodos. De estas 6, 5 eran cerradas y una abierta, 3 conocían la DVB y 3 no la conocían, y sólo una no vacunaba. En el caso de las explotaciones de carne,

la única que usaba transferencia de embriones, utilizaba la monta natural, era cerrada, conocía la DVB y vacunaba.

En la tabla IV.B.19 se muestran los resultados de seroprevalencia global, de seroprevalencia de TA y de TM en los animales de las explotaciones lecheras encuestadas en función de que usaran la transferencia de embriones o no.

**Tabla IV.B.19.** Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en los animales de las explotaciones lecheras que utilizan y no utilizan la transferencia de embriones.

<b>EXPLORACIONES LECHERAS</b>				
<b>RESULTADOS</b>	<b>Transferencia de embriones</b>		<b>No transferencia de embriones</b>	
	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>	<b>Nº Animales</b>	<b>%</b>
<b>Negativo</b>	51	39,5	191	29,8
(+)	2	1,6	14	2,2
(++)	4	3,1	24	3,7
(+++)	11	8,5	78	12,2
(++++)	50	38,8	263	41,1
(+++++)	11	8,5	70	10,9
<b>TOTAL</b>	<b>129</b>	<b>100,0</b>	<b>640</b>	<b>100,0</b>

<b>Seroprevalencia:</b>	<b>60,5%</b>	<b>70,2%</b>
<b>Seroprevalencia Título Alto:</b>	<b>55,8%</b>	<b>64,2%</b>
<b>Título Medio:</b>	<b>2,310</b>	<b>2,653</b>
<b>Desviación Estándar:</b>	<b>1,983</b>	<b>1,882</b>

La seroprevalencia global, la seroprevalencia de TA y el TM fueron significativamente menores en las explotaciones lecheras que utilizaban la transferencia de embriones frente a las que no la utilizaban ( $p < 0.05$  en todos los casos).

El uso o no de la transferencia de embriones en las explotaciones, máximo teniendo en cuenta que era una práctica ocasional, no explicaría las diferencias encontradas. Estas serían atribuibles al efecto indirecto de otras variables. En concreto, el hecho de que 5 de las 6 explotaciones que utilizaban la transferencia de embriones fueran cerradas podría explicar en buena medida las diferencias encontradas (ver anteriormente el efecto del tipo de explotación -abierta o cerrada- sobre la seroprevalencia). Además, es probable que las prácticas de manejo e higiene en las explotaciones que usan transferencia de embriones sean en general mejores que en las que no lo usan y ello, a su vez, también podría influir sobre la seroprevalencia. No obstante, el hecho de que solo una de las explotaciones que usaban la transferencia de embriones no utilizara vacunas entraría en conflicto con las diferencias encontradas (ver más adelante el efecto de la vacunación en la seroprevalencia).

En las explotaciones encuestadas se preguntó por los antecedentes de una enfermedad de control oficial, la brucelosis. En el 30,3% (23/76) de las explotaciones de leche se había diagnosticado esta enfermedad en los últimos 3 años; mientras que en el

69,7% no se había diagnosticado. En la tabla IV.B.20 se muestran los resultados de seroprevalencia global, de seroprevalencia de TA y de TM en los animales de las explotaciones lecheras en función de que se hubiera o no diagnosticado brucelosis en los 3 últimos años.

**Tabla IV.B.20.** Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en los animales de las explotaciones lecheras que resultaron positivas y negativas al diagnóstico de brucelosis en los últimos 3 años.

EXPLORACIONES LECHERAS				
RESULTADOS	Brucelosis si		Brucelosis no	
	Nº Animales	%	Nº Animales	%
Negativo	69	24,7	173	35,3
(+)	4	1,4	12	2,4
(++)	9	3,2	19	3,9
(+++)	32	11,5	57	11,6
(++++)	132	47,3	181	37,0
(+++++)	33	11,8	48	9,8
<b>TOTAL</b>	<b>279</b>	<b>100,0</b>	<b>490</b>	<b>100,0</b>

Seroprevalencia:	75,3%	64,7%
Seroprevalencia Título Alto:	82,1%	58,4%
Título Medio:	2,906	2,418
Desviación Estándar:	1,806	1,935

La seroprevalencia global, la seroprevalencia de TA y el TM fueron significativamente mayores en las explotaciones en las que se había diagnosticado brucelosis en los 3 últimos años que en las que no se había diagnosticado ( $p < 0,01$  para la prevalencia global,  $p < 0,001$  para la prevalencia TA y  $p < 0,01$  para TM). Estas diferencias, que lógicamente nada tienen que ver con la presencia o no de brucelosis en las explotaciones, serían achacables al efecto indirecto de otros factores que, teniendo un efecto directo sobre la seroprevalencia de anticuerpos frente al VDVB, concurrirían con mayor intensidad en las explotaciones con casos de brucelosis que en las libres de esta enfermedad. En este sentido, el uso de vacunas y, en menor medida, el carácter abierto o cerrado de las explotaciones podrían ser en buena parte responsables de las diferencias observadas. En efecto, frente a un 30,4% (7/23) de explotaciones positivas a brucelosis que usaban vacunas solo un 17,0% (9/53) de las negativas lo hacían. Además, un 39,1% (9/23) de las explotaciones positivas a brucelosis frente a un 30,2% (16/53) de las negativas eran abiertas. Tampoco podría descartarse el hecho de que las prácticas de manejo e higiene en las explotaciones positivas a brucelosis fueran en general peores que en las libres de esta enfermedad y que esto, a su vez, influyera en la seroprevalencia.

Por otra parte, en 4 de las 20 explotaciones de carne (20%) encuestadas se había diagnosticado brucelosis en los 3 últimos años y todas ellas (100%) eran explotaciones

## Resultados y discusión

cerradas y no utilizaban vacunas, mientras que de las 16 explotaciones encontradas como negativas 13 (81,2%) eran cerradas y 3 (18,7%) abiertas y solo 2 (12,5%) utilizaban vacunas. En la tabla IV.B.21 se muestran los resultados de seroprevalencia global, de seroprevalencia de TA y de TM en los animales de las explotaciones de carne en función de que se hubiera o no diagnosticado brucelosis. Aunque las prevalencias fueron ligeramente superiores en los animales de las explotaciones positivas a brucelosis no se encontraron diferencias significativas en los animales de las explotaciones negativas. En cualquier caso el número de animales estudiado en las explotaciones positivas fue bajo.

**Tabla IV.B.21.** Resultados de la detección de anticuerpos frente al VDVB en los animales de las explotaciones de carne que resultaron positivas y negativas al diagnóstico de brucelosis en los últimos 3 años.

RESULTADOS	EXPLORACIONES CARNE			
	Brucelosis sí		Brucelosis no	
	Nº Animales	%	Nº Animales	%
Negativo	3	7,5	23	15,4
(+)	2	5	6	4,0
(++)	2	5	2	1,3
(+++)	6	15	12	8,1
(++++)	12	30	81	54,4
(+++++)	15	37,5	25	16,7
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>	<b>100,0</b>	<b>149</b>	<b>100,0</b>

Seroprevalencia:	92,5%	84,6%
Seroprevalencia Título Alto:	82,5%	79,2%
Título Medio:	3,675	3,322
Desviación Estándar:	1,525	1,640

En la tabla IV.B.22 se muestran los resultados de las respuestas obtenidas al grupo de preguntas referidas a los posibles antecedentes de Diarrea Vídica Bovina en las explotaciones encuestadas. La enfermedad era más conocida por los ganaderos de las explotaciones de leche (30,3%, 23/76) que por los de carne (10%, 2/10).

Diez de los ganaderos encuestados (9 de explotaciones de leche y uno de carne) respondieron que la enfermedad se había diagnosticado en su explotación. En las 9 explotaciones de leche el diagnóstico fue laboratorial, mientras que en la de carne el diagnóstico fue clínico.

Dentro del grupo de preguntas referidas a los posibles antecedentes de sintomatología y/o problemática compatible con la infección con el VDVB, el 46,1% de los ganaderos respondieron haber tenido abortos y el 38,2% y el 43,4% respondieron haber observado respectivamente disminución importante de la fertilidad y repeticiones de

celo a ciclo largo. Sólo un 13,2% de los ganaderos de leche respondieron haber observado fetos momificados.

En las explotaciones de carne, el 40% de los ganaderos respondió haber observado disminuciones importantes de la fertilidad, mientras que sólo el 15% afirmó haber tenido abortos, y sólo el 25% dijo haber observado repeticiones de celo. Hay que tener en cuenta que, por sus propias características, en las explotaciones de carne el parámetro más fácil de medir es la disminución de la fertilidad.

Al cruzar las respuestas a las preguntas sobre estos cuatro trastornos de la reproducción, encontramos que en 60 de las 76 explotaciones de leche (78,9%) y en 10 de las 20 de carne (50%) se habrían presentado alguno de estos trastornos. De acuerdo con las respuestas de los ganaderos en ninguna de las explotaciones encuestadas se habrían observado las cuatro alteraciones y sólo en 8 de las explotaciones de leche se describen tres de ellas (abortos, disminuciones de la fertilidad y repeticiones de celo).

En el segundo bloque de preguntas relacionadas con la observación de antecedentes compatibles con la DVB en los terneros tanto de las explotaciones de leche como de las de carne, los porcentajes de respuestas afirmativas son en general bajos (entre el 1,3 y el 15%), como cabía esperar por lo infrecuente de estos síntomas. No obstante, en las explotaciones de leche encuestadas se describen más casos de hallazgos clínicos en terneros compatibles con la infección con el VDVB que en las explotaciones de carne, si bien hay que tener en cuenta el bajo número de respuestas obtenidas en las explotaciones de carne.

En 18 explotaciones de leche (23,7%) el encuestado respondió haber observado en los terneros alguna de las alteraciones compatibles con la infección con el VDVB y en dos de estas los ganaderos afirmaron haber observado todas las alteraciones. Estas dos explotaciones remitieron muestras al laboratorio diagnosticándose en ambos casos la infección con el VDVB. Además, 3 de las 18 explotaciones en las que se observó alguna (pero no todas) de las alteraciones en terneros también remitieron muestras al laboratorio para su análisis, pero los responsables de estas explotaciones no recordaban en el momento en que se realizó la encuesta el resultado de los análisis.

En las explotaciones de carne, 4 (20%) describieron en los terneros alguno de los síntomas compatibles con DVB. En uno sólo de los casos se solicitó diagnóstico laboratorial y tampoco recordaba el responsable el diagnóstico del laboratorio.

