

DIARREA VIRAL BOVINA

RESUMEN

Los virus de la diarrea viral bovina (VDVB) pueden infectar a ganado bovino de cualquier edad. Es una enfermedad de distribución mundial, aunque recientemente se ha erradicado en algunos países. La infección por el VDVB da lugar a gran variedad de signos clínicos, como entéricos o respiratorios, en cualquier tipo de ganado bovino, o signos reproductivos y fetales tras la infección de hembras reproductoras susceptibles. Puede ser una enfermedad subclínica o extenderse hasta convertirse en un proceso grave que termina causando la muerte del animal. Los animales que sobreviven a la infección intrauterina que tenga lugar durante el primer trimestre de gestación casi siempre quedan infectados de forma persistente (IP). Los animales IP constituyen el principal reservorio del virus en las poblaciones y excretan grandes cantidades de virus con la orina, las heces, secreciones corporales, la leche y el esperma. La detección de las reses IP es crucial para el control de la infección. Es importante evitar el comercio de tales animales. Pueden tener un aspecto clínicamente sano, o bien estar débiles y presentar mal aspecto. Muchos animales IP mueren antes de alcanzar la edad adulta. En alguna ocasión, contraen la enfermedad de las mucosas, que cursa con anorexia, erosiones gastrointestinales y diarrea profusa, y que invariablemente conduce a la muerte. La enfermedad de las mucosas solo aparece en animales IP. En general, no se producen infecciones latentes tras la recuperación de un estado de infección aguda. No obstante, en alguna ocasión los toros pueden sufrir una infección testicular persistente y excretar el virus con el esperma durante largos periodos de tiempo.

Identificación del agente: El VDVB es un pestivirus que pertenece a la familia Flaviviridae y que está estrechamente emparentado con los virus de la peste porcina clásica y de la enfermedad ovina de la frontera. Ambos genotipos (1 y 2) se clasifican como especies independientes del género Pestivirus. Recientemente, también se ha propuesto un posible tercer genotipo, el VDVB de tipo 3. Aunque en los tipos 1 y 2 existen biotipos tanto citopáticos como no citopáticos, las cepas no citopáticas son las más frecuentes en las infecciones naturales y constituyen el principal objetivo del aislamiento del virus en cultivos celulares con fines de diagnóstico. Los animales IP pueden identificarse fácilmente mediante varios métodos de detección de antígenos víricos o del ARN vírico directamente en sangre y tejidos. El virus también puede aislarse mediante inoculación de muestras en cultivos celulares susceptibles, con el posterior inmunomarcaje para detectar la replicación del virus en los cultivos. La persistencia de la infección vírica deberá confirmarse con una nueva extracción de muestras tras un mínimo de 3 semanas, momento en que el virus se detectará de nuevo. Los animales IP suelen ser seronegativos. La viremia de los casos agudos es transitoria y difícil de detectar. El aislamiento del virus en el esperma de toros con infección aguda o persistente requiere una especial atención al transporte y análisis de las muestras. Las pruebas de detección del ARN son especialmente útiles porque son rápidas, tienen una sensibilidad alta y no requieren cultivos celulares.

Pruebas serológicas: La mejor forma de confirmar la infección aguda por el VDVB es la observación de seroconversión en muestras pareadas secuenciales, teóricamente de varios animales del grupo. Las muestras pareadas (tomadas en las fases aguda y de convalecencia) deben tomarse con un intervalo mínimo de 21 días y los análisis deben realizarse en paralelo empleando la misma prueba. Las más utilizadas son el enzimoimmunoanálisis y la prueba de neutralización del virus.

Requisitos para las vacunas: No existe ninguna vacuna estándar contra la diarrea viral bovina, pero sí se dispone de varias preparaciones comerciales. La vacuna ideal es la que previene la infección transplacentaria en vacas gestantes. La vacuna con virus vivo modificado no debe

administrarse a hembras gestantes (ni a sus terneros lactantes) debido al riesgo de infección transplacentaria. Las vacunas vivas que contienen cepas citopáticas del VDVB comportan riesgo de inducción de la enfermedad de las mucosas en animales IP. Las vacunas vivas inactivadas son inocuas y pueden administrarse a cualquier categoría de ganado bovino, pero en general requieren revacunaciones. El VDVB constituye un peligro especialmente importante en la fabricación de vacunas y productos biológicos para otras enfermedades debido a la alta frecuencia de contaminación de los lotes de suero fetal bovino que se emplean como suplemento de los medios de cultivo.

A. INTRODUCCIÓN

1. Consecuencias de la enfermedad

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) puede afectar a ganado bovino de cualquier edad. La distribución del virus es mundial, aunque recientemente algunos países han erradicado esta enfermedad. La infección por el VDVB da lugar a gran variedad de signos clínicos, como signos entéricos y respiratorios en cualquier categoría de ganado bovino, y signos reproductivos y enfermedad fetal tras la infección de hembras reproductoras susceptibles. La infección puede ser subclínica o bien extenderse y convertirse en un proceso grave que termina causando la muerte del animal. Los signos clínicos y la gravedad de la enfermedad pueden variar en función de las cepas víricas. Los VDVB también causan supresión inmunitaria, lo cual puede hacer que los animales infectados sean más susceptibles a la infección por otros virus y bacterias. Las consecuencias clínicas pueden ser más evidentes en el ganado que se cría en condiciones intensivas. Los animales que sobreviven a la infección intrauterina que tiene lugar en el primer trimestre de la gestación quedan infectados de forma persistente (IP). Los animales IP constituyen el principal reservorio del virus en las poblaciones y excretan grandes cantidades del virus con la orina, las heces, secreciones corporales, la leche y el esperma. El virus se propaga principalmente por el contacto directo entre animales IP y otras reses. La excreción del virus por animales infectados de forma aguda suele ser menos importante. Este virus también puede persistir en el medio ambiente durante cortos periodos de tiempo o bien transmitirse con materiales reproductivos contaminados. La transmisión vertical desempeña un papel importante en su epidemiología y patogenia.

En las hembras, la infección puede dar lugar a fallos de fecundación o a una infección embrionaria y fetal, que comportará abortos, nacidos muertos, teratogénesis o el nacimiento de terneros IP. Los animales con viremia persistente pueden nacer débiles, pueden ser terneros que crezcan con retraso o bien pueden ser animales de aspecto sano y normal que pasen desapercibidos durante mucho tiempo. No obstante, los animales IP tienen una esperanza de vida considerablemente baja, y una gran parte muere antes de llegar a la edad adulta. En algún caso, parte de estos animales puede contraer más adelante la enfermedad de las mucosas, con anorexia, erosiones gastrointestinales y diarrea profusa, que invariablemente conducirá a la muerte. La enfermedad de las mucosas solo aparece en los animales IP. Es importante evitar el comercio de los animales virémicos. En general, se considera que las reses serológicamente positivas y no virémicas son “seguras”, siempre que no estén gestantes. Aun así, una pequeña parte de los animales con viremia persistente puede producir anticuerpos contra algunas de las proteínas del virus si resultan expuestos a otra cepa del VDVB que sea antigénicamente distinta al virus que causó la viremia persistente. Como consecuencia, la seropositividad no garantiza del todo la “seguridad”. La detección de animales IP debe dirigirse específicamente a la detección del virus o de sus componentes (ARN o antígenos). En general, tras la recuperación de estados de infección aguda no se producen infecciones latentes. No obstante, es probable que el esperma obtenido de toros en fase de infección aguda contenga virus durante el periodo de viremia y a menudo durante cortos periodos de tiempo a partir de ese momento. Aunque es extremadamente infrecuente, algunos toros que se han recuperado pueden presentar una infección testicular persistente y excretar el virus con el esperma, en ocasiones de manera indefinida.

Aunque las cepas del VDVB son patógenas principalmente en el ganado bovino, puede producirse la transmisión entre especies cuando tiene lugar un contacto directo con ovejas, cabras o cerdos. La infección de hembras de pequeños ruminantes o cerdas gestantes por el VDVB puede dar lugar a pérdidas reproductivas y al nacimiento de animales IP. Se han registrado infecciones por el VDVB en camélidos tanto de América como de Europa. Además, existen cepas del virus de la enfermedad de la frontera (VEF) que han infectado a ganado bovino, dando lugar a signos clínicos que no se pueden distinguir de los de la infección por el VDVB. También se ha descrito el nacimiento de terneros IP con VEF que posteriormente han contraído la enfermedad de las mucosas. Aunque en los cerdos se han descrito infecciones naturales por el VDVB y el VEF, el virus de la peste porcina clásica, relacionado con aquellos, de manera natural no puede infectar a ruminantes.

Aunque se trata de un virus ubicuo, puede lograrse el control del BVDV en los rebaños e incluso en países, tal como se pone de manifiesto por el avance hacia la erradicación llevada a cabo en muchos países europeos (Moennig *et al.*, 2005).

2. El agente etiológico

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es un virus de ARN monocatenario y de polaridad positiva, que pertenece al género *Pestivirus*, de la familia *Flaviviridae*. Este género contiene varias especies, incluidos los dos genotipos del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) (tipos 1 y 2) y los virus de la peste porcina clásica y de la enfermedad ovina de la frontera, estrechamente emparentados. Los virus de estos genotipos presentan diferencias antigénicas considerables entre ellos y, dentro de las especies del tipo 1 y del tipo 2, las cepas del VDVB muestran una diversidad biológica y antigénica considerable. Dentro de los dos genotipos del VDVB, se han creado subdivisiones en función de los resultados de un análisis genético (Vilcek *et al.*, 2001). Ambos genotipos pueden diferenciarse entre ellos, y de otros pestivirus, mediante anticuerpos monoclonales (MAb) dirigidos contra las glucoproteínas principales E2 y ERNS o mediante análisis genético. La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) permite tipificar el virus directamente a partir de las muestras de sangre (Letellier & Kerhofs, 2003; McGoldrick *et al.*, 1999). Los virus de tipo 1 en general son más frecuentes, aunque en Norteamérica puede haber una prevalencia alta de cepas de tipo 2.