Por último, en 11 explotaciones de leche (14,5%) el encuestado respondió haber observado en los animales de 6 a 24 meses bien retraso en el crecimiento con respecto al resto de animales de la misma edad, bien diarreas persistentes que no respondían al tratamiento y/o bien muerte de animales con úlceras en la boca y órganos digestivos. En 3 de estos casos se remitieron muestras al laboratorio sin resultado conocido.

En las explotaciones de carne sólo 2 ganaderos respondieron haber observado en los animales de 6 a 24 meses alguna de los síntomas antes descritos, pero en ningún caso se enviaron al laboratorio.

El porcentaje de explotaciones en las que se utilizaba algún tipo de vacuna frente al VDVB fue relativamente bajo: sólo 16 de las 76 (21,0%) de los ganaderos de leche encuestados afirmaron que usaban vacunas, mientras que 55 (72,4%) manifestaron que no las usaban y 5 (6,6%) no sabían si se estaban o no utilizando en la explotación. En cuanto a las explotaciones de carne, el uso de vacunas frente al VDVB era una práctica más infrecuente que en las de leche: únicamente un 10% (2/20) de los ganaderos manifestó que las usaban, frente a un 75% (15/20) que dijo que no las usaban y un 15% (3/20) que no sabía con certeza si se estaban o no usando en su explotación.

En la tabla IV.B.23 se muestran los resultados de seroprevalencia global, de seroprevalencia de TA y de TM en las explotaciones de leche en función de si utilizan o no vacunas. En dicha tabla no se han incluido los animales de las 5 explotaciones cuyos ganaderos no sabían si usaban o no vacunas.

**Tabla IV.B.23.** Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones lecheras que utilizan y no utilizan vacunas.

EXPLORACIONES LECHERAS				
RESULTADOS	VACUNAN		NO VACUNAN	
	Nº Animales	%	Nº Animales	%
Negativo	59	24,1	173	36,2
(+)	5	2,0	8	1,7
(++)	4	1,6	24	5,0
(+++)	33	13,5	52	10,9
(++++)	116	47,3	175	36,6
(+++++)	28	11,4	46	9,6
<b>TOTAL</b>	<b>245</b>	<b>100,0</b>	<b>478</b>	<b>100,0</b>

Seroprevalencia:	75,9%	63,8%
Seroprevalencia Título Alto:	72,2%	57,1%
Título Medio:	2,922	2,389
Desviación Estándar:	1,790	1,939

Como cabía esperar, en las explotaciones lecheras que utilizaban vacunas la seroprevalencia fue significativamente mayor que en las que no vacunaban ( $p < 0,01$ ), como lo fue la prevalencia de TA ( $p < 0,0001$ ) y el TM ( $p < 0,001$ ).

En la tabla IV.B.24 figuran los resultados de seroprevalencia global, de seroprevalencia de TA y de TM en los animales estudiados en las explotaciones de carne en función de si utilizan o no vacunas. En la tabla no se han incluido los animales de las 3 explotaciones cuyos ganaderos no sabían si usaban o no vacunas.

Tabla. IV.B.22. Resultados de las respuestas obtenidas al grupo de preguntas referidas a los posibles antecedentes de DVB.

ANTECEDENTES DE DIARREA VIRICA BOVINA

	LECHE (n=76)						CARNE (n=20)					
	SI		NO		N/S		SI		NO		N/S	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
• ¿Conoce la enfermedad DVB?	23	30,3	52	68,4	1	1,3	2	10,0	18	90,0	-	-
• ¿Se ha diagnosticado en la explotación?	9	11,8	66	86,8	1	1,3	1	5	19	95	-	-

Antecedentes de sintomatología/problemática compatibles con DVB

• ¿Abortos?	35	46,1	41	53,9	-	-	3	15	17	85	-	-
• ¿Se han observado abortos con fetos momificados?	10	13,2	62	81,6	4	5,3	0	0	18	90	2	10
• ¿Ha observado disminuciones importantes de la fertilidad en el último año?	29	38,2	47	61,8	-	-	8	40	11	55	1	5
• ¿Ha observado repeticiones de celos con ciclos largos?	33	43,4	41	53,9	2	2,6	5	25	12	60	3	15

Han nacido terneros con:

• Problemas motores (ataxia)	10	13,2	66	86,8	-	-	2	10	18	90	-	-
• Problemas oculares	8	10,5	68	89,5	-	-	1	5	19	95	-	-
• Anormalidades congénitas, del sistema nervioso central	5	6,6	71	93,4	-	-	-	-	20	100	-	-
• Pequeños y que no crecen normalmente	6	7,9	70	92,1	-	-	3	15	17	85	-	-
• ¿Han observado en algún animal (6 a 24 meses) evidente retraso en el crecimiento respecto al resto de animales de su edad?	6	7,9	70	92,1	-	-	1	5	19	95	-	-
• ¿Han observado en animales (6 a 24 meses) diarreas persistentes que no responden al tratamiento?	5	6,6	71	93,4	-	-	1	5	19	95	-	-
• ¿Han muerto animales entre 6 y 24 meses con úlceras en boca y órganos digestivos?	1	1,3	75	98,7	-	-	-	-	20	100	-	-

**Tabla IV.B.24.** Resultados de la detección de Acs frente al VDVB en los animales de las explotaciones de carne que utilizan y no utilizan vacunas.

EXPLORACIONES DE CARNE				
RESULTADOS	VACUNAN		NO VACUNAN	
	Nº Animales	%	Nº Animales	%
Negativo	2	4,6	21	17,3
(+)	1	2,3	7	5,8
(++)	0	0	4	3,3
(+++)	5	11,6	12	9,9
(++++)	27	62,8	54	44,6
(+++++)	8	18,6	23	19,0
<b>TOTAL</b>	<b>43</b>	<b>100,0</b>	<b>121</b>	<b>100,0</b>

Seroprevalencia:	95,3%	82,6%
Seroprevalencia Título Alto:	93,0%	73,5%
Título Medio:	3,814	3,157
Desviación Estándar:	1,118	1,742

Como en el caso de las explotaciones de leche, la seroprevalencia global, la seroprevalencia de TA y el TM fueron significativamente mayores en las explotaciones que vacunaban que en las que no lo hacían ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente).

Respecto al uso de otras vacunas, el porcentaje de explotaciones en las que se utilizaban era en general bajo (tablas IV.B.25 y IV.B.26). Además, como en la vacunación frente al VDVB, en las explotaciones de carne, el uso de otras vacunas era una práctica más infrecuente que en las explotaciones de leche (ver tablas IV.B.25 y IV.B.26).

**Tabla IV.B.25.** Utilización de vacunas frente a la rinotrqueitis infecciosa bovina (RIB), parainfluenza-3 (PI-3), virus respiratorio sincitial bovion (VRSB) y diarreas neonatales en el ganado de leche.

EXPLORACIONES DE LECHE						
	VACUNAN		NO VACUNAN		No saben/No contestan	
	Nº Explotaciones	%	Nº Explotaciones	%	Nº Explotaciones	%
RIB	14	18,4	57	75	5	6,5
PI-3	7	9,2	62	81,5	7	9,2
VRSB	5	6,5	64	84,2	7	9,2
Diarrea Neonatal	28	36,8	45	9,21	3	3,9

**Tabla IV.B.26.** Utilización de vacunas frente a la rinotrqueitis infecciosa bovina (RIB), parainfluenza-3 (PI-3), virus respiratorio sincitial bovion (VRSB) y diarreas neonatales en el ganado de carne.

	EXPLOTACIONES DE CARNE					
	VACUNAN		NO VACUNAN		No saben/No contestan	
	Nº Explotaciones	%	Nº Explotaciones	%	Nº Explotaciones	%
<b>RIB</b>	3	15	15	75	2	10
<b>PI-3</b>	1	5	16	80	3	15
<b>VRSB</b>	1	5	16	80	3	15
<b>Diarrea Neonatal</b>	4	20	12	60	4	20

Por último y en relación con el tratamiento de desparasitación, todos los ganaderos de las explotaciones de carne y un 61,8% de las de leche afirmaron que lo realizaban.

## V. CONCLUSIONES

---

- PRIMERA.-** De los 47 aislados de campo del VDVB estudiados 44 (93,61%) pertenecieron al biotipo no citopático. Esto confirma que la mayoría de los aislados de campo pertenecen a este biotipo.
- SEGUNDA.-** El conjunto de los resultados obtenidos con los anticuerpos monoclonales utilizados permite afirmar que todos los aislados de campo estudiados son similares entre sí y similares a las cepas tipo del VDVB y pertenecieron al grupo de los aislados clásicos del VDVB.
- TERCERA.-** Ninguna de las cepas aisladas de animales pertenecieron al grupo de pestivirus atípicos. Las dos cepas estudiadas pertenecientes a este grupo se aislaron de líneas celulares establecidas. Por lo tanto, la presencia de pestivirus atípicos en nuestro país sería, como máximo, vestigial.
- CUARTA.-** Los resultados obtenidos con los anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la glicoproteína de la envoltura gp53 y obtenidos frente a cepas del VDVB mostraron la existencia de epítomos altamente conservados y epítomos muy variables dentro de esta proteína entre los diferentes aislados investigados. Además, los anticuerpos monoclonales que reconocen esta glicoproteína preparados a partir de otros pestivirus diferentes al VDVB mostraron una reactividad mayoritariamente negativa.
- QUINTA.-** Los resultados de este estudio confirman que la proteína p80/125 posee epítomos específicos de los pestivirus atípicos con respecto a los aislados clásicos del VDVB. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales que reconocen dichos epítomos podrían utilizarse para diferenciar los aislados clásicos del VDVB de los aislados pertenecientes al grupo de los pestivirus atípicos.