Ambos genotipos del VDVB pueden encontrarse tanto en las formas (biotipos) no citopáticas como en las citopáticas, y se clasifican en función de si se induce citopatología microscópicamente evidente durante la infección de cultivos celulares. Normalmente, es el biotipo no citopático el que circula libremente en las poblaciones bovinas. Las cepas no citopáticas son con mayor frecuencia las responsables de enfermedad en el ganado bovino y se asocian a signos entéricos y respiratorios en cualquier categoría de ganado bovino o a signos reproductivos y fetales tras la infección de hembras reproductoras susceptibles. La infección puede ser subclínica o extenderse y convertirse en un proceso grave que termina siendo mortal (Brownlie, 1985). En los casos de enfermedad de las mucosas, se encuentran virus citopáticos; esta enfermedad es un síndrome clínico relativamente infrecuente y que implica la “sobre-infección” de un animal IP debido a un virus no citopático por una cepa citopática estrechamente emparentada. Los dos biotipos del virus que se encuentran en un caso de la enfermedad de las mucosas suelen ser antigénicamente muy parecidos, si no idénticos. Los virus del tipo 2 suelen ser no citopáticos y se han asociado a brotes de infección aguda grave y a un síndrome hemorrágico. No obstante, los virus de tipo 2 también se han relacionado con una enfermedad que no se puede distinguir de la que se observa con los virus de tipo 1, que se aíslan con más frecuencia. Además, algunas cepas de tipo 1 se han asociado a brotes de enfermedad especialmente graves y mortales en ganado bovino adulto. Tras la infección de animales no gestantes por cualquiera de los genotipos son frecuentes cuadros clínicamente leves y subclínicos.

En el ganado bovino cada vez hay más indicios de un pestivirus “atípico” o de tipo “HoBi”, un posible VDVB de tipo 3 que también se asocia a enfermedad clínica (Bauermann *et al.*, 2013), pero su distribución todavía no está del todo clara. Estos virus se detectan fácilmente mediante pruebas panreactivas, como la RT-PCR en tiempo real. Se ha observado que algunos ELISA (enzimoinmunoanálisis) de detección de antígeno detectan estas cepas (Bauermann *et al.*, 2012); en general, en el aislamiento de virus, etc., se siguen los mismos principios que para los tipos 1 y 2 del VDVB. No obstante, es importante recordar que los ELISA de detección de anticuerpos varían en cuanto a capacidad de detección de anticuerpos contra el VDVB de tipo 3 y que las vacunas diseñadas para proteger contra los tipos 1 y 2 pueden no conferir una protección total contra la infección por estos pestivirus de reciente descubrimiento (Bauermann *et al.*, 2012; 2013).

3. Patogenia

3.1. Infecciones agudas

Las infecciones agudas por el VDVB son más frecuentes en animales de corta edad, y pueden ser subclínicas o causar fiebre, diarrea (Baker, 1995), signos respiratorios y, en ocasiones, una muerte súbita. La gravedad de la enfermedad puede variar en función de la cepa vírica y de la presencia de otros agentes patógenos (Brownlie, 1990). En concreto, esporádicamente en algunos países se han registrado brotes de una forma grave de enfermedad aguda con lesiones hemorrágicas, trombocitopenia y mortalidad alta (Baker, 1995; Bolin y Ridpath, 1992). Se ha comprobado que la infección por virus del tipo 2, en particular, causa una alteración de la función plaquetaria. Durante las infecciones agudas, se produce una viremia breve durante unos 7-10 días y la excreción del virus puede detectarse en secreciones nasales y oculares. También puede haber leucopenia, trombocitopenia o fiebre transitorias, pero son signos que pueden variar mucho entre animales. Los animales afectados pueden sufrir una predisposición a infecciones secundarias por otros virus o bacterias. Aunque el VDVB puede causar una enfermedad respiratoria primaria por sí solo, los efectos inmunosupresores del virus exacerban las consecuencias de este virus. El VDVB es uno de los principales agentes patógenos del complejo respiratorio bovino en animales de engorde y en otros sistemas pecuarios intensivos, como las explotaciones de producción de terneros.

La infección de hembras reproductoras inmediatamente antes de la ovulación y durante los primeros días tras la inseminación puede dar lugar a fallos de la fecundación y a pérdidas embrionarias tempranas (McGowan y Kirkland, 1995). Las vacas también pueden sufrir infertilidad relacionada con

alteraciones de la función ovárica y secreciones de gonadotropinas y progesterona (Fray *et al.*, 2002). Los toros pueden excretar el virus con el esperma durante un corto periodo de tiempo durante e inmediatamente después de la infección, y pueden sufrir una reducción temporal de la fertilidad. Aunque el nivel de virus en este esperma en general es bajo, puede dar lugar a una reducción de las tasas de fecundidad y constituir una posible causa de introducción del virus en un rebaño nunca antes expuesto (McGowan y Kirkland, 1995).

3.2. Infecciones intrauterinas

La infección de una hembra reproductora puede dar lugar a gran variedad de consecuencias, en función de la etapa de la gestación en la que haya tenido lugar la infección. Antes de los 25 días de gestación, la infección del embrión en desarrollo suele conducir a la muerte embrio-fetal, aunque el aborto puede retrasarse bastante (McGowan y Kirkland, 1995). Los fetos supervivientes son normales y no están infectados. No obstante, la infección de la hembra entre los días 30 y 90 de gestación invariablemente da lugar a infección fetal, con IP de toda la descendencia superviviente, que será seronegativa. La infección en fases posteriores y hasta el día 150 de gestación puede conducir a varios defectos congénitos, como hidrocefalia, hipoplasia cerebelar, defectos ópticos, defectos esqueléticos como la artrogriposis, e hipotricosis. También puede tener lugar un retraso del crecimiento, tal vez como consecuencia de una disfunción hipofisaria. La infección fetal puede dar lugar a abortos, nacidos muertos o el nacimiento de terneros débiles que pueden morir poco después de nacer (Baker, 1995; Brownlie, 1990; Duffell y Harkness, 1985; Moennig y Liess, 1995). Algunos terneros IP pueden parecer normales en el momento del nacimiento pero no crecer con normalidad. Permanecen con IP de por vida y suelen ser seronegativos. La respuesta inmunitaria y la producción de anticuerpos tienen lugar entre los días 90 y 120 de gestación, y aumenta el porcentaje de terneros infectados que tiene anticuerpos detectables, mientras que el porcentaje de aquellos en los que el virus puede detectarse disminuye rápidamente. La infección de los fetos bovinos después del día 180 de gestación suele conducir al nacimiento de un ternero normal seropositivo.

3.3. Infecciones persistentes

Los animales con viremia persistente constituyen una fuente continua de virus infectivo para otras reses y son el principal reservorio de VDVB en una población. En una población sin un programa riguroso de control del VDVB, alrededor del 1–2% de las reses son IP. Durante los brotes en rebaños o grupos de reproductores nunca antes expuestos, si la exposición ha tenido lugar durante el primer trimestre de la gestación, un porcentaje muy alto de los terneros supervivientes será IP. Si un animal IP muere, no habrá lesiones patognomónicas del VDVB y las que se observen en general estarán complicadas por infecciones secundarias por otros agentes. Algunos animales IP sobrevivirán hasta la madurez sexual y podrán reproducirse sin problemas, pero su descendencia siempre será también IP. Antes de comprar, vender o utilizar animales para la reproducción asistida, deberán analizarse para garantizar que no son IP.

3.4. Enfermedad de las mucosas

Los animales con viremia persistente pueden sucumbir posteriormente a la enfermedad de las mucosas (Brownlie, 1985). No obstante, es algo muy infrecuente. Se ha observado que este síndrome es consecuencia de la infección de un animal IP por un virus citopático antigénicamente similar, que puede tener lugar por sobre-infección, recombinación entre biotipos no citopáticos, o mutación del biotipo persistente (Brownlie, 1990). Normalmente, no es demasiado necesario confirmar específicamente que un animal IP ha contraído la enfermedad de las mucosas porque básicamente es una curiosidad científica y de poca trascendencia en la práctica, aparte del hecho de que el animal es IP y está infectado por el VDVB. No obstante, la presencia de casos de enfermedad de las mucosas puede ser el primer indicio de que en un rebaño hay infección por el VDVB, y es algo que debe conducir a una investigación en profundidad y a una intervención.

3.5. Esperma y embriones

Los toros con IP suelen ser de poca calidad y tener un esperma muy infectivo y poca fertilidad (McGowan y Kirkland, 1995). Todos los toros que se utilicen para la inseminación natural o artificial deben analizarse para determinar si presentan infección aguda y persistente por el VDVB. En casos muy infrecuentes, posiblemente debido a una infección aguda durante la pubescencia, puede tener lugar una infección persistente de los testículos, en cuyo caso el toro será fuertemente seropositivo y excretará el virus con el esperma de manera intermitente (Voges *et al.*, 1998). Este fenómeno también se ha observado tras la vacunación con un virus atenuado (Givens *et al.*, 2007). Las vacas donantes de embriones que son IP debido a VDVB también suponen una posible fuente de infección, sobre todo porque en los líquidos uterinos y vaginales hay concentraciones extremadamente altas de VDVB. Aunque se ha observado que los ooquistes sin zona pelúcida intacta son susceptibles a la infección *in vitro*, la mayor parte de los ooquistes permanece sin infectar por el VDVB. A partir de animales IP

también se han obtenido terneros no infectados empleando lavados extensivos de embriones y fecundación *in vitro*. Las vacas que se utilizan como receptoras de embriones siempre se deben analizar para confirmar que no sean IP y, teóricamente, que no sean seropositivas ni hayan sido vacunadas al menos durante las últimas 4 semanas antes de la primera implantación.