- SEXTA.-** Ninguno de los anticuerpos monoclonales específicos del VDVB empleados en este estudio, reconoció a todos los aislados estudiados. Por lo tanto, sería necesario utilizar un conjunto de anticuerpos monoclonales específicos de este virus para poder detectar todos los aislados del VDVB.
- SEPTIMA.-** La seroprevalencia de anticuerpos frente al VDVB en el ganado bovino de la Comunidad Autónoma de Madrid estimada en este estudio fue del 65,6%, la seroprevalencia de título alto (TA) fue del 59,8%, ligeramente inferior a la global, y el título medio (TM) de anticuerpos fue 2,524 ( $\pm 1,976$ )
- OCTAVA.-** La prevalencia de explotaciones con al menos un animal seropositivo fue del 94,2% encontrándose ligeras variaciones en función de la aptitud: en el 100% de las explotaciones de cebo, en un 95,9% de las de carne y en un 91% de las de leche se encontraron animales seropositivos.
- NOVENA.-** Los resultados de seroprevalencia, de seroprevalencia de TA y de TM en los tres estratos en que se dividieron los animales por su aptitud (leche, carne y cebo) y en los dos en que se clasificaron por el tamaño de la explotación (menos de 100 y más de 100 animales) fueron muy homogéneos, no encontrándose diferencias significativas en ninguno de los casos.
- DÉCIMA.-** La seroprevalencia por áreas geográficas osciló entre el 61,7% de la 4 y el 69,2% de la 1, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre la seroprevalencia del área 4 y las seroprevalencias de la 1 y de la 3. No obstante, ni en la prevalencia de TA ni en el TM se encontraron diferencias significativas entre los resultados de las cuatro áreas geográficas consideradas.
- UNDÉCIMA.-** El porcentaje de explotaciones de leche muestreadas que consiguieron encuestarse (68,5%) fue bastante aceptable, mientras que el de las de carne fue bajo (20,6%). Además, no se encontraron diferencias significativas en la seroprevalencia, en la seroprevalencia de TA y en el TM entre los animales de las explotaciones de leche encuestadas y los de las muestreadas, mientras que sí se encontraron diferencias en los tres parámetros entre los animales de las explotaciones de carne encuestadas y los de las muestreadas.
- DUODÉCIMA.-** El carácter abierto o cerrado de la explotación y el uso o no de vacunas afectan significativamente a la seroprevalencia de anticuerpos frente al VDVB en la población de ganado lechero estudiada, siendo mayor en los bovinos de las explotaciones abiertas y en los de las que vacunan.
- DECIMOTERCERA.-** La Diarrea Vírica Bovina es una enfermedad relativamente poco conocida entre los ganaderos de la Comunidad de Madrid, si bien es más conocida entre los de leche que entre los de carne.
- DECIMOCUARTA.-** El porcentaje de explotaciones bovinas de la Comunidad de Madrid en las que se utiliza algún tipo de vacuna frente al VDVB es relativamente bajo.

## VI. RESUMEN

---

En este trabajo se han caracterizado 49 cepas del VDVB, 46 aisladas principalmente en bovinos procedentes de distintas zonas geográficas de nuestro país y 2 cepas aisladas de una línea celular establecida (GBK) procedente de la "American Type Culture Collection" (ATCC). La mayoría de estas cepas (46 -93,9%-) pertenecieron al biotipo no citopático. Para la caracterización antigénica de estos aislados se utilizó un panel de 23 anticuerpos monoclonales dirigidos frente a las siguientes proteínas víricas: 1) gp48: proteína de la envoltura, 2) gp53: proteína de la envoltura que induce la aparición de Acs neutralizantes, y 3) p80/125: proteína no estructural altamente conservada entre los pestivirus y que además permite diferenciar entre aislados no citopáticos y citopáticos del VDVB.

Los resultados obtenidos con los aislados españoles y los anticuerpos monoclonales empleados se analizaron mediante dos paquetes informáticos, uno de los cuales permite establecer las relaciones filogenéticas (PHYLIP) mientras que el otro indica la distancia antigénica entre las distintas cepas (MAP). Asimismo, se compararon estos resultados con los obtenidos previamente en el "Central Veterinary Laboratory" (CVL) de Weybridge (Inglaterra) usando el mismo panel de AcMos frente a aislados de campo del VDVB y distintas cepas de referencia de otros pestivirus.

Del grupo de AcMos que reconocen la proteína gp53, dos de ellos reaccionaron con casi todos los aislados estudiados, otros dos presentaron una reactividad intermedia, mientras que el resto de AcMos de este grupo presentaron una reactividad escasa o nula. Estos resultados muestran que los aislados del VDVB presentan un alto grado de variabilidad antigénica en esta proteína de la envoltura y que además que dentro de la misma existen epitopos altamente conservados y epitopos muy variables entre los diferentes aislados del VDVB.

Los AcMos que reconocen gp53 obtenidos frente al VDVB de referencia del ganado vacuno Oregon C24V mostraron, con la excepción de uno de ellos, una reactividad muy baja con los aislados españoles estudiados. Por otra parte, los AcMos específicos de gp53 obtenidos frente al también VDVB de referencia bovino NADL presentaron valores

extremos: uno de ellos no reaccionó con ninguno de los aislados estudiados mientras que los otros dos reconocieron a casi todos los aislados. Estos datos muestran una gran variabilidad antigénica en la glicoproteína gp53 entre estas dos cepas de referencia del VDVB.

Los AcMos dirigidos frente a gp53 preparados a partir de las cepas del VPPC 86/2, del VEB 87/6, atípica porcina Vosges y atípica ovina 59386 mostraron una reactividad mayoritariamente negativa. Estos datos sugieren que existen diferencias antigénicas significativas en la proteína gp53 entre el VDVB y el resto de los pestivirus.

Los aislados españoles mostraron una reactividad muy variable con el grupo de AcMos que se dirigen frente a la glicoproteína de la envoltura gp48 según cual fuera la cepa de virus frente a la cual fueron obtenidos estos anticuerpos. Así, los AcMos obtenidos frente a la cepa del VDVB Oregon C24V y frente a la cepa del VPPC Baker/A presentaron una reactividad elevada o muy elevada, mientras que los AcMos obtenidos frente a la cepa atípica ovina BD 59386 y frente a la cepa del VEB 87/6 mostraron una reactividad escasa o nula.

Del grupo de AcMos que reconocen la proteína p80/125 los obtenidos frente a la cepa del VDVB NADL reconocieron mayoritariamente a los aislados españoles estudiados. Sin embargo, los AcMos específicos de p80/125 obtenidos frente a la cepa atípica porcina Vosges y frente a la cepa atípica ovina 59386 reaccionaron sólo con dos aislados pertenecientes al grupo de pestivirus atípicos. Estos datos sugieren que a pesar de que la proteína p80/125 está altamente conservada dentro de los pestivirus existen epitopos específicos de los pestivirus atípicos con respecto a los aislados clásicos del VDVB. Por tanto, los AcMos que reconocen dichos epitopos podrían utilizarse para diferenciar los aislados clásicos del VDVB de los pestivirus atípicos.

La representación gráfica de los resultados obtenidos con los anticuerpos monoclonales y los aislados españoles del VDVB estudiados mostraron que se pueden diferenciar dos grupos de aislados. En uno de ellos se encuentran la mayoría de los aislados estudiados (47 de 49 -95,9%-), los cuales son similares entre sí y similares a las cepas de referencia del VDVB y pertenecen al grupo de los aislados clásicos del VDVB. El segundo grupo está formado exclusivamente por dos aislados, los cuales pertenecen al grupo de los pestivirus atípicos. Es importante destacar que estas dos cepas no fueron aisladas de animales sino de líneas celulares establecidas. Por tanto, la presencia de pestivirus atípicos en España sería como máximo vestigial.

Un segundo objetivo de este trabajo fue investigar la prevalencia de Acs frente al VDVB en la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM).

La población diana de este estudio fue el ganado bovino de la CAM con una edad superior al año. Para la selección de la muestra se recurrió a un muestreo aleatorio polietápico, en nuestro caso en dos etapas. En una primera etapa se realizó un muestreo estratificado por un factor. La población a muestrear se estratificó por los 3 factores que inicialmente consideramos que podían influir en la prevalencia de anticuerpos frente al VDVB: la zona geográfica, la aptitud y el tamaño de la explotación. Para el estudio de la zona geográfica se dividió el territorio de la CAM en 4 áreas geográficas (1-4) teniendo en cuenta, además de consideraciones geográficas, el censo de vacuno en esas comarcas. Con respecto a la aptitud, se diferenciaron 3 grupos: vacuno de leche, vacuno de carne y vacuno de cebo. Por último, dentro del tamaño de la explotación se establecieron únicamente 2 tipos de

explotaciones: con más de 100 animales y con menos de 100 animales.

En una segunda etapa se tomaron como conglomerados las explotaciones de forma equiprobabilística.

El número de animales que se muestrearon del total de la población fue de 2634 (1085 de leche, 1042 de carne y 507 de cebo) correspondiente a 242 explotaciones (111 de leche, 97 de carne y 34 de cebo).

La detección de Acs frente al VDVB se realizó mediante una prueba ELISA de bloqueo comercial en la cual las placas estaban tapizadas con una proteína común (p80/120) a todas las cepas del VDVB. Asimismo, los resultados de la prueba ELISA se analizaron según un criterio de valoración semicuantitativo, según el cual los sueros dudosos se consideraron como negativos para el cálculo de la seroprevalencia. A los positivos, y en función de su densidad óptica (DO), se les asignó uno de los siguientes valores semicuantitativo (+, ++, +++, +++++, ++++++).

Los sueros con DO correspondientes a 3 ó más cruces se consideraron que tenían un título alto de anticuerpos frente al VDVB y este criterio se utilizó para calcular la seroprevalencia de título alto (TA) en la población y en los diferentes estratos considerados. Finalmente, por conveniencia, en el conjunto de los animales y en los diferentes grupos se calculó lo que se denominó título medio (TM) de anticuerpos asignando un valor numérico a las diferentes categorías (+ = 1, ++ = 2, +++ = 3, +++++ = 4, ++++++ = 5, - y ± = 0).

La seroprevalencia de anticuerpos frente al VDVB en el ganado bovino de la Comunidad Autónoma de Madrid estimada en este estudio fue del 65,6%, la seroprevalencia de título alto (TA) fue del 59,8%, ligeramente inferior a la global, y el título medio (TM) de anticuerpos fue 2,524 ( $\pm 1,976$ ). La prevalencia de explotaciones con al menos un animal seropositivo fue del 94,2% encontrándose ligeras variaciones en función de la aptitud: en el 100% de las explotaciones de cebo, en un 95,9% de las de carne y en un 91% de las de leche se encontraron animales seropositivos.

Los resultados de seroprevalencia global (64,9% para la leche, 65,7% para la carne, y 66,7% para el cebo), de seroprevalencia de TA (59,0% para la leche, 59,4% para la carne y 61,5% para el cebo), y de TM (2,454 para la leche, 2,554 para la carne y 2,611 para el cebo) en los tres estratos en que se dividieron los animales por su aptitud fueron muy homogéneos no encontrándose diferencias significativas en ninguno de los casos.

La seroprevalencia por áreas geográficas osciló entre el 61,7% de la 4 y el 69,2% de la 1. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la seroprevalencia del área geográfica 4 y las seroprevalencias de la 1 ( $p < 0,01$ ) y de la 3 ( $p < 0,05$ ). No obstante, ni en la prevalencia de TA ni en el TM se encontraron diferencias significativas entre los resultados de las cuatro áreas geográficas consideradas.

Los resultados de seroprevalencia global, de seroprevalencia de TA y de TM de las explotaciones con menos de 100 animales fueron muy similares a las halladas en las explotaciones de más de 100 animales, no encontrándose diferencias significativas entre ellas.

Los resultados obtenidos en las explotaciones lecheras con menos de 100 animales por áreas geográficas, tanto para la prevalencia, como para la prevalencia de TA y TM en el área geográfica 4 fueron significativamente menores en comparación con el resto de las áreas geográficas (prevalencia  $p < 0,0001$  en todos los casos, prevalencia TA  $p < 0,001$  con respecto a la 1 y  $p < 0,01$  con respecto a la 2 y 3; TM  $p < 0,05$  con respecto a la 2 y  $p < 0,001$  con la 1 y la 3).

Los resultados de prevalencia y de prevalencia de TA, obtenidos en el ganado bovino de cebo de explotaciones de menos de 100 animales por áreas geográficas indicaron igualmente que el área geográfica 4 mantenía diferencias significativas con las otras tres áreas geográficas (prevalencia  $p < 0,01$  con respecto a la 1,  $p < 0,05$  con respecto a la 2 y  $p < 0,001$  con respecto a la 3; prevalencia de TA  $p < 0,001$  con respecto a la 1 y la 2 y  $p < 0,001$  con respecto a la 3). En el TM únicamente se encontraron diferencias significativas entre la 4 y la 3 ( $p < 0,01$ ).

De las explotaciones de aptitud lechera y cárnica seleccionadas al azar para el muestreo, se decidió recabar información, entre otros temas, sobre el grado de conocimiento del ganadero de la DVB, sobre las prácticas de manejo (especialmente las que suponen un riesgo de introducción de la infección con el VDVB en las explotaciones) y sobre las prácticas de vacunación. Para ello se elaboró un cuestionario con 40 preguntas, agrupadas en 6 bloques temáticos: I) datos generales de la explotación, II) manejo general de la explotación, III) antecedentes de enfermedad, IV) antecedentes diarrea vírica bovina, V) practicas habituales de vacunación y desparasitación, VI) datos del ganadero.

El porcentaje de explotaciones de leche muestreadas que consiguieron encuestarse (68,5%) fue bastante aceptable, mientras que el de las de carne fue bajo (20,6%). Además, no se encontraron diferencias significativas en la seroprevalencia, en la seroprevalencia de TA y en el TM entre los animales de las explotaciones de leche encuestadas y los de las muestreadas, mientras que sí se encontraron diferencias en los tres parámetros entre los animales de las explotaciones de carne encuestadas y los de las muestreadas. Los cebaderos de terneros, por la propia naturaleza de estas explotaciones, se excluyeron de esta parte del estudio.

La seroprevalencia global, la seroprevalencia de TA y el TM fueron significativamente menores en las explotaciones lecheras cerradas que en las abiertas ( $p < 0.0001$  en todos los casos). Las diferencias en las seroprevalencias entre las explotaciones abiertas y cerradas son tanto más significativas cuanto que 15 (29,4%) de las explotaciones cerradas y sólo una (4%) de las abiertas usaban vacunas.

En 24 de las 76 explotaciones lecheras encuestadas había animales de otras especies diferentes a la bovina. En 21 de estas 24 explotaciones los otros animales eran ovejas (12 explotaciones) o cerdos (9 explotaciones), que como sabemos, se consideran reservorios potenciales del virus. No se encontraron diferencias significativas en el ganado bovino lechero ni en la prevalencia global, ni en la prevalencia de TA ni el TM entre las explotaciones que tenían otras especies de riesgo y las que no las tenían. En principio, por lo tanto, en la muestra analizada la presencia de ovejas o cerdos en las explotaciones no parecer afectar a la prevalencia de anticuerpos en los bóvidos.

En cuanto al método de cubrición empleado, el 42,1% (32/76) de las explotaciones lecheras encuestadas usaban sólo la IA, el 22,4% (17/76) sólo la monta natural y el 35,5% (27/76) utilizaban tanto la monta natural como la IA. Por otra parte, en 17 de las 20 explotaciones de carne (85%) encuestadas se usaba como único método la monta natural, en 2 se utilizaba la IA y en una ambos métodos.

No se encontraron diferencias significativas ni en la seroprevalencia global, ni en la seroprevalencia de TA ni en el TM entre los animales de las explotaciones de leche que usaban sólo IA y las que sólo utilizaban la monta natural. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la seroprevalencia global, en la seroprevalencia de TA y en el TM entre las explotaciones que utilizaban ambos métodos de cubrición tanto con las que sólo utilizaban la IA como con las que sólo usaban la monta natural ( $p < 0,001$  en todos los casos).

La Diarrea Vírica Bovina es una enfermedad relativamente poco conocida entre los ganaderos de la Comunidad de Madrid, si bien la enfermedad era más conocida por los ganaderos de las explotaciones de leche (30,3%, 23/76) que por los de carne (10%, 2/10).

El porcentaje de explotaciones en las que se utilizaba algún tipo de vacuna frente al VDVB fue relativamente bajo: sólo 16 de las 76 (21,0%) de los ganaderos de leche encuestados afirmaron que usaban vacunas, mientras que 55 (72,4%) manifestaron que no las usaban y 5 (6,6%) no sabían si se estaban o no utilizando en la explotación. Como cabía esperar, en las explotaciones lecheras que utilizaban vacunas la seroprevalencia fue significativamente mayor que en las que no vacunaban ( $p < 0,01$ ), como lo fue la prevalencia de TA ( $p < 0.0001$ ) y el TM ( $p < 0.001$ ).

## VII. BIBLIOGRAFIA

---

- Ackermans, M., S. Belak, V. Bitsch, S. Edwards, A. Moussa, G. Rockborn, E. Thiry. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. *Vet Microbiol.* 23: 361. 1990.
- Adler, B., H. Adler, H. Pfiste, T.W. Jungi, E. Peterhans. Macrophages infected with cytopathic BVD virus generate soluble factor(s) capable of priming uninfected cells for apoptosis in response to LPS: a mechanism relevant for the pathogenesis of mucosal disease. *3rd. ESVV Symposium on Pestivirus infections:* 33. Lelystad, Holanda, 1996.
- Afshar, A., M.D. Eaglesome. Viruses associated with bovine semen. *Vet Bull.* 60: 93. 1990.
- Afshar A, G.C. Dulac, C. Dubuc, T.H. Howard. Comparative evaluation of the fluorescent antibody test and microtiter immunoperoxidase assay for detection of bovine viral diarrhea virus from bull semen. *Can J Vet Res.* 55: 91. 1991.
- Alansari H., K. Brock, L. Potgieter. Single and double polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhea virus in tissue culture and sera. *J Vet Diagn Invest.* 5: 148. 1993.
- Alenius, S., S.O. Jacobsen, E. Cafaro. Frequency of bovine viral diarrhea virus infections in Sweden among heifers selected for artificial insemination. *World Congr Dis Cattle:* 204. Dublin, Irlanda. 1986.
- Álvarez, M., M. González, F. Álvarez, J.M. López, Llamazares. Prevalencia de las infecciones por el virus de la diarrea vírica bovina (BVD) en rebaños vacunos lecheros y su posible participación en problemas reproductivos. *VII Jornadas Internacionales de Reproducción:* 199. Murcia, 1994a.

- Álvarez, M., M. González, F. Álvarez. Prevalencia de la infección persistente por el virus de la diarrea vírica bovina en los rebaños vacunos lecheros. Principales características del animal persistentemente infectado por el virus. *VII Jornadas Internacionales de Reproducción*: 200. Murcia, 1994b.
- Ames, T.R. The causative agent of BVD: its epidemiology and pathogenesis. *Vet Med.* 81: 848. 1986.
- Baker, J.C. Bovine viral diarrhea virus: a review. *J Am Vet Med Assoc.* 190: 1449. 1987.
- Baker, J.C. Clinical aspects of bovine virus diarrhoea virus infection. *Rev Sci Tech off Int Epiz.* 9: 25. 1990.
- Baker, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11: 425. 1995.
- Barlow R.M., Patterson D.S.P. Border disease of sheep: a virus induced teratogenic disorder. *Adv. Vet. Med.* 36: 1-90. 1982.
- Becher, P., M. Orlich, H.J. Thiel. Phylogenetic analysis of Pestivirus implications for classification. *3rd. ESVV Symposium on Pestivirus infections*: 42. Lelystad, Holanda. 1996.
- Belak S., A. Ballagipordany. Bovine viral diarrhea virus infection-Rapid diagnosis by the polymerase chain reaction. *Arch Virol.* 3 (suppl): 181. 1991.
- Bennett, R.M. Case-study of a simple decision support system to aid livestock disease control decision. *Agricultural Systems.* 38: 111. 1992.
- Bielefeldt-Ohmann, H. The pathologies of bovine viral diarrhea virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11: 447. 1995.
- Bitsch V., L. Ronstholt. Control of bovine viral diarrhea virus infection without vaccines. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11: 627. 1995.
- Bock R.E., G.W. Burgess, I.C. Douglas. Development of an enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) for the detection of bovine serum antibody to bovine viral diarrhea virus. *Aust Vet J.* 63: 406. 1986.
- Bolin, S.R., A. W. McClurkin, R.C. Cutlip, M.F. Coria. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res.* 46: 573. 1985.
- Bolin, S.R. Viral and viral protein specificity of antibodies induced in cows persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus after vaccination with cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res.* 49: 1040. 1988.

- Bolin, S.R., V. Moennig, N.E. Kelso Gourley, J. Ripath. Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhea virus into groups. *Arch Virol.* 99: 117. 1988.
- Bolin, S.R., J.F. Ridpath. Specificity of neutralizing and precipitating antibodies induced in healthy calves by monovalent modified-live bovine viral diarrhea virus vaccines. *Am J Vet Res.* 50: 817. 1989.
- Bolin, S.R., E.T. Littledike, J.F. Ridpath. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhea viruses in a vaccinated herd. *Am J Vet Res.* 52: 1033. 1991.
- Bolin, S.R., J.F. Ridpath. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. *Am J Vet Res.* 53: 2157. 1992.
- Bolin, S.R., J.F. Ridpath, J. Black. Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhea virus. *J Virol Meth.* 48: 211. 1994.
- Bolin, S.R. The pathogenesis of mucosal disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11: 489. 1995a.
- Bolin, S.R. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11: 615. 1995b.
- Boulanger, D., S. Waxweiler, L. Karelle. Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhea virus: Evidence of a neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum. *J Gen Virol.* 72: 1195. 1991.
- Boulanger, D., J. Dubuisson, P. Pastoret. Studies on the neutralization mechanism of bovine viral diarrhea virus. *Proceedings of the 2nd. Symposium on Ruminant Pestivirus:* 157. Annecy, Francia, 1992.
- Brar, J.S., D.W. Johnson, C.C. Muscoplat, R.E. Shope, J.C. Heiske. Maternal immunity to infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea viruses: Duration and effect on vaccination in young calves. *Am J Vet Res.* 39: 241. 1978.
- Brock K.V., L.N.D. Potgieter. Detection of bovine viral diarrhea virus in serum from cattle by dot blot hybridization assay. *Vet Microbiol.* 24: 297. 1990.
- Brock K.V. Detection of persistent bovine viral diarrhea virus infections by DNA hybridization and polymerase chain reaction assay. *Arch Virol.* 3 (suppl): 199. 1991.
- Brock K., D. Redman, M. Vickers, N.E. Irvine. Quantitation of bovine viral diarrhea virus in embryo transfer flush fluids collected from a persistently infected heifer. *J Vet Diagn Invest.* 3: 99. 1991.