Los materiales biológicos que se emplean para las técnicas de fecundación *in vitro* (suero bovino, cultivos celulares bovinos) tienen un riesgo alto de contaminación y deben analizarse para comprobar si están infectados por el VDVB. Los incidentes de introducción aparente de virus mediante estas técnicas han enfatizado este riesgo. Se considera fundamental que los suplementos de suero que se utilicen en los medios estén libres de contaminantes, como se indica en el Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*, lo cual se puede lograr aplicando las técnicas que se describen en el apartado B.3.1 de este capítulo.

4. Estrategias para el diagnóstico y la obtención de muestras

El diagnóstico de la infección por el VDVB a veces puede ser complejo debido al lapso de tiempo entre la infección y el inicio de los signos clínicos. Mientras que la detección de animales IP es fácil con los métodos de diagnóstico actuales, la detección de infecciones agudas y del VDVB en materiales reproductivos puede ser más difícil.

4.1. Infecciones agudas

A diferencia de los animales IP, los animales con infección aguda excretan cantidades relativamente pequeñas de virus y durante un corto periodo de tiempo (normalmente, unos 7–10 días), pero los signos clínicos pueden aparecer durante las últimas fases de la viremia, lo cual reduce aún más el periodo de tiempo durante el cual se puede detectar el virus. En los casos de enfermedad respiratoria o entérica, deben obtenerse muestras de varios animales afectados, preferiblemente escogiendo los que han resultado afectados más recientemente. Deben obtenerse hisopos de las narinas y la conjuntiva de animales con enfermedad respiratoria, o del recto y de heces en los casos de signos entéricos. En el caso de animales muertos, los órganos de elección son los pulmones y el bazo. El ARN vírico se puede detectar mediante RT-PCR en tiempo real, ya que esta técnica tiene la ventaja de la alta sensibilidad y de ser capaz de detectar genoma de virus no infeccioso. Dados los bajos niveles de virus, no suele ser práctico realizar el aislamiento del virus a no ser que se necesite para caracterizar la cepa de VDVB involucrada. Sí vale la pena realizar pruebas serológicas con muestras pareadas de suero que se hayan tomado en la fase aguda y en la fase de convalecencia (que se obtengan con un intervalo mínimo de 21 días tras la muestra de la fase aguda, y de 8–10 animales), lo cual da lugar a una alta probabilidad de diagnosticar o excluir la infección por VDVB.

La confirmación de que un aborto, la presencia de nacidos muertos o la muerte perinatal se deben al VDVB suele ser difícil de establecer porque puede pasar mucho tiempo entre la infección inicial y la muerte o expulsión del feto. Al tomar muestras, se debe tener en cuenta la necesidad de detectar componentes víricos o anticuerpos frente al virus. El bazo y los pulmones son los órganos de elección para la detección del virus, mientras que los líquidos pericárdicos o pleurales son ideales para la serología. Deberá comprobarse el estómago de los terneros neonatos para confirmar que no hayan mamado. Aunque el virus puede aislarse de tejido fetal en ciertos casos, debe hacerse hincapié en la detección de antígeno vírico mediante ELISA o RT-PCR en tiempo real para la detección de ARN. En cuanto a la serología, tanto el ELISA como la prueba de neutralización del virus (VN) son adecuados, aunque la calidad y la contaminación bacteriana de la muestra pueden comprometer la capacidad de la VN de detectar anticuerpos. También puede resultar útil realizar pruebas serológicas en las madres, sobre todo en un grupo de animales, con el fin de determinar si en el grupo se ha producido una infección reciente. Un título alto de anticuerpos contra el VDVB (>1/1000) en suero materno sugiere infección fetal y probablemente se deba a que el feto facilita que la madre siga expuesta al virus.

4.2. Infecciones persistentes

En el pasado, la detección de animales IP se ha basado en gran medida en el aislamiento del virus en cultivos celulares. No obstante, para la detección de antígenos o del ARN del virus, tanto en animales vivos como en animales muertos, hoy en día se utilizan mucho los ELISA de detección de antígeno y las RT-PCR en tiempo real, ya que ambas técnicas tienen una sensibilidad relativamente alta. También se utiliza el aislamiento del virus para la detección de VDVB no citopático en sangre, mientras que en algunos países, el virus se ha detectado mediante inmunohistoquímica (IHC). En animales vivos se han obtenido muestras de piel, mientras que en los animales muertos sirve una gran variedad de tejidos. Tanto el aislamiento del virus como la IHC son pruebas laboriosas y caras, que pueden resultar técnicamente complicadas. En terneros de menos de 4–5 meses, el aislamiento del virus a partir de sangre puede fracasar debido a la presencia de anticuerpos maternos contra el VDVB. En animales de más edad y con viremia persistente, puede haber niveles de anticuerpos bajos debido a su capacidad de seroconvertir frente a cepas del VDVB (incluidas las vacunales) antigénicamente

distintas a la que causa la viremia persistente (Brownlie, 1990). Se han empleado muestras de leche de tanque e individuales para comprobar si en los rebaños hay algún animal IP. Se ha empleado ELISA de detección de antígeno, PCR en tiempo real y aislamiento del virus. Para confirmar un diagnóstico de infección persistente, los animales deben volver a estudiarse pasadas al menos 3 semanas, analizando muestras de sangre para comprobar si contienen el virus y si se ha producido seroconversión. Se debe proceder con cautela al reanalizar muestras de piel, porque se ha comprobado que, en algunos casos agudos, el antígeno vírico puede persistir en la piel durante varias semanas (Cornish *et al.*, 2005).

4.3. Enfermedad de las mucosas

Aunque no se ha llevado a cabo con fines de diagnóstico sistemático, para la confirmación laboratorial de un diagnóstico de la enfermedad de las mucosas es necesario el aislamiento del virus citopático. Este biotipo en ocasiones puede aislarse de la sangre, pero puede recuperarse con más probabilidad de otros muchos tejidos, en concreto del bazo, del intestino y de tejido de las placas de Peyer. El aislamiento del virus se logra fácilmente a partir del bazo, que es fácil de obtener y raramente tóxico para el cultivo celular.

4.4. Materiales del tracto reproductor

Antes de obtener espermatozoides de los toros donantes, estos deben analizarse para comprobar si están libres de infección por el VDVB, con arreglo al *Código Sanitario para los Animales Terrestres*. Es necesario confirmar que estos toros no sean IP y que no estén pasando por una infección aguda, además de establecer su estado serológico. Este análisis inicial debe llevarse a cabo con muestras de sangre completa o de suero. Para establecer que un toro seropositivo no sufre una infección testicular persistente (ITP), deben obtenerse muestras de espermatozoides al menos en tres ocasiones distintas con intervalos entre ellas de no menos de 7 días, debido a la posibilidad de una excreción intermitente de pequeñas cantidades del virus, sobre todo durante las primeras fases de la infección. También es necesario enviar varias pajuelas de cada obtención, o un volumen apropiado de espermatozoides sin procesar. Debe prestarse especial atención al cumplimiento de las recomendaciones relativas al transporte de muestras, y asegurar que el laboratorio documente el estado de las muestras a su llegada. En los siguientes apartados se proporcionan más datos sobre los requisitos de obtención, transporte y análisis.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Pruebas disponibles para el diagnóstico de la diarrea viral bovina y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
Aislamiento del virus	+	+++	++	+++	–	–
Detección de antígeno mediante ELISA	++	+++	+++	+++	+++	–
Detección de antígeno mediante IHC	–	–	–	++	–	–

1 Se recomienda utilizar varios métodos de detección del agente con la misma muestra clínica.

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección de ácido nucleico mediante RT-PCR en tiempo real	+++	+++	+++	+++	+++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	+++	++	+++	–	+++	+++
VN	+	+++	++	–	+	+++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.
 ELISA = enzimoanálisis; IHC = inmunohistoquímica; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; VN = neutralización del virus.

1. Detección del agente etiológico

Para impedir el envío de animales o productos derivados de los animales (sobre todo espermatozoides y embriones) que estén infectados por el VDVB, es necesario comprobar si contienen el virus infeccioso (aislamiento del virus), antígenos víricos (ELISA de detección de antígeno) o ARN (RT-PCR en tiempo real) en la sangre del animal en cuestión, o en el donante del germoplasma (de espermatozoides o embriones). La excepción son los toros seropositivos, en cuyo caso debe analizarse el espermatozoides y no el toro donante. Con las pruebas serológicas solo se puede establecer que los animales seronegativos no se encuentran en una fase aguda de la infección, además de determinar el estado serológico de los toros donantes. Debido a lo variable de su sensibilidad en ausencia de una propagación previa del virus, las técnicas como la IHC o la hibridación *in-situ* (ISH) aplicadas directamente a tejidos no se consideran adecuadas para certificar la ausencia del VDVB a efectos del comercio internacional. Por el contrario, la inmunotinción es fundamental en el aislamiento del virus en cultivo celular destinado a detectar la presencia de las cepas no citopáticas del VDVB que predominan en las infecciones naturales.