- Brock K.V., G. Radwan. Detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by PCR amplification. *Proceedings of the 2nd. Symposium on Ruminant Pestivirus*. Annecy, Francia, 1992.
- Brock K., J. Ridpath, R. Deng. Comparative hybridization and nucleotide sequence information from two noncytopathic isolates of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol.* 39: 69. 1993.
- Brock K.V., D.L. Grooms. Decline in levels of viremia in animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus over time. *Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians: 22*. Grand Rapids, Estados Unidos, 1994.
- Brock K.V. Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11: 549. 1995.
- Broes, A., G. Wellemans, J. Dheedene. Syndrome hemorrhagique chez des bovins infectés par le virus de la diarrhée virale bovine (BVD/MD). *Ann Med Vet.* 137: 33. 1992.
- Brown, T.T., A. De Lahunta, F.W. Scott, R.F. Kahr, K. McEntee, J.H. Gillespie. Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. II. Histopathology of cerebellar degeneration (hypoplasia) induced by the virus of bovine viral diarrhoea-mucosal disease. *Cornell Vet.* 63: 561. 1973.
- Brown, T.T., S.I. Bistner, A. De Lahunta, F.S. Scott, K. McEntee. Pathogenetic studies of infection of the bovine fetus with bovine viral diarrhoea virus. II. Ocular lesions. *Vet Pathol.* 12: 394. 1975.
- Brownlie, J., M.C. Clarke, C.J. Howard. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec.* 114: 535. 1984.
- Brownlie, J. Clinical aspects of bovine diarrhoea virus/mucosal disease complex in cattle. *In Pract.* 7: 195. 1985.
- Brownlie, J., C. Clarke, L.B. Hooper, G.D. Bell. Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. *Vet Rec.* 137: 58. 1995.
- Boulanger, D., S. Waxweiler, L. Karelle, M. Loncar, B. Mignon, J. Dubuisson, E. Thiry, P.P. Pastoret. Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus: evidence of a neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse. *J. Gen. Virol.* 72: 5. 1991.
- Carlsson, U., S. Alenius, B. Sundquist. Protective effect of an ISCOM bovine virus diarrhoea virus (BVDV) vaccine against an experimental BVDV infection in vaccinated and non-vaccinated pregnant ewes. *Vaccine.* 9: 577. 1991.

- Carlsson, U., R. Niskanen, S. Alenius, B. Larsson. A strategy for elimination of ongoing infection with BVDV in dairy herds. *Proceedings 2nd. Symposium on Pestivirus: 243*. Veyrier-du-Lac, Francia, 1992.
- Carlsson, U., K. Belak. Border disease virus transmitted to sheep and cattle by a persistently infected ewe: epidemiology and control. *Acta Vet Scand.* 35: 79. 1994.
- Castro, J.M., C. Gómez Tejedor, A. Solana. Distribución de la diarrea vírica bovina en España. *Med Vet.* 1: 181. 1984.
- Castrucci G., G. Avellini, V. Cilli, B. Pedini, M.C. Kercher, C. Valente. A study of immunologic relationships among serologically heterologous strains of bovine viral diarrhea virus by cross immunity tests. *Cornell Vet.* 65: 65. 1975.
- Castrucci, G., F. Frigeri, B.I. Osburn, M. Ferrari, M.M. Sawyer, V. Aldrovandi. A study of some pathogenetic aspects of bovine viral diarrhea virus infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 13: 41. 1990.
- Cay, B., G. Chappuis, C. Coulibary, Z. Dinter, S. Edwards, I. Greiser-Wilke, M. Gunn, P. Have. Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses: report of an international workshop. *Vet Microbiol.* 20: 123. 1989.
- Cochran W.G. Sampling techniques. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1977.
- Collet, M.S., R. Larson, C. Gold, D. Strink, D.K. Anderson, A.F. Purchio. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus. *Virology.* 165: 191. 1988a.
- Collet, M.S., R. Larson, S.K. Belzer, E. Retzel. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology.* 165: 200. 1988b.
- Collet, M.S., V. Moennig, M.C. Horzinek. Recent advances in pestivirus research. *J. Gen. Virol.* 70: 253. 1989.
- Collet, M.S. Molecular genetics of pestiviruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 15: 145. 1992.
- Corapi, W.V., T.W. French, E.J. Dubovi. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J Virol.* 63: 3934. 1989.
- Corapi, W.V., R.D. Elliott, T.W. French, D.G. Arthur, D.M. Bezek, E.J. Dubovi. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. *J Am Vet Med Assoc.* 196: 590. 1990.
- Coria, M.F., A.W. McClurkin. Duration of active and colostrum-deprived passive antibodies to bovine viral diarrhea virus in calves. *Can J Comp Med.* 42: 239. 1978.

- Cortese, V.S. No cause for alarm: Current BVD vaccines appear to cross-protect against virulent type 2 strains. *Topics Vet Med.* 5: 10. 1994.
- Cho H.J., S.A. Masri, D. Deregt, S.G. Yeo, E.J. Golsteyn Thomas. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine viral diarrhoea virus antibody in cattle. *Can J Vet Res.* 55: 56. 1991.
- Chu H., Y.C. Zee, A.A. Ardans, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bovine sera. *Vet Microbiol.* 10: 325. 1985.
- Da Silva, N. Detección e inactivación de virus en semen bovino destinado a la inseminación artificial. *Tesis Doctoral.* Universidad de Madrid. 1995.
- Da Silva, N., R. Zardoya, G. Santurde, A. Solana, J.M. Castro. Rapid and sensitive detection of the bovine viral diarrhoea virus genome in semen. *J Virol Meth.* 55: 209. 1995.
- Darbyshire, J.H. A Serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. *Vet Rec.* 72: 331. 1960.
- David, G.P., T.R. Crawshaw, R.F. Gunning, R.C. Hibberd, G.M. Lloyd, P.R. Marsh. Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *Vet Rec.* 134: 468. 1994.
- Deregt D., S.A. Masri, H.J. Cho, H. Bielefeldt-Ohmann. 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. 1990.
- Deregt D., S. Smithson, G.C. Kozub. A short incubation serum neutralization test for bovine viral diarrhoea virus. *Can J Vet Res.* 56: 161. 1992.
- Deregt D., S.R. Bolin, R.A. Heckert, K.G. Loewen. Monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus: cross reactivities to field isolates and hog cholera virus strains. *Can J Vet Res.* 58: 71. 1994
- Deregt, D., K.G. Loewen. Bovine viral diarrhoea virus: biotypes and disease. *Can Vet J.* 36: 371. 1995.
- Dinter, Z. Relationship between bovine virus diarrhoea virus and hog cholera virus. *Zbl Bak Par Infek Hyg.* 188: 475. 1963.
- Donate, J., F. Mazzucchelli. Actualización en diarrea vírica bovina. *Med Vet.* 12: 486. 1995.
- Done, J.T., S. Terlecki, C. Richardson, J.W Harkness, J.J. Sands, D.S.P. Patterson, D. Sweasey, I.G. Shaw, C.E. Winkler, S.J. Duffell. Bovine virus diarrhoea-mucosal

- disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet Rec.* 106: 473. 1980.
- Donis, R.O., E.J. Dubovi. Characterization of bovine viral diarrhea-mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells. *J Gen Virol.* 68: 1597. 1987a.
- Donis, R.O., E.J. Dubovi. Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally and experimentally infected with cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus biotypes. *Am J Vet Res.* 48: 1549. 1987b.
- Donis, R.O., W. Corapi, E.J. Dubovi. Neutralizing monoclonal antibodies to Bovine Viral Diarrhoea Virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *J Gen Virol.* 69: 77. 1988.
- Donis, R., W. Corapi, E. J. Dubovi. Bovine viral diarrhea and their antigenic analyses. *Arch Virol.* 3 (suppl): 29. 1991.
- Donis, R.O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11: 393. 1995.
- Dubovi E.J. The diagnosis of bovine viral diarrhea infections- A laboratory view. *Vet Med.* 85: 1133. 1990.
- Dubovi, E.J. Genetic diversity and BVD virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 15: 155. 1992.
- Duffell, S.J., J.W. Harkness. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet Rec.* 117: 240. 1985.
- Durham P.J., L.E. Hassard. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol.* 22: 1. 1990.
- Edwards, J.R. Surveys and questionnaires design, conduct and analysis. Epidemiology for Veterinarians, Refresher course. Post Graduate Committee in Veterinary Science, University of Sidney, pp 151-158. 1990.
- Edwards, S., L. Wood, C. Hewitt-Taylor, T.W. Drew. Evidence for an immunocompromising effect of bovine pestivirus on bovid herpesvirus I vaccination. *Vet Res Comm.* 10: 297. 1986.
- Edwards, S., T.W. Drew, S.E. Bushnell. Prevalence of bovine virus diarrhoea virus viraemia. *Vet Rec.* 120: 71. 1987.
- Edwards S., Sands J.J., Harkness J.W. The application of monoclonal antibody panels to characterize pestivirus isolates from ruminants in Great Britain. *Arch. Virol.*, 102:197-206. 1988.
- Edwards S., Sands J.J. Antigenic comparison of hog cholera virus isolates from Europe, America and Asia using monoclonal antibodies. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, 97:79, 1990.

- Edwards S. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Rev Sci Tech off Int Epiz.* 9: 115. 1990.
- Edwards, S., L. Wood, S. Brockman, G. Iyata. Clinical and virological observations of a mucosal disease outbreak with persistently infected seropositive survivors. *Arch Virol.* 3 (suppl): 125. 1991.
- Edwards, S., D. Paton. Antigenic differences among pestiviruses. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11: 563. 1995.
- Edwards, S. Pestivirus diversity progress report on the international collaborative study. *3rd. ESVV Symposium on Pestivirus infections:* 41. Lelystad, Holanda, 1996a.
- Edwards, S. Observations of Bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds, and the response to different control strategies. *3rd. ESVV Symposium on Pestivirus infections:* 138 Lelystad, Holanda, 1996b.
- Ellis, J.A., W.C. Davis, E.L. Belden, D.L. Pratt. Flow cytofluorimetric analysis of lymphocyte subset alterations in cattle infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet Pathol.* 25: 231. 1988.
- Ellis, J.A., K. Martin, G.R. Norman, D.M. Haines. Comparison of detection methods for bovine viral diarrhea virus in bovine abortions and neonatal death. *J Vet Diag Invest.* 7: 433. 1995.
- Entrican, G., A. Dand, P.F. Nettleton. A double monoclonal antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. *Vet Microbiol.* 43: 65. 1995.
- Felsenstein J. Philyp: phylogeny inference pack-age (versión 3.2). *Cladistics* 5:164. 1989.
- Fenton A., G. Entrican, J.A. Herring, *et al.* An ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of sheep of persistently infected with border disease virus. *J Virol Methods.* 27: 253. 1990.
- Fenton A., P.F. Nettleton, G. Entrican. Identification of cattle infected with bovine virus diarrhoea virus using a monoclonal antibody capture ELISA. *Arch Virol.* 3: 169. 1991.
- Fernelius, A.L., G. Lambert, R.A. Packer. Bovine viral diarrhea virus-host cell interactions: Adaptation, propagation, modification, and detection of virus in rabbits. *Am J Vet Res.* 30: 1541. 1969.
- Fernelius, A.L., L.G. Classick, R.L. Smith. Evaluation of a soluble antigen vaccine prepared from bovine viral diarrhea-mucosal disease virus-infected cell cultures. *Am J Vet Res.* 32: 1963. 1971.

- Fernelius, A.L., L.G. Classick, R.L. Smith. Evaluation of  $\beta$ -propiolactone-inactivated- and chloroform-treated-virus vaccines against bovine viral diarrhoea-mucosal disease. *Am J Vet Res.* 33: 1422. 1972.
- Forshell, K.P., S.O. Olsson, L. Jacobsson. Presentation of the Swedish voluntary control programme on Bovine Virus Diarrhoea (BVD). *Proceedings of the 17th Nordic Veterinary Congress*: 218. Reykjavik, Islandia, 1994.
- Francki, R., C. Fauquet, D. Knudson. Classification and nomenclature of viruses. *Fifth Report of the ICTV*. New York, Springer-Verlag, 1991.
- Gillespie, J.H., J.A. Baker, K. McEntee. A cytopathogenic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Cornell Vet.* 50: 73. 1960.
- Goding J.W. Monoclonal antibodies: principles and practice. 2nd edition, 1986, *Academic Press*, London, Reino Unido.
- Grahn, T.C., M.L. Fahning, R. Zemjanis. Nature of early reproductive failure caused by bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc.* 185: 429. 1984.
- Greig, A., I.R. Gibson, P.F. Nettleton, J.A. Herring. Disease outbreak in calves caused by a mixed infection with infectious bovine rhinotracheitis virus and bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec.* 108: 480. 1981.
- Greiser W.I., H. Frey, J. Bottcher, B Liess, V Moennig. Use of a modified "antigen capture" enzyme immunoassay for the identification of virus persistence in cattle infected with bovine virus diarrhoea (BVD). *Tierarztl Prax.* 21: 302. 1993.
- Gruber A., W.I. Greiser, L. Haas, M Hewicker-Trautwein, V Moennig. Detection of bovine viral diarrhoea virus RNA in formalin fixed, paraffin embedded brain tissue by nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 43: 309. 1993.
- Gutekunst D.E., Malmquist W.A. Separation of a soluble antigen and infectious particle of bovine viral diarrhoea viruses and their relationship to hog cholera. *Can. J. Comp. Med.* 27:121. 1963.
- Hafez S.M., B. Liess, H.R. Frey. Studies on the natural occurrence of neutralizing antibodies against six strains of bovine viral diarrhoea virus in field sera of cattle. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin B.* 23:669.1976.
- Haines D.M., E.G. Clark, E.J. Dubovi. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet Pathol.* 29: 27. 1992.
- Hamel, A.L., M.D. Wasylyshen, G.P. Nayar. Rapid detection of bovine viral diarrhoea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay. *J Clin Microbiol.* 33: 287. 1995.

- Harkness J.W., A.A. King, S. Terlecki , *et al.* Border disease of sheep: Isolation of virus in tissue culture and experimental reproduction of the disease. *Vet Rec.* 100: 71. 1977
- Harkness, J.W., J.J. Sands, M.S. Richards. Serological studies of mucosal disease virus in England and Wales. *Res Vet Sci.* 24: 98. 1978.
- Harkness, J.W. The control of bovine virus diarrhoea virus infection. *Ann Rech Vet.* 18: 233. 1987.
- Harkness, J.W., P.L. Roeder, T. Drew. The efficacy of an experimental inactivated BVD-MD vaccine. In *Harkness JW: Pestivirus infections of Ruminants.* Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities. 233. 1987.
- Hertig C., U. Pauli, R. Zanoni, E. Peterhans. Detection of bovine viral diarrhoea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 26: 65. 1991.
- Hibberd, R.C., A. Turkington. Fatal bovine viral diarrhoea virus infection of adult cattle. *Vet Rec.* 132: 227. 1993.
- Hjerpe, C.A. Bovine vaccines and herd vaccination programs. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 6: 171. 1990.
- Holm Jensen, M. Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhoea virus in porcine serum. A comparative examination using CF, PLA, and NPLA assays. *Acta Vet. Scand.* 22:85. 1981.
- Hoofit van Iddekinge B.J.L., J.L.B. van Wamel, H.G.P. van Gennip, R.J. Moormann. Application of the polymerase chain reaction to the detection of viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet Microbiol.* 30: 21. 1992.
- Horner, G.W., K.M. Tham, D. Orr, J. Ralston, S. Rowe, T. Houghton. Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription-polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Vet Microbiol.* 43: 75. 1995.
- Horzinek, M.C. Nonarbo togavirus infections of animal: comparative aspect and diagnosis. *Comparative diagnosis of viral disease.* New York, Academic Press. 442. 1981.
- Houe, H., A. Meyling. Surveillance of cattle herds for bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections using data on reproduction and calf mortality. *Arch Virol.* 3 (suppl): 157. 1991a.
- Houe, H., A. Meyling. Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Prev Vet Med.* 11: 9. 1991b.

- Houe, H., K.M. Pedersen, A. Meyling. A computerized spread sheet model for calculating total annual national losses due to bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds and sensitivity analysis of selected parameters. *Proceedings of the 2nd. Symposium on Ruminant Pestivirus*: 179. Annecy, Francia, 1992.
- Houe, H., J.W. Lloyd, J.C. Baker. Decision tree analysis of control strategies in Danish dairy herds with outbreaks of mucosal disease. *Prev Vet Med*. 21: 133. 1994.
- Houe, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 11: 521. 1995.
- Houe, H., J.C. Baker, R.K. Maes, P.L. Ruegg, J.W. Lloyd. Application of antibody titers against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV. *J Vet Diagn Invest*. 7: 327. 1995a.
- Houe, H., J.C. Baker, R.K. Maes, H. Wuryastuti, R. Wasito, P.L. Ruegg, J.W. Lloyd. Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in 20 dairy herds in two counties in central Michigan and comparison of prevalence of antibody-positive cattle among herds with different infection and vaccination status. *J Vet Diagn Invest*. 7: 321. 1995b.
- Howard T.H., B. Bean, R. Hillman, *et al.* Surveillance for persistent bovine viral diarrhoea virus infection in four artificial insemination centers. *J Am Vet Med Assoc*. 196: 1951. 1990.
- Juntti, N., B. Larsson, C. Fossum. The use of monoclonal antibodies in enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine virus diarrhoea virus. *J Vet Med*. 34: 356. 1987.
- Kahrs, R.F. Determination of a 95% antigenic dose for bovine virus diarrhoea vaccine. *Am J Vet Res*. 27: 1951. 1966.
- Kahrs, R.F., E.P.J. Gibbs, R.E. Larsen. The search for viruses in bovine semen: a review. *Theriogenology*. 14: 151. 1980.
- Kamstrup, S., L. Ronsholt, M.H. Jensen, K. Dalsgaard. A novel subunit ISCOM vaccine against bovine virus diarrhoea virus. *Rev Sci Tech*. 11: 873. 1992.
- Kelling C.L., L.C. Stine, K.K. Rump *et al.* Investigation of bovine viral diarrhoea virus infections in a range beef cattle herd. *J Am Vet Med Assoc*. 197: 589. 1990.
- Kirkland, P.D., S.G. Richards, J.T. Rothwell, D.F. Stanley. 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. 1991.
- Kirkland, P.D., S.G. Mackintosh, A. Moyle. The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. *Vet Rec*. 135: 527. 1994.

- Kolar, J.R., I.L. Shechmeister, W.G. Kammlade. Use in cattle of formalin-killed polyvalent vaccine with adjuvant against infectious bovine rhinotracheitis, bovine viral diarrhoea, and parainfluenza-3 viruses. *Am J Vet Res.* 33: 1415. 1972.
- Koonin, E.V., V.V. Dolja. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 28: 375. 1993.
- Kwang J., E.T. Littledike, S. Bolin, M.S. Collett. Efficiency of various cloned DNA probes for detection of bovine viral diarrhoea viruses. *Vet Microbiol.* 28: 279. 1991.
- Kwang, J., S.R. Bolin, E.T. Littledike. Bovine viral diarrhoea serologic diagnostic reagents prepared from bacterially expressed recombinant proteins. *J Vet Diagn Invest.* 7: 143. 1995.
- Lang-Ree, J.R., T. Vatn, E. Kommisrud, T. Loken. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. *Vet Rec.* 135: 412. 1994.
- Larsson, B., C. Fossum. Bovine virus diarrhoea virus induces *in vitro* a proliferative response of peripheral blood mononuclear cells from cattle immunized by infection. *Vet Microbiol.* 31: 317. 1992.
- Lewis T.L., J.F. Ridpath, S.R. Bolin, E.S. Berry. Detection of BVD viruses using synthetic oligonucleotides. *Arch Virol.* 117: 269. 1991.
- Liebermann, H. Infecciones por pestivirus: Diarrea vírica/enfermedad de las mucosas de los bóvidos. *Enfermedades infecciosas de los animales domesticos.* Beer, J. (Tomo I). Ed. Acribia. Capítulo 7.2, 104-108. 1983.
- Liebler, E.M., J. Waschbüsch, J.F. Pohlenz, V. Moenning, B. Liess. Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease. *Arch Virol.* 3 (suppl): 109. 1991.
- Liess, B., S. Orban, H.R. Frey, G. Trautwein, W. Wiefel, H. Blindow. Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVD virus 90-229 days before parturition (51st to 190th day of gestation). *Zbl Vet Med B.* 31: 669. 1984.
- Liess, B., V. Moennig. Ruminant pestivirus infection in pigs. *Rev Sci Tech off Int Epiz.* 9: 151. 1990.
- Liess, B. Control of BVD virus infection in cattle. *Proceedings of the 2nd Symposium on Pestiviruses: 231.* Veyrier-du-Lac. Francia, 1992.