Todos los métodos analíticos deben validarse exhaustivamente mediante un análisis de poblaciones no infectadas o infectadas de ganado bovino, incluidos animales con viremias, ya sean de títulos bajos o altos. Se debe comprobar que los métodos basados en la unión a anticuerpos policlonales o monoclonales (ELISA o IHC), el inmunomarcado (VI) y el reconocimiento de ácidos nucleicos (PCR) detectan todos los antígenos y genes de los virus de la DVB. Existen tres Laboratorios de Referencia de la OIE designados para el VDVB que pueden ayudar con información sobre este tema (pueden consultarse en la lista de la Parte 4 de este *Manual Terrestre*); los Laboratorios de Referencia para la peste porcina clásica también pueden aportar algunos consejos.

1.1. Aislamiento del virus

Cuando se lleva a cabo utilizando un patrón de calidad, el aislamiento del VDVB es muy fiable. No obstante, para garantizar que los cultivos celulares y los componentes de los medios constituyen un sistema muy sensible y que no resulten comprometidos por la presencia de concentraciones bajas de anticuerpos contra el VDVB o del virus en sí, deben cumplirse unos requisitos muy concretos. El aislamiento del virus solo permite detectar el virus infeccioso, lo cual exige ciertos mínimos de calidad de la muestra. Además, para detectar las bajas concentraciones de virus que pueden tener algunas muestras, sobre todo de espermatozoides, puede ser necesario examinar volúmenes de muestra más grandes de lo habitual. Algunas de estas limitaciones pueden resolverse empleando un ELISA de detección de antígeno que haya demostrado una sensibilidad analítica alta, o bien RT-PCR en tiempo real.

El virus se puede aislar en varios cultivos de monocapa de células bovinas (como células renales, pulmonares, testiculares o de los cornetes nasales). En algunos casos, también son adecuadas células ovinas. Se pueden congelar cultivos primarios o secundarios en forma de suspensiones celulares en nitrógeno líquido. A continuación, se pueden analizar a lo largo de una serie de pases, o bien sembrarse en otras células susceptibles, comprobar si están contaminados y evaluar su sensibilidad por comparación con un lote autorizado de células antes de empezar a utilizarlas. Este

tipo de problemas se puede reducir utilizando líneas celulares continuas, que pueden obtenerse sin VDVB, aunque tal ausencia de VDVB y su susceptibilidad deberán comprobarse periódicamente. Las líneas celulares continuas deberán utilizarse mediante un sistema de “lotes de inóculo”, que permitirá utilizarlas solo dentro de un intervalo determinado de número de pases para el cual se haya comprobado que tienen una sensibilidad aceptable a la infección por el VDVB. Aunque para el aislamiento del VDVB existen ciertas líneas celulares continuas que se consideran especialmente apropiadas, pueden haber una considerable variación entre lotes de células de distintas procedencias debido a los distintos historiales de pases, de tal modo que antes de empezar a utilizarlas también deberá confirmarse su susceptibilidad.

El VDVB no citopático es un contaminante frecuente de los tejidos bovinos, y en los cultivos celulares debe comprobarse mediante pruebas periódicas si hay virus contaminantes. Las células deben cultivarse en medios en los que tal ausencia de contaminación se haya comprobado, y deberá examinarse una gran superficie celular. No es adecuado analizar unos pocos pocillos de una placa de 96 pocillos; examinar todos los pocillos de una placa de 96 pocillos será una prueba más convincente de tal ausencia de contaminación. El suero fetal bovino que se seleccione para un cultivo celular debe estar libre no solo de virus, sino también, y lo que es más importante, del anticuerpo neutralizante frente al BVDV. El tratamiento por calor (56°C durante 30–45 minutos) es inadecuado para la destrucción del BVDV en sueros contaminados; la irradiación a 25 kiloGrays (2,5 Mrad) es más segura. La mayoría de lotes comerciales de suero fetal bovino dan positivo por RT-PCR incluso después de que el virus haya sido inactivado por irradiación. Además, la mayor parte de los lotes de suero fetal bovino comerciales contiene anticuerpos contra pestivirus, a veces a niveles prácticamente indetectables pero suficientes como para inhibir el aislamiento del virus. Para superar este inconveniente, el suero puede obtenerse a partir de animales donantes que no tengan el VDVB ni anticuerpos contra el mismo y que puedan utilizarse con confianza. El análisis de donantes para determinar si tienen el virus o anticuerpos se realiza animal por animal. Aunque en algunos casos se sustituye el suero fetal bovino por suero de caballo, es habitual que este último potencie peor el crecimiento celular. Además, a veces se ha producido contaminación cruzada con suero fetal bovino durante el procesado, lo cual impide el objetivo de conseguir un producto sin VDVB.

Las células leucocitarias, la sangre completa, los leucocitos lavados o el suero son adecuados para el aislamiento del virus de animales vivos. Los anticuerpos maternos pueden interferir con el aislamiento del suero en terneros jóvenes. Las suspensiones de tejidos de casos estudiados postmórtem deben prepararse aplicando los métodos estándar. La mejor forma de confirmar que un toro no es IP por el VDVB es analizando una muestra de sangre. No obstante, se han detectado infecciones testiculares persistentes (ITP) en algunos toros que se han recuperado de la infección aguda, y que ya no son virémicos pero sí seropositivos (Voges *et al.*, 1998). Se puede detectar el virus en la mayor parte de muestras de esperma de estos toros, aunque no en todas. Aunque se sigue considerando infrecuente, para descartar la posibilidad de una ITP es fundamental analizar esperma de todos los toros seropositivos. Para confiar en que un toro no tiene una ITP, deben analizarse lotes de esperma obtenidos a lo largo de varias semanas. Una vez se ha analizado una serie de muestras, no está justificado seguir analizando esperma de un toro seropositivo. El esperma puro, y en ocasiones también el procesado, es citotóxico y debe diluirse en medio de cultivo. Por ello, durante la incubación es importante realizar un seguimiento de la salud de las células mediante un examen microscópico a intervalos periódicos durante la incubación. Estos problemas en gran medida se resuelven empleando RT-PCR en tiempo real, que tiene varias ventajas respecto al aislamiento del virus, como una mayor sensibilidad y la posibilidad de realizarla en unas pocas horas, en lugar de las varias semanas que exige el aislamiento del virus.

Hay muchas variaciones en los procedimientos utilizados para aislar el virus. Todos deben ser optimizados para proporcionar la máxima sensibilidad de detección de una preparación de virus estándar. Todos los componentes biológicos que se empleen en los cultivos celulares deben analizarse, y solo se utilizarán si se demuestra que están libres de VDVB y de anticuerpos contra este virus. Los cultivos celulares (tanto líneas primarias como continuas) deben analizarse periódicamente para confirmar que mantienen la máxima susceptibilidad a la infección por el virus. En función del tipo de muestra y del objetivo de las pruebas, es probable que el aislamiento del virus requiera uno o más pases por cultivos celulares. Aunque los animales IP se pueden detectar fácilmente analizando su sangre o suero con un pase, el esperma siempre deberá someterse a tres pases por cultivo, y los productos biológicos, como el suero fetal bovino, deberán someterse incluso a cinco pases (inoculación inicial más cuatro pases). Para detectar el crecimiento de virus no citopático, se usan los métodos convencionales de aislamiento de virus, con la adición de un paso final de inmunomarcado (inmunofluorescencia o, con mayor frecuencia, tinción con peroxidasa). Por tanto, los cultivos en tubo deben incluir cubres sueltos, mientras que los cultivos en placa pueden fijarse y marcarse directamente en la placa. A continuación se incluyen ejemplos. Como alternativa, el sobrenadante obtenido tras el pase final se puede analizar por RT-PCR en tiempo real (véase abajo).

1.1.1. Método de la inmunoperoxidasa en microplaca para pruebas masivas de detección de virus en muestras de suero (Meyling, 1984)

- i) Se depositan 10–25 µl de la muestra de suero en cuatro pocillos de una placa de 96 pocillos de grado cultivo tisular. Este paso se repite para cada muestra. Se incluye un control positivo y un control negativo.
- ii) Se añaden a todos los pocillos 100 µl de una suspensión celular a la concentración adecuada (normalmente, alrededor de 150 000 células/ml) en medio sin suero fetal bovino (FCS). *Nota:* la propia muestra actúa como suplemento del crecimiento celular. Si se analizan otras muestras además del suero, se utiliza medio con FCS al 10% que esté libre de anticuerpos contra pestivirus de los rumiantes.
- iii) La placa se incuba a 37°C durante 4 días, en una atmósfera de CO₂ al 5% con la tapa sellada.
- iv) Cada pocillo se examina al microscopio para comprobar si presenta signos de citopatología (efecto citopático – ECP) o signos de citotoxicidad.
- v) Los cultivos se congelan brevemente a unos –80°C y 50 µl del sobrenadante del cultivo se transfieren a cultivos celulares nuevos, repitiendo los pasos 3.1.1.i a iv.
- vi) A continuación, las células se fijan y se tiñen mediante uno de los dos métodos siguientes:
 - **Paraformaldehído:**
 - a) Se añaden 200 µl de una solución de formaldehído a 1/10 (una concentración aproximada del 3%) a la placa y esta se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos.
 - b) El contenido de la placa se desecha y la placa se lava.
 - c) Se lavan las placas 5 veces con Tween 20 al 0,05% en agua (puede utilizarse un lavador automático de microplacas ajustado a baja presión y velocidad).
 - d) Se añaden 50 µl de un anticuerpo antivirico a la dilución adecuada (se prepara en solución tamponada con fosfato/PBS que contenga un 1% de gelatina) y se incuba durante 60-90 minutos a 37°C en una cámara humidificada.
 - e) Se lavan las placas cinco veces como en el paso c).
 - f) Se diluye el correspondiente antisuero conjugado a peroxidasa hasta la dilución óptima en gelatina/PBS al 1% (por ejemplo, anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo conjugado a peroxidasa cuando el anticuerpo antivirico es un anticuerpo monoclonal de ratón). La concentración óptima debe determinarse para cada lote de conjugado mediante la técnica de titulación “en tablero de ajedrez” con respecto a controles de referencia positivo y negativo.
 - g) A cada pocillo de la placa de microtitulación se añaden 50 µl del conjugado a peroxidasa diluido, y la placa se incuba durante 90 minutos a 37°C en una cámara humidificada.
 - h) Se lavan las placas cinco veces como en el paso c).
 - i) Se “revela” la placa añadiendo el sustrato 3-amino-9-etil carbazol (AEC) (100 µl/pocillo) y se deja que reaccione durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 - j) Se añaden 100 µl de PBS a cada pocillo y se coloca una tapa en cada placa.
 - k) Se examinan los pocillos mediante microscopía óptica, empezando con los pocillos de los controles negativo y positivo. Las células que no estaban infectadas (control negativo) no deben teñirse, o muy escasamente. Las células infectadas (control positivo) deben tener el citoplasma de un color marrón rojizo.
 - **Acetona**
 - a) La placa se vacía mediante una cuidadosa inversión y se enjuaga con PBS.
 - b) Las células se fijan del siguiente modo: la placa se sumerge en un baño de acetona diluida al 20% con PBS, se vacía de inmediato y se transfiere a un baño nuevo de acetona al 20% con PBS durante 10 minutos. Se vacía bien y se retira todo el líquido posible golpeteándola y situándola sobre papel absorbente. Se seca bien durante al menos 3 horas a 25-30°C (por ejemplo, empleando la radiación de calor de una lámpara de la encimera). *NB:* el secado forma parte del proceso de fijación.
 - c) Las células fijadas se enjuagan añadiendo PBS a todos los pocillos.

- d) Los pocillos se drenan y se añade el anticuerpo contra el VDVB (50 µl) a todos los pocillos a una dilución predeterminada en PBS que contenga Tween 80 al 1% (PBST) y suero equino al 5% o gelatina al 1%. (Puede añadirse suero equino o gelatina para reducir la tinción inespecífica).
- e) Se incuba a 37°C durante 15 minutos.
- f) Se vacía la placa y se lava tres veces en PBST.
- g) Se drena y se añade suero anti-especie adecuado conjugado a peroxidasa a una dilución predeterminada en PBST (50 µl por pocillo) durante 15 minutos a 37°C.
- h) Se vacía la placa y se lava tres veces en PBST.
- i) Se enjuaga la placa en agua destilada. Se golpetea la placa para eliminar todo el líquido.
- j) Se añade el sustrato peróxido de hidrógeno acabado de preparar con un cromógeno adecuado, por ejemplo, 3-amino-9-etil-carbazol (AEC).

Puede prepararse otro sustrato, que consiste en 9 mg de tetrahidrocloruro de diaminobenzidina y 6 mg de perborato de sodio tetrahidratado disueltos en 15 ml de PBS. Aunque la tinción no es demasiado intensa, estas sustancias químicas tienen la ventaja de que pueden enviarse por correo aéreo.
- k) La placa se examina al microscopio. Las células positivas al virus tienen el citoplasma teñido de un color marrón rojizo.

Pueden emplearse otros métodos de fijación de las células, como el uso de calor (véase el Capítulo 3.8.3 *Peste porcina clásica*, apartado B.2.2.1.viii). Primero deben evaluarse para asegurar que no tengan alterada la capacidad de detectar el antígeno vírico.

1.1.2. Método en tubo para suspensiones de tejido o de capa leucocitaria

NB: Este método también puede adaptarse a placas de plástico de 24 pocillos. Obsérvese que se requiere un mínimo de 2 pases, y preferiblemente 3 (incluida la inoculación primaria).

- i) Las muestras de tejido se trituran y se prepara una suspensión al 10% en medio de cultivo. A continuación, la suspensión se centrifuga para retirar los detritos.
- ii) Se inoculan cultivos en tubos de ensayo con monocapas subconfluentes o que acaben de confluir de células bovinas susceptibles con 0,1 ml de la muestra. El cultivo se deja adsorber durante 1 hora a 37°C.
- iii) El cultivo se lava con 1 ml de medio; a continuación, este se desecha y se añade 1 ml de medio de mantenimiento para cultivos.
- iv) El cultivo se incuba durante 4–5 días a 37°C, y se examina al microscopio para comprobar si presenta ECP o signos de citotoxicidad.
- v) A continuación, el cultivo debe congelarse y descongelarse para el pase por cultivos frescos durante uno o, preferiblemente, dos pases más (incluido el cultivo inoculado para la inmunotinción final). En el pase final, tras la congelación-descongelación el líquido del cultivo tisular se recoge y se pasa a placas de microtitulación para realizar un cultivo y una tinción por el método de la inmunoperoxidasa (véase el apartado B.3.1.1 anterior) o por el método de la inmunofluorescencia. En el caso de la inmunofluorescencia, se incluyen cubreobjetos en los tubos y se utilizan como base para las células cultivadas. Al final del periodo de cultivo, los cubres se retiran, se fijan con acetona al 100% y se tiñen con un conjugado inmunofluorescente al VDVB. Se examinan los cubres con un microscopio de fluorescencia para comprobar si presentan la fluorescencia citoplasmática difusa característica de los pestivirus. Como alternativa, el sobrenadante del cultivo del pase final se puede analizar mediante RT-PCR en tiempo real (véase abajo).

1.1.3. Aislamiento del virus a partir de muestras de esperma

Las muestras que se utilizan para la prueba suelen ser esperma bovino extendido o, en ocasiones, esperma puro. Las muestras de esperma deben transportarse al laboratorio en nitrógeno líquido o hielo seco. Las muestras deben guardarse en nitrógeno líquido o a temperaturas inferiores a los –70°C (en el caso de almacenamientos prolongados) o a 4°C (en el caso de almacenamientos cortos, de no más de 1–2 días). El laboratorio receptor debe documentar las condiciones en las que se encuentren las muestras al recibirlas. El esperma puro suele ser citotóxico, y antes de añadirlo a los cultivos celulares debe prediluirse (por ejemplo, a 1/10 en suero bovino libre de VDVB). Deberá analizarse un mínimo de 0,1 ml de

esperma puro con tres pases en cultivo celular. El esperma extendido también puede resultar tóxico. En el caso del esperma extendido, debe realizarse una estimación para asegurar que se examina el equivalente a un mínimo de 0,1 ml de esperma (por ejemplo, un mínimo de 1,0 ml de esperma extendido). Si se halla toxicidad, es posible que tengan que analizarse varias muestras diluidas para alcanzar un volumen equivalente a 0,1 ml de esperma puro (por ejemplo 5 × 1 ml de una muestra de esperma extendido que se haya diluido a 1/5 para reducir la toxicidad). Un posible método es el siguiente:

- i) Se diluyen 200 µl de esperma en 1,8 ml de suero bovino que contenga antibióticos. Puede ser el mismo suero que el que se utilice para suplementar los cultivos celulares, y debe comprobarse que esté libre de anticuerpos contra el VDVB.
- ii) Se mezcla enérgicamente y se deja 30 minutos a temperatura ambiente.
- iii) Se inocula 1 ml de la mezcla de esperma/suero a una monocapa de células susceptibles (véase el aislamiento del virus a partir de tejido, arriba) en tubos de cultivo celular o en una placa de cultivo tisular de seis pocillos.
- iv) Se incuban los cultivos durante 1 hora a 37°C.
- v) Se retira la mezcla, se lava la monocapa varias veces con medio de mantenimiento y a continuación se añade medio de mantenimiento nuevo a los cultivos.
- vi) En la prueba se deben incluir controles negativo y positivo respecto al VDVB. Debe prestarse especial atención para evitar una contaminación accidental de los pocillos problema por parte del control positivo, por ejemplo, manipulando siempre el control positivo en último lugar.
- vii) Se observan las placas al microscopio para comprobar que estén libres de contaminación y de citotoxicidad. Como consecuencia de una infección por el VDVB no es esperable citopatología, pero podrían aislarse inadvertidamente otro virus, como el herpesvirus bovino tipo 1.
- viii) Pasados 5–7 días, los cultivos se congelan a –70°C o a temperaturas inferiores y se descongelan, se clarifican mediante centrifugación, y el sobrenadante se utiliza para inocular monocapas nuevas.
- ix) Al final del segundo pase, el sobrenadante de la preparación congelada-descongelada debe pasarse por cultivos en un sistema adecuado para la tinción por inmunoperoxidasa u otro sistema de detección de antígeno, o mediante RT-PCR en tiempo real tras 5 días de cultivo. Esto es más fácil en microplacas de 96 pocillos. La muestra se considera negativa si no hay indicios de antígeno vírico o si no se detecta ARN del VDVB.