- Liess, B., S. Reinecke, G. Sanders, I. Greiser-Wilke, V. Moennig. An immunoplaque assay distinguishing between cytopathogenic and noncytopathogenic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Med B*. 40: 89. 1993.
- Lobmann, M., P. Charlier, G. Florent, N. Zygraich. Clinical evaluation of a temperature-sensitive bovine viral diarrhoea vaccine strain. *Am J Vet Res*. 45: 2498. 1984.
- Lobmann, M., P. Charlier, C.L. Klaassen, N. Zygraich. Safety of a temperature-sensitive vaccine strain of bovine viral diarrhoea virus in pregnant cows. *Am J Vet Res*. 47: 557. 1986.
- Loken, T., J. Krogsrud, I.L. Larsen. Pestivirus infections in Norway. Serological investigation in cattle, sheep and pigs. *Acta Vet Scand*. 32: 27. 1991.
- Loken, T. Ruminant pestivirus infections in animals other than cattle and sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 11: 597. 1995.
- López O.J., F.A. Osorio, R.O. Donis. Rapid detection of bovine viral diarrhoea virus by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 29: 578. 1991.
- Ludemann L.R., J.B. Katz. Enzyme-linked immunosorbent assay assessment of bovine viral diarrhoea virus antigen in inactivated vaccines using polyclonal or monoclonal antibodies. *Biologicals*. 22: 21. 1994.
- Magar, R., H.C. Minocha, J. Lecomte. Bovine viral diarrhoea virus proteins: heterogeneity of cytopathogenic and non-cytopathogenic strains and evidence of a 53K glycoprotein neutralization epitope. *Vet Microbiol*. 16: 303. 1988.
- Marín, J. IBR y BVD: seroprevalencia en animales con trastornos reproductivos. Análisis, evolución y situación actual en Extremadura. *Rev. Prod. Animal*. 1997.
- Martin, S., P. Berlinski, P. Guimond. Evaluation of various BVDV isolates to induce protection against challenge with virulent BVDV. *Proceedings of the Conference Res Workers Anim Dis*. 75: 183. 1994.
- McClurkin, A.W., M.F. Coria, R.L. Smith. Evaluation of acetyleneimine-killed bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus (BVD) vaccine for prevention of BVD infection of the fetus. *Proceedings of the Annu Meet US Anim Health Assoc*. 79: 114. 1975.
- McClurkin, A.W., M.F. Coria. Selected isolates of bovine viral diarrhoea (BVD) virus propagated on bovine turbinate cells: virus titer and soluble antigen production as factors in immunogenicity of killed BVD virus. *Arch Virol*. 58: 119. 1978.
- McClurkin, A.W., M.F. Coria. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) serotiters stimulated in cattle in isolation and under field conditions by inactivated BVDV vaccine. *Proceedings of the Annu Meet US Anim Health Assoc*. 79: 223. 1980.

- McClurkin, A.W., S.R. Bolin, M.F. Coria. Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea. *J Am Vet Med Assoc.* 186: 568. 1985.
- McHugh, P.H., D.P. Mackie, M.S. McNulty, *et al.* Production of monoclonal antibodies to bovine virus diarrhoea virus and their reactivity with selected pestivirus isolates. *J Vet Med B* 35: 207. 1988
- Menanteau-Horta, A.M., T.R. Ames, D.W. Johnson, J.C. Meiske. Effect of maternal antibody upon vaccination with infectious bovine rhinotracheitis and bovine virus diarrhoea vaccines. *Can J Comp Med.* 49: 10. 1985.
- Meyers, G., T. Rumenapft, H.J. Thiel. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of Hog Cholera Virus. *Virology.* 171: 555. 1989.
- Meyers, G., N. Tautz, E.J. Dubovi, H.J. Thiel. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequence. *Virology.* 180: 602. 1991.
- Meyers, G., N. Tautz, R. Stark, J. Brownlie, E.J. Dubovi, M.S. Collett, H.J. Thiel. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology.* 191: 368. 1992.
- Meyling A. Detection of BVD virus in viraemic cattle by an indirect immunoperoxidase technique. Diagnosis. (McNulty, M.S., J.B. McFerran (eds): *Recent advances in virus.* Martinus Nijhoff / Publishers. 37-46. 1984.
- Meyling, A., L. Ronsholt, K. Dalsgaard, A.M. Jensen, J.W. Harkness. Experimental exposure of vaccinated and nonvaccinated pregnant cattle to isolates of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). Harkness JW (ed): *Pestivirus infections of Ruminants.* Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities. 225. 1987.
- Meyling, A., A.M. Jensen. Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Vet Microbiol.* 17: 97. 1988.
- Meyling, A., H. Houe, A.M. Jensen. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev Sci Tech Off Inter Epi.* 9: 75. 1990.
- Mignon B., Waxweiler S., Thiry E., Boulanger D., Dubuisson J., Pastoret P.P. *J. Virol. Methods,* 40: 85-94. 1992.
- Moennig, V. Dissertation. *Veterinary School.* Hannover, Germany. 1971.
- Moennig, V., S.R. Bolin, C.O.Z. Coulibaly, N.E. Kelso Gourley, B. Liess, A. Mateo, W. Peters, I. Greiser Wilke. Untersuchungen zur Antigenstruktur von Pestiviren mit Hilfe monoklonaler Antikörper. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift.* 94: 572. 1987.

- Moennig V., L. Leder, W.I. Greiser, *et al.* A new enzyme immunoassay for the detección of antibodies against the bovine viral diarrhoea virus. *Tierarztl Prax.* 19: 35. 1991.
- Moennig, V., P.G. Plagemann. The pestiviruses. *Adv Virus Res.* 41: 53. 1992.
- Moennig, V., B. Liess. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11: 477. 1995.
- Moerman, A., P.J. Straver, M.C.M. de Jong, J. Quak, Th. Baanvinger, J.T. Van Oirschot. Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea in a dairy herd: a longitudinal study. *Vet. Q.* 16: 115. 1994.
- Mohanty, J.G., Y. Elazhary, B. Talbot. Detergent solubilised bovine viral diarrhoea virus elicits a similar immune response as the inactivated virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 12: 129. 1989.
- Moorhouse, P.D, Hugh-Jones, M.E. Serum banks. *The Veterinary Bulletin*, 51:277-290. 1981.
- Moormann, R.J.M., P.A.M. Warmerdam, B. Van Der Meer, V.M.M. Schaaper, G. Wensvoort, M.M. Hulst. Molecular cloning and nucleotide sequence of Hog Cholera Virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology.* 177: 184. 1990.
- Murphy, F.A., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo, M.D. Summers. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Virus. *Sixth Report of the ICTV.* Springer-Verlag, New York, 10: 415. 1995.
- Murray, R.D. A field investigation into causes of bovine abortion in dairy cattle. *Vet Rec.* 127: 543. 1990.
- Nettleton, P.F. Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 9: 131. 1990.
- Nettleton P.F., G. Entrican. The diagnosis of ruminant pestivirus infections. P. 185-191. 1993.
- Nettleton, P.F., G. Entrican. Ruminant pestiviruses. *Br Vet J.* 151: 615. 1995.
- Niskanen, R., S. Alenius, B. Larsson, S.O. Jacobsson. Determination of level of antibodies to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDB infections in dairy herds. *Arch Virol.* 3 (suppl): 113. 1991.
- Niskanen, R. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet Rec.* 133: 341. 1993.

- Olafson, P., A.D. MacCallum, A. Fox. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* 36: 205. 1946.
- Olafson, P., C.G. Rickard. Further observations on the virus diarrhea (new transmissible disease) of cattle. *Cornell Vet.* 37: 104. 1947.
- OMS. Encuestas inmunológicas y hematológicas. Serie de informes técnicos, nº 181 (1959 - 1970).
- Onisk, D.V., R. Donis, C.L. Kelling, S. Srikumaran. Bovine viral diarrhea virus-specific neutralizing antibodies induced by anti-idiotypic antibodies. *Viral Immunol.* 5: 257. 1992.
- Orban, S., B. Liess, S.M. Hafez, H.R. Frey, H. Blindow, B. Sasse-Patzer. Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus. I. Inoculation of pregnant cows 15 to 90 days before parturition (190th to 265th day of gestation). *Zbl Vet Med B.* 30: 619. 1983.
- Ovejero, J.I. La diarrea vírica bovina en España. II.- Aislamiento, identificación y caracterización del virus. *Revista Patronato Biología Animal.* 15: 129. 1971.
- Palfi, V., H. Houe, J. Philipsen. Studies on the decline of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV in persistently infected calves. *Acta Vet Scand.* 34: 105. 1993.
- Paton D.J., Sands J.J., Roehe, P.M. BVD monoclonal antibodies: relationship between viral protein specificity and viral strain specificity. *Arch. Virol.* (Suppl. 3), 47-54. 1991a.
- Paton, D.J., G. Ibata, S. Edwards. An ELISA detecting antibody to conserved pestivirus epitopes. *J Virol Meth.* 31: 315. 1991b.
- Paton, D.J., J.P. Lowings, A.D.T. Barrett. Epitope mapping of the gp53 envelope protein of bovine viral diarrhea virus. *Virology.* 190: 763. 1992.
- Paton, D.J., J.J. Sands, S. Edwards. Border disease virus: delineation by monoclonal antibodies. *Arch Virol.* 135: 241. 1994.
- Paton, D.J., J.J. Sands, J.P. Lowings, J.E. Smith, G. Ibata, S. Edwards. A proposed division of the pestivirus genus into subgroups using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing. *Vet Res.* 26: 92. 1995.
- Paton, D.J., A. McGoldrick, P. Lowings, T. Drew, F. Yapp. Transient expression and mutagenesis of the E2 protein of BVDV. *3rd. ESVV Symposium on Pestivirus infections:* 69. Lelystad, Holanda. 1996.