1.2. Detección del ácido nucleico

La RT-PCR en gel convencional se ha utilizado en el pasado para la detección de ARN del VDVB con fines de diagnóstico. También se ha utilizado una RT-PCR múltiple para la amplificación y la tipificación simultáneas de virus a partir de cultivo celular, o directamente de muestras de sangre. No obstante, la RT-PCR en gel tiene el inconveniente de que es comparativamente laboriosa, cara y propensa a la contaminación cruzada. Estos problemas se habían reducido considerablemente tras la introducción de métodos de RT-PCR en tiempo real o cuantitativos basados en sondas. Sin embargo, todavía tienen que tomarse estrictas precauciones para evitar la contaminación por ácidos nucleicos en el sistema de análisis y en cualquier parte del laboratorio donde se manipulen y preparen las muestras (véase el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas* y el Capítulo 2.2.3 *Desarrollo y optimización de las pruebas de detección de ácidos nucleicos*). Estas pruebas tienen incluso más sensibilidad que la RT-PCR en gel y pueden completarse en unas horas. Se utilizan mucho para el diagnóstico de enfermedades infecciosas tras la detección directa de ARN vírico de gran variedad de muestras, como suero, sangre completa, tejidos, leche o esperma. La alta sensibilidad analítica permite adoptar estrategias para analizar combinaciones de varias muestras individuales o analizar leche de tanque a granel. Aplicando esta estrategia, puede detectarse la presencia de uno o más animales IP en rebaños de varios cientos de vacas. Aunque es ligeramente más cara que los métodos de inmunotinción, la RT-PCR en tiempo real es un método rápido y fiable que también puede utilizarse para analizar el sobrenadante de cultivos desde el pase final por cultivos celulares. Aunque la RT-PCR en tiempo real tiene una sensibilidad muy alta y puede aplicarse al análisis de los materiales biológicos que se empleen para la fabricación de vacunas, es necesario interpretar los resultados con cautela porque la detección de ARN del virus no implica por sí sola la presencia de virus infectivo. La RT-PCR en tiempo real basada en sondas de ADN marcadas con marcadores fluorescentes también puede emplearse para diferenciar pestivirus (por ejemplo, McGoldrick *et al.*, 1999).

Los cebadores de esta prueba deben escogerse de entre regiones del genoma muy conservadas, teóricamente la región no codificante 5', o el gen NS3 (gen p80). Se han publicado pruebas que son muy reactivas ante gran variedad de especies del género *Pestivirus*, y que detectan todos los tipos del VDVB, el virus de la peste porcina clásica y la mayor parte de pestivirus "atípicos" (por ejemplo, Hoffman *et al.*, 2006). Para el diagnóstico, es recomendable utilizar una prueba que sea sensible y que reaccione ante gran variedad de virus, dado que en ocasiones se produce una transmisión interespecífica de distintos pestivirus. Cuando se requiera identificar también el virus en cuestión, pueden aplicarse pruebas específicas de especies de pestivirus para tipificar el virus. Es importante optimizar por completo todos los aspectos de la RT-PCR en tiempo real, incluida la extracción y purificación del ácido nucleico. Deben determinarse las concentraciones óptimas de Mg²⁺, cebadores, sonda y polimerasa, así como los parámetros de ciclado. De todas formas, hoy en día se venden "mezclas primarias" listas para usar que solo requieren añadir concentraciones optimizadas de los cebadores y de la sonda. Para cada mezcla primaria se suelen recomendar unas condiciones de ciclado optimizadas.

Existen a la venta varios sistemas de purificación de ácidos nucleicos en forma de kit, y algunos se pueden semi-automatizar. Los sistemas basados en la captura y purificación de ARN con microesferas magnéticas se utilizan mucho y permiten un rápido procesamiento de grandes cantidades de muestras. Cada producto deberá evaluarse para determinar cuál es el kit óptimo para cada tipo de muestra y si se requiere algún procesamiento preliminar de la muestra. En el caso de las muestras de sangre completa, el tipo de anticoagulante y el volumen de sangre que se introduzcan en el tubo de ensayo serán importantes. En el caso de las muestras de sangre recogidas con heparina surgen más problemas de inhibidores de la PCR que con las recogidas con EDTA. Estas diferencias también se acentúan si el tubo no contiene el volumen de sangre recomendado, una situación que hace aumentar la concentración de anticoagulante de la muestra. Para detectar posibles falsos negativos, se recomienda añadir pequeñas cantidades de un molde exógeno de ARN ("control interno") a la muestra antes de extraer el ARN (por ejemplo, Hoffman *et al.*, 2006). Incluyendo cebadores y sonda de PCR específicos de la secuencia exógena, se puede controlar la eficiencia de la extracción de ARN y la presencia de inhibidores de la PCR. Aunque resulta útil para todos los tipos de muestras, la inclusión de un control interno es especialmente deseable cuando se analiza esperma y sangre completa. Cuando se utiliza un control interno, es necesario un exhaustivo análisis para asegurar que la amplificación mediante PCR del control interno no compite con la PCR diagnóstica, puesto que en ese caso disminuiría su sensibilidad analítica (véase también el Capítulo 1.1.6).

Cuando se sospecha que una muestra puede contener sustancias que afectan negativamente a la eficiencia de la extracción de ARN o de la RT-PCR en tiempo real, una ligera dilución de la muestra con suero salino, medio de cultivo celular o una solución tampón (como PBGS) suele resolver el problema. La dilución de una muestra de esperma a ¼ y de sangre completa no coagulada a 1/10 suelen ser suficientes. Dado que la RT-PCR en tiempo real tiene una sensibilidad analítica extremadamente alta, la dilución de la muestra casi nunca influye de forma importante en la capacidad de la prueba de detectar ARN vírico si lo hay.

1.2.1. Reacción en cadena la polimerasa en tiempo real para la detección del VDVB en esperma

Se ha comprobado que la RT-PCR en tiempo real es extremadamente útil para analizar muestras de esperma con el fin de demostrar la ausencia del VDVB y, además de la rapidez, suele ofrecer mejores resultados que el aislamiento del virus en cultivo celular, sobre todo cuando la concentración de virus es baja, como puede ocurrir en toros con una ITP. La RT-PCR en tiempo real descrita aquí emplea un par de cebadores, específicos de secuencia, para amplificar el ADN diana, y una oligosonda 5'-nucleasa para la detección de productos amplificados. La oligosonda es un único oligonucleótido específico de secuencia marcado con dos fluoróforos distintos. Los cebadores y la sonda se venden y existen varias opciones distintas de fluoróforos. Esta RT-PCR en tiempo real útil para la detección de gran variedad de pestivirus está diseñada para detectar ADN vírico de todas las cepas de VDVB1 y de VDVB2, así como del VEF, del VPPC y de la mayoría de pestivirus atípicos. Esta prueba amplifica de manera selectiva una secuencia de 208 pares de bases de la región 5' no traducida (NTR 5') del genoma del pestivirus. En el protocolo que se describe a continuación se indican los cebadores y las sondas.

- i) Preparación de la sonda, equipo y reactivos
- a) Las muestras que se utilizan para esta prueba suelen ser esperma bovino extendido y, en ocasiones, esperma puro. Si las muestras solo van a analizarse mediante RT-PCR en tiempo real, es aceptable que se envíen refrigeradas con tal de que sigan frías al llegar al laboratorio. En cambio, si no puede garantizarse una cadena de frío o si se va a proceder al aislamiento del virus, las muestras de esperma deberán guardarse en nitrógeno líquido o a temperaturas inferiores a los -70°C (almacenamiento de larga duración) o 4°C (almacenamiento de corta duración, de un máximo de 7 días). No obstante, es importante recordar que las muestras destinadas al aislamiento del virus no deben guardarse a 4°C durante más de 1–2 días.
 - b) Debido a la muy alta sensibilidad analítica de la RT-PCR en tiempo real, pueden utilizarse volúmenes de esperma mucho menores. Aun así, deberán procesarse al menos tres pajuelas (que contengan al menos 250 μl cada una) de cada lote de esperma obtenido. Para tomar una muestra para la extracción de ácido nucleico, deberá combinarse y mezclarse bien el esperma de las tres pajuelas.
 - c) Para llevar a cabo la prueba es necesario un sistema de detección por PCR en tiempo real, así como el software de análisis de datos correspondiente. Existen muchos sistemas de detección por PCR en tiempo real, de varios fabricantes. Otros elementos necesarios para esta prueba son una microcentrífuga, un bloque de enfriamiento, un micro-vórtex y micropipetas. Dado que las RT-PCR en tiempo real permiten detectar cantidades muy pequeñas de las moléculas de ácido nucleico diana, es necesario tomar medidas adecuadas para evitar la contaminación, como preparar el reactivo en zonas “limpias” exclusivas y físicamente separadas (donde no se manipulen muestras ni materiales relacionados con la PCR), una zona exclusiva para el procesado de la muestra y una zona aislada para el termociclador de la PCR y equipo relacionado. Cada zona debe tener reactivos y equipo propios. Además, paralelamente deberá procesarse como mínimo una muestra negativa para saber si existe algún grado de contaminación. Las fuentes de contaminación pueden ser el arrastre de producto de muestras positivas o, lo que es más habitual, contaminación cruzada por productos de la PCR de trabajos previos.
 - d) La RT-PCR en tiempo real comporta dos procedimientos:
 - 1) En primer lugar, se extrae ARN del VDVB a partir del esperma empleando un método validado de extracción de ácido nucleico. Los sistemas en los que se emplean microesferas magnéticas para la captura y purificación del ácido nucleico son los recomendables. También es preferible que las microesferas se manipulen con un sistema de manipulación de partículas magnéticas semiautomático.
 - 2) El segundo procedimiento es el análisis mediante RT-PCR del molde de ARN extraído con el sistema de RT-PCR en tiempo real.
- ii) Extracción del ARN
- Se extrae ARN o ácido nucleico total de la muestra de esperma combinada (tres pajuelas obtenidas en el mismo momento y del mismo animal). Se recomienda emplear un kit de extracción con microesferas magnéticas. No obstante, el kit de elección será el que haya demostrado una extracción óptima en muestras difíciles (esperma y sangre completa). Algunos sistemas y protocolos de kits están suficientemente refinados como para que no sea necesario eliminar las células de la muestra de esperma. Antes de la extracción, se diluye la muestra de esperma combinada a 1/4 en solución salina con gelatina tamponada con fosfato (PBGs) o una solución tampón similar. Se termina la extracción del ARN tomando 50 μl de la muestra combinada, diluida, y se añaden al tampón de lisis. Algunos kits comerciales de extracción pueden requerir volúmenes más grandes. También se han obtenido resultados satisfactorios añadiendo 25 μl de muestra combinada sin diluir al tampón de lisis. Se termina la extracción siguiendo las instrucciones del fabricante del kit.
- iii) Procedimiento de la RT-PCR en tiempo real
- a) Mezcla para la reacción: Varios fabricantes ofrecen kits de amplificación mediante RT-PCR, y deberá escogerse el que sea compatible con la plataforma de PCR en tiempo real en cuestión. Varias empresas sintetizan los cebadores y sondas necesarios. Los Laboratorios de Referencia de la OIE para el VDVB pueden indicar qué proveedores son los adecuados.
 - b) Suministro y almacenamiento de los reactivos: La mezcla de reacción para la PCR en tiempo real suele suministrarse a una concentración de 2x lista para usar. Para la

ejecución y el almacenamiento deben seguirse las instrucciones del fabricante. Las soluciones de trabajo de cebadores y sonda se preparan con agua sin nucleasa a las concentraciones de 20 µM y de 3 µM, respectivamente. Las soluciones primarias se guardan a –20°C y la solución de sonda debe guardarse protegida de la luz. Se pueden preparar alícuotas de un solo uso o de uso limitado para reducir la congelación-descongelación de cebadores y sonda, y prolongar así su periodo de validez.

c) Secuencias de los cebadores y de la sonda

La elección de los cebadores y de la sonda se describe en Hoffmann *et al.* (2006) y se resume a continuación.

Cebador directo: BVD 190-F 5'-GRA-GTC-GTC-ART-GGT-TCG-AC

Cebador inverso: V326 5'-TCA-ACT-CCA-TGT-GCC-ATG-TAC

Sonda: TQ-pesti 5'-FAM-TGC-YAY-GTG-GAC-GAG-GGC-ATG-C-TAMRA-3'

d) Preparación de las mezclas de reacción

Las mezclas de reacción para la PCR se preparan en una sala independiente, aislada de las demás actividades relativas a la PCR y a la manipulación de la muestra. En cada ejecución de la PCR deben incluirse los controles correspondientes. Como mínimo, debe incluirse un control sin molde (NTC), un control negativo adecuado (NC) y dos controles positivos (PC1, PC2). Los controles positivo y negativo se incluyen en todos los pasos de la prueba, desde la extracción en adelante, mientras que el NTC se añade después de terminar la extracción. Las amplificaciones mediante PCR se llevan a cabo en un volumen de 25 µl. El protocolo descrito se basa en el uso de una placa de microtitulación de 96 pocillos, pero también son adecuadas otras opciones con microtubos. Cada pocillo de la placa de PCR debe contener 20 µl de la mezcla de reacción y 5 µl de la muestra:

12,5 µl	Tampón RT 2x – de un kit comercial.
1 µl	Cebador directo BVD 190-F (20 µM)
1 µl	Cebador inverso V326 (20 µM)
1 µl	Sonda TQ-pesti (3 µM)
2 µl	ARNt (40 ng/µl)
1,5 µl	agua
1 µl	mezcla enzimática 25x
5 µl	muestra (o controles– NTC, NC, PC1, PC2)

e) Elección de los controles

NTC: suele consistir en ARNt en agua sin nucleasa, que se añade en lugar de una muestra cuando se ajusta la reacción de la PCR.

NC: En la práctica, muchos laboratorios utilizan PBGS o un tampón similar. Teóricamente, los controles para el análisis de muestras de esperma deben consistir en esperma negativo obtenido de toros seronegativos. No obstante, el requisito mínimo es que la prueba se haya validado ampliamente con muestras negativas y positivas para confirmar que, con muestras de esperma, da una extracción y amplificación fiables.

PCs: Existen dos controles positivos (PC1 = moderado [Ct 29-32] y PC2 = positivo débil [Ct 32–35]). Como control positivo, es preferible un esperma positivo de toros infectados de forma natural. No obstante, es probable que sea difícil de conseguir. Además, el esperma de un toro IP no se considera adecuado porque las cargas de virus suelen ser muy altas y no permitirían detectar de manera fiable reducciones moderadas en el rendimiento de la extracción o analítico. Como alternativa, se puede utilizar esperma negativo al que se hayan añadido pequeñas cantidades de VDVB. Si se utilizan otras muestras, como un PC ordinario, la exigencia mínima será que todo el proceso de extracción y la PCR que se utilicen se hayan validado

ampliamente con esperma positivo de toros con una ITP o de toros que estén en fase de infección aguda. Si no se dispone de este tipo de animales y para la validación se utilizan muestras a las que se haya añadido VDVB, deberán incluirse muestras a las que se hayan añadido concentraciones muy bajas del virus. En el día a día, la inclusión de un control exógeno con cada muestra problema compensará de lejos el hecho de no utilizar esperma positivo como control y aportará otras ventajas, porque permitirá realizar un seguimiento de la eficiencia de la prueba con cada muestra. Las muestras de control positivo deben prepararse cuidadosamente para evitar la contaminación cruzada a partir de soluciones de virus de título alto, y se deberán preparar con antelación y congelarse a una concentración "lista para usar" y, si puede ser, en volúmenes para "un solo uso".

- f) Las muestras de ácido nucleico extraído se añaden a la mezcla para PCR en una sala independiente. Los controles deben añadirse en último lugar, en una secuencia que siga este orden: NTC, control negativo y, a continuación, los dos controles positivos.

- g) Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La placa o los tubos de PCR se sitúan en un sistema de detección mediante PCR en tiempo real en una sala para PCR independiente y destinada a este fin. Algunas mezclas primarias tienen unas condiciones de reacción uniformes que son adecuadas para muchas pruebas distintas. Por ejemplo, el sistema de detección mediante PCR se programa para la prueba del siguiente modo:

1x 48°C 10 minutos

1x 95°C 10 minutos

45 x (95°C 15 segundos, 60°C 1 minuto)

- h) Análisis de datos mediante PCR en tiempo real

El software se suele programar para ajustar automáticamente los resultados compensando posibles señales de fondo, y el umbral suele ajustarse teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante del software de análisis que se utilice. En este caso, el umbral se ajusta a 0,05.

- i) Interpretación de los resultados

- a) Controles – todos los controles deben dar los resultados esperables; los controles positivos PC1 y PC2 deben situarse dentro del intervalo establecido, y ni el control negativo NC ni el control sin molde NTC deben tener valores Ct.

- b) Muestras problema

- 1) Resultado positivo: Cualquier muestra que tenga un ciclo umbral (Ct) inferior a 40 se considera positiva.
- 2) Resultado negativo: Cualquier muestra que no tenga Ct se considera negativa. No obstante, antes de comunicar un resultado negativo, debe comprobarse el resultado que da el control interno exógeno, que deberá situarse dentro del intervalo de aceptación para dicho control (por ejemplo, un valor de Ct no más de 2-3 unidades de Ct superior al obtenido para el NTC).

1.3. Enzoinmunoanálisis para la detección de antígeno

La detección de antígeno mediante ELISA se ha convertido en un método muy utilizado para la detección de animales IP a nivel individual. Estas pruebas no se usan para detectar animales infectados de manera aguda (aunque en ocasiones esto pueda lograrse). Es importante destacar que estas pruebas no están diseñadas para analizar esperma ni materiales biológicos que se empleen en las pruebas o en la fabricación de vacunas. Se han publicado varios métodos de ELISA para la detección de antígeno y existen a la venta varios kits comerciales. La mayoría se basan en el principio del ELISA de tipo sándwich, con un anticuerpo de captura unido a una fase sólida y un anticuerpo detector conjugado a un sistema de señal, como la peroxidasa. En el sistema de detección, a veces se incluyen pasos de amplificación para aumentar la sensibilidad de la prueba, como el uso de biotina y estreptavidina. Se han descrito sistemas basados tanto en anticuerpos monoclonales como en anticuerpos policlonales. Esta prueba mide el antígeno del VDVB (NS2-3 o ERNS) que se encuentra presente en lisados de leucocitos de sangre periférica; los ELISA de captura de antígeno de nueva

generación (ELISA de captura de ERNS) permiten detectar antígeno del VDVB en sangre, así como en plasma o en suero. El mejor método proporciona una sensibilidad similar a la del aislamiento del virus, y puede ser preferible en los contados casos en los que una infección persistente cursa con seropositividad. Debido a la viremia transitoria, el ELISA de detección de antígeno es menos útil para la detección del virus en las infecciones agudas por el VDVB.

El ELISA de detección del antígeno NS2-3 puede ser menos efectivo en terneros de corta edad que hayan tomado calostro, debido a la presencia de anticuerpos maternos contra el VDVB. La RT-PCR en tiempo real probablemente sea el método de detección más sensible en tales circunstancias, pero el ELISA de detección de ERNS también se ha comprobado que es una prueba sensible y fiable, sobre todo cuando se utiliza con biopsias de piel (del pabellón auricular) (Cornish *et al.*, 2005).