- Pellerin, C., J. van-den-Hurk, J. Lecomte, P. Tussen. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*. 203: 260. 1994.
- Peters W., Moennig V., Liess B. Preliminary serological characterization of bovine viral diarrhoea virus strains using monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 12: 195. 1986.
- Plant, J.W., I.R. Littlejohns, A.C. Gardiner. Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. *Vet Rec.* 92: 455. 1973.
- Porterfield, J.S., J. Casals, M.P. Chumakov. *Togaviridae. Intervirolog.* 9: 129. 1978.
- Potgieter, L.N.D., M.D. McCracken, F.M. Hopkins, R.D. Walker. Effect of bovine viral diarrhea virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. *Am J Vet Res.* 45: 687. 1984a.
- Potgieter, L.N.D., M.D. McCracken, F.M. Hopkins, R.D. Walker, J.S. Guy. Experimental production of bovine respiratory tract disease with bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res.* 45: 1582. 1984b.
- Potgieter, L.N.D. Immunology of bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Animal Pract.* 11: 501. 1995.
- Prieto, M., P. Cármenes, M. Álvarez. Prevalencia de los anticuerpos contra el virus de la diarrea vírica bovina (BVD) y el herpesvirus bovino 1 (IBR-IPV) en el ganado vacuno lechero de la región asturiana (España). *Actas XV Congreso Mundial de Buyatria:* 896. Palma de Mallorca, 1988.
- Pritchard, G. Diagnosing the cause of bovine abortion. *In Practice.* 12: 92. 1990.
- Qvist P., B. Aasted, B. Bloch, *et al.* Flow cytometric detection of bovine viral diarrhea virus in peripheral blood leukocytes of persistently infected cattle. *Can J Vet Res.* 54: 469. 1990.
- Qvist, P., H. Houe, B. Aasted, A. Meyling. Comparison of flow cytometry and virus isolation in cell culture for identification of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J Clin Microbiol.* 29: 660. 1991.
- Radwan, G.S., K.V. Brock, J.S. Hogan, K.L. Smith. Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol.* 44: 77. 1995.
- Ramsey, F.K., W.H. Chivers. Mucosal disease of cattle. *North Am Vet.* 34: 629. 1953.
- Real-Decreto 2256/1994. Exigencias de policía sanitaria aplicables a los intercambios intracomunitarios y a las importaciones de esperma de animales de la especie bovina. *B.O.E.* 4: 331. 1995.

- Rebhun, W.C., T.W. French, J.A. Perdrizet, E.J. Dubovi, S.G. Dill, L.F. Karcher. Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. *J Vet Intern Med.* 3: 42. 1989.
- Reddy, E.S.P., M.R. Das, E.P. Reddy, P.M. Bhargava. Inhibition of reverse transcriptases (E.C.2.7.7.49) by seminal plasmin. *Biochem. J.* 209: 183. 1983.
- Reed I.J., Muench R.H. A simple method to estimate fifty per cent in points. *Am. J. Hyg.*, 27: 493. 1938.
- Reggiardo, C. Role of the BVD virus in shipping fever of feedlot cattle. Case study and diagnostic considerations. *Proceedings of the. 22nd Ann Meeting Am Ass Vet Lab Diag:* 315. San Diego, Estados Unidos, 1979.
- Reggiardo, C., L.M. Kaeberle. Detection of bacteremia in cattle inoculated with bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res.* 42: 218. 1981.
- Reid, H.W. Ruminant Pestivirus infections-Advances in Research bring prospects for their Control. *Br Vet J.* 151: 597. 1995.
- Revells, S.G., D. Chasey, T.W. Drew, S. Edwards. Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Rec.* 123: 122. 1988.
- Richer, L., P. Marois, L. Lamontagne. Association of bovine viral diarrhoea virus with multiple viral infections in bovine respiratory disease outbreaks. *Can Vet J.* 29: 713. 1988.
- Ridpath J.F., S.R. Bolin, J. Kaz. Comparison of nucleic acid hybridization and nucleic acid amplification using conserved sequences from the 5'noncoding region for detection of bovine viral diarrhea virus. *J Clin Microbiol.* 31: 986. 1993.
- Ridpath, J., S. Bolin, E. Dubovi. Segregation of Bovine Viral Diarrhea virus into genotypes. *Virology.* 205: 66. 1994.
- Roeder, P.L., J.W. Harkness. BVD virus infection: prospects for control. *Vet Rec.* 118: 143. 1986.
- Roeder, P.L., M. Jeffrey, M.P. Cranwell. Pestivirus fetopathogenicity in cattle: changing sequelae with fetal maturation. *Vet Rec.* 118: 44. 1986.
- Rossi, C.R., B.S. Bridgman, G.K. Kiesel. Viral contamination of Bovine Fetal Lung Cultures and Bovine Fetal Serum. *Am J Vet Res.* 41: 1680. 1980.
- Roth, J.A., M.L. Kaeberle. Suppression of neutrophil and lymphocyte function induced by a vaccinal strain of bovine viral diarrhoea virus with and without the administration of ACTH. *Am J Vet Res.* 44: 2366. 1983.

- Rümenapf, T., R. Stark, G. Meyers, H.J. Thiel. Structural proteins of Hog Cholera Virus expressed by Vaccinia Virus: further characterization and induction of protective immunity. *J Virol.* 65: 589. 1991.
- Sanchez, J.M. Seroprevalencia de la Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y la Diarrea vírica bovina (BVD) en ganado bravo de la provincia de Badajoz. *Producción Animal.* 129: 49. 1998.
- Sandvik, T., J. Krogsrud. Evaluation of an antigen-capture ELISA for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle blood samples. *J Vet Diagn Invest.* 7: 65. 1995.
- Schmitt, B.J., O.J. Lopez, J.F. Ridpath, J. Galeota-Wheeler, F.A. Osorio. Evaluation of PCR for diagnosis of bovine viral diarrhea virus in tissue homogenates. *J Vet Diagn Invest.* 6: 44. 1994.
- Schukken, Y.H., D. Van de Geer, F.I. Grommers, A. Brand. Assessing the repeatability of questionnaire data from dairy forms. *Prev Vet Med.* 7:31. 1989.
- Schultz, R.D. Certain factors to consider when designing a bovine vaccination program. *Proceedings of the 26th Annual Convention of the American Association of Bovine Practitioners:* 19, Albuquerque, Estados Unidos, 1993.
- Shannon A.D., S.G. Richards, P.D. Kirkland, A. Moyle. An antigen-capture ELISA detects pestivirus antigens in blood and tissues of immunotolerant carrier cattle. *J Virol Methods.* 34: 1. 1991.
- Simpson, B.H., Wright, D.F. The use of questionnaires to assess the importance of clinical diseases in sheep. *2th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics:* 97, Camberra, Australia, 1979.
- Snyder, M.L., G.A. Gustafson, W.C. Stewart. A comparison of virus isolation and tissue section immunofluorescent techniques in bovine viral diarrhea diagnosis. *Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians:* 303, Estados Unidos, 1979.
- Spedding-C.R.W, R. M. Bennett, J.T. Done, J.W. Harkness. Control of BVD: a case for SCBA? *Harkness J.W. (ed) Pestivirus infections of ruminants.* A seminar in the CEE Program of Coordination of Research on Animal Husbandry: 253. Bruselas, 1987.
- Spearman, C., Karber. The method of "right and wrong" cases ("constant stimuli") without Gauss's formulae. *British Journal of Psychology,* 2: 227. 1908.
- Ssentongo, Y.K., Johnson. R.H., J.R. Smith. Association of bovine virus diarrhoea-mucosal disease with ovaritis in cattle. *Austr Vet J.* 56: 272. 1980.

- Stark, R., G. Meyers, T. Rümenapf, H.J. Thiel. Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol.* 67: 7088. 1993.
- Tarry, D.W., L. Bernal, S. Edwards. Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. *Vet Rec.* 128: 82. 1991.
- Tautz, N., H.J. Thiel, E.J. Dubovi, G. Meyers. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J Virol.* 68: 3289. 1994.
- Trautwein, G., M. Hewicker, B. Liess, S. Orban, E. Grunert. Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. III. Occurrence of central nervous system malformations in calves born from vaccinated cows. *J Vet Med B.* 33: 260. 1986.
- Van Zijl, M., G. Wensvoort, E. De Kluyver, M. Hulst, H. van der Gulden, A. Gielkens, A. Berns, R. Moormann. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J Virol.* 65: 2761. 1991.
- Vaillancourt, J.P., Martineau, G., Morrow, M., Marsh, W., Robinson, A. Construction of questionnaires and their use in veterinary medicine. *Proceedings of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine:* 94, Londres, Reino Unido. 1991.
- Vickers M., H. Minocha. Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infection using monoclonal antibodies. *J Vet Diagn Invest.* 2: 300. 1990.
- Waage, S., J. Krogsrud, O. Nyberg. The Norwegian programme for eradication of bovine viral diarrhoea/mucosal disease. *Proceedings of the 18th World Buiatric Congress:* 773. Bologne, Italia. 1994.
- Waltner-Toews, D. Questionnaire design and administration. *Thrid International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics:* 31, Arlington, Virginia, Estados Unidos, 1882.
- Ward A.C.S., M.I. Kaeberle. Use of an immunoperoxidase stain for the detection of bovine viral diarrhoea virus by light and electron microscopies. *Am J Vet Res.* 45: 165. 1984.
- Ward P., V. Misra. Detection of bovine viral diarrhoea virus, using degenerate oligonucleotide primers and the polymerase chain reaction. *Am J Vet Res.* 52: 1231. 1991.
- Weiland, E., R. Stark, B. Haas, T. Rümenapf, G. Meyers, H.J. Thiel. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol.* 64: 3563. 1990.

- Wensvoort, G., C. Terpstra. Bovine viral diarrhoea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. *Res Vet Sci.* 45: 143. 1988.
- Wensvoort, G., C. Terpstra, E.P. de Kluyver. Characterization of porcine and some ruminant pestivirus by cross-neutralization. *Vet Microbiol.* 20: 291. 1989.
- Wentink, G.H., A.A. Dijkhuizen. Economic consequences of infection with bovine diarrhoea virus in 14 dairy herds. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde.* 115: 1031. 1990.
- Wirz B., J. Tratschin, H. Muller, D.B. Mitchell. Detection of hog cholera virus and differentiation from other pestiviruses by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 31: 1148. 1993.
- Wiskerchen, M., M.S. Collett. Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology.* 184: 341. 1991.
- Xue, W., F. Blecha, H.C. Minocha. Antigenic variations in bovine viral diarrhoea viruses detected by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 28: 1688. 1990.
- Xue, W., D.J. Orten, O.Y. Abdelmagid, M. Rider, F. Blecha, H.C. Minocha. Anti-idiotypic antibodies mimic bovine viral diarrhoea virus antigen. *Vet Microbiol.* 29: 201. 1991.
- Xue, W., H.C. Minocha. Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J Gen Virol.* 74: 73. 1993.