1.4. Inmunohistoquímica

Los métodos basados en el marcaje enzimático permiten detectar antígenos del VDVB en cortes de tejido, sobre todo cuando se dispone de MAb adecuados. No obstante, estas pruebas no son adecuadas para certificar animales para el comercio internacional y deben limitarse a estudios de diagnóstico. Es importante que los reactivos y los procedimientos que se utilicen estén totalmente validados, y que se elimine la reactividad inespecífica. En el caso del ganado bovino IP, puede utilizarse casi cualquier tejido, pero se ha observado una tasa de éxito especialmente alta con los ganglios linfáticos, la glándula tiroidea, la piel, el encéfalo, el abomaso y la placenta. Se ha comprobado que las biopsias cutáneas, como las de pabellón auricular, son útiles para el diagnóstico *in vivo* de infecciones persistentes por el VEF.

2. Pruebas serológicas

Se pueden detectar anticuerpos contra el VDVB en suero de ganado bovino mediante una VN estándar o ELISA, empleando uno de los muchos métodos publicados o con kits comerciales (por ejemplo, Edwards, 1990). Se utiliza la serología para detectar niveles de inmunidad del rebaño, para la detección de animales IP en un rebaño, para ayudar en la investigación de una enfermedad reproductiva y de la posible implicación del VDVB y para establecer el estado serológico de toros que se utilicen para la obtención de esperma y para determinar si ha habido una infección reciente. El ELISA de detección de anticuerpos en muestras de leche de tanque puede dar una pista útil del estado de un rebaño respecto a la DVB (Niskanen, 1993). Un resultado de ELISA alto (0,8 o más unidades de absorbancia) en un rebaño no vacunado indica una probabilidad alta de que tal rebaño haya estado expuesto al VDVB recientemente, probablemente por la presencia de uno o más animales con viremia persistente. En cambio, un valor muy bajo o negativo ($\leq 0,2$) indica que es improbable que haya animales con viremia persistente. No obstante, los resultados del ELISA no siempre son un indicador fiable de la presencia de animales IP en las explotaciones, debido a diferencias en el manejo (Zimmer *et al.*, 2002), a la administración reciente de una vacuna o a la presencia de antígeno vírico en la leche de tanque, que podría interferir con la prueba de detección de anticuerpos en sí. La determinación de la presencia de anticuerpos en un pequeño número de animales de corta edad (9-18 meses) también se ha utilizado como indicador de transmisión reciente del VDVB en el rebaño (Houe *et al.*, 1995), pero este método también depende del grado de contacto entre distintos grupos de animales del rebaño y de la posible exposición al virus a través de rebaños cercanos. La VN se utiliza más para fines reguladores (como el análisis de donantes de esperma), mientras que los ELISA (normalmente en forma de kits comerciales) se suelen utilizar para fines de diagnóstico. Tanto en el ELISA como en la VN deben incluirse en cada ejecución sueros estándar positivo y negativo a modo de controles, y para que estas pruebas se consideren válidas, los resultados de estos controles deberán situarse dentro de los límites predeterminados. En el caso de la VN, en cada análisis de muestra problema también debe incluirse un "suero control" para determinar la toxicidad de la muestra.

2.1. Neutralización del virus

El tipo de cepa vírica que se incluya en la VN es muy importante. Ninguna cepa va a resultar ideal para todos los casos, pero en la práctica deberá escogerse una que detecte la mayor cantidad posible de reacciones serológicas en la población bovina local. Es posible que con una prueba de neutralización en la que se utilice una cepa del virus de tipo 1 no se detecten concentraciones bajas de anticuerpos contra el VDVB de tipo 2, y viceversa (Fulton *et al.*, 1997). Es importante que en la prueba se utilice VDVB tanto de tipo 1 como de tipo 2, y no solo el que el técnico crea que se encuentra en la muestra, ya que ello puede hacer que se pierda información. Por motivos de facilidad de lectura, para las pruebas de VN la mayoría de laboratorios utiliza cepas de VDVB altamente citopáticas y adaptadas al laboratorio. Dos de las cepas citopáticas más utilizadas son la 'Oregon C24V' y la 'NADL'. No obstante, ahora se dispone de técnicas de inmunomarcaje que permiten una detección sencilla del crecimiento o la neutralización de cepas no citopáticas cuando se considere deseable, sobre todo para respaldar la inclusión de una cepa vírica localmente importante. A

continuación, se indica un protocolo para una prueba de VN en placa de microtitulación (Edwards, 1990):

2.1.1. Procedimiento analítico

- i) Los sueros problema se inactivan sometiéndolos a calor durante 30 minutos a 56°C.
- ii) A partir de una dilución inicial de 1/4, se preparan diluciones seriadas a la mitad de los sueros problema en una placa de microtitulación de fondo plano, de 96 pocillos y de grado cultivo celular, empleando un medio de cultivo celular como diluyente. Se utilizan tres o cuatro pocillos por muestra y dilución, en función del grado de precisión que se requiera. Se deja un pocillo sin virus por muestra y dilución para comprobar si la muestra causa toxicidad, ya que ello podría confundirse con la citopatología del virus o interferir con la replicación del mismo. En cada lote de pruebas también deben incluirse sueros control positivo y negativo.
- iii) Se añade a cada pocillo un volumen igual (por ejemplo 50 µl) de cepa citopática primaria del VDVB que contenga 100 DICT₅₀ (50%) (dosis que resultan infectivas en el 50% de los cultivos tisulares expuestos). También se hace una titulación por retroceso de la cepa primaria del virus en algunos pocillos de repuesto para comprobar la potencia del virus (límites de aceptación 30–300 DICT₅₀).
- iv) La placa se incuba 1 hora a 37°C.
- v) Se tripsiniza un frasco de células adecuadas (por ejemplo, de cornetes nasales o testículos bovinos) y la concentración celular se ajusta a $1,5 \times 10^5$ /ml. 100 µl de la suspensión celular se añaden a cada pocillo de la placa de microtitulación.
- vi) La placa se incuba a 37°C durante 4-5 días, en una atmósfera con un 5% de CO₂ o con la tapa sellada.
- vii) Los pocillos se examinan al microscopio para comprobar si hay ECP o se fijan y tiñen mediante tinción por inmunoperoxidasa empleando un anticuerpo monoclonal adecuado. El título de la VN para cada suero es la dilución a la cual el virus se neutraliza en un 50% de los pocillos. Este puede calcularse mediante los métodos de Spearman–Kärber o de Reed Muench. Un animal seronegativo no presentará neutralización a la dilución mínima (1/4), equivalente a una dilución final de 1/8. Para comparar con exactitud los títulos de anticuerpos, y sobre todo para demostrar cambios significativos (de más del cuádruple) en los títulos, deben analizarse muestras en paralelo en la misma prueba.

2.2. Enzimoimmunoanálisis

Se pueden utilizar pruebas indirectas o de bloqueo. Existen muchos kits comerciales. Como ocurre con la prueba de la neutralización del virus, los ELISA configurados con el antígeno de un genotipo del VDVB pueden no detectar de manera eficiente anticuerpos inducidos por otro genotipo. Por lo tanto, las pruebas deben escogerse por su capacidad de detectar anticuerpos contra el perfil de genotipos y de cepas que circule en el país en el que se van a utilizar.

La principal dificultad de esta prueba es preparar un antígeno vírico que tenga la potencia suficiente. El virus se debe cultivar en condiciones de cultivo óptimas empleando un tipo celular que sea muy permisivo. El suero que se utilice en el medio no debe inhibir el crecimiento del VDVB. El momento óptimo de la recogida deberá determinarse experimentalmente para cada sistema de cultivo. El virus se puede concentrar y purificar mediante centrifugación por gradiente de densidad. Como alternativa, se puede preparar un antígeno potente por tratamiento de cultivos celulares infectados con detergentes, como Nonidet P40, N-decanoil-N-metilglucamine (Mega 10), Triton X-100 o 1-octilbeta-D-glucopiranosido (OGP). En algunos casos, como antígeno se han utilizado células enteras infectadas y fijadas. En el futuro, se podrán utilizar más antígenos artificiales fabricados mediante la expresión de genes víricos específicos en sistemas bacterianos o eucariotas. Tales sistemas se deberán validar analizando sueros específicos contra una gran variedad de cepas víricas. En el futuro, esta tecnología debería permitir la producción de pruebas serológicas complementarias a vacunas de subunidades o marcadoras, lo cual permitiría diferenciar entre ganado bovino vacunado y ganado bovino infectado de forma natural. A continuación se ofrece un ejemplo de protocolo para un ELISA indirecto (Edwards, 1990).

2.2.1. Procedimiento analítico

- i) Se inoculan cultivos celulares rodantes de células secundarias de testículo de ternero y con una alta multiplicidad de infección (alrededor de uno) con la cepa del VDVB Oregon C24V, se recubren con medio libre de suero y se incuban durante 24 horas a 37°C.
- ii) Las células se raspan y se precipitan. El medio sobrenadante se desecha. El precipitado se trata con dos volúmenes de OGP al 2% en PBS durante 15 minutos a 4°C y se centrifuga para eliminar los detritos celulares. El antígeno del sobrenadante se guarda en alícuotas pequeñas a -70°C o se liofiliza. Las células no infectadas se procesan en paralelo para generar un antígeno control.
- iii) El antígeno se diluye hasta una dilución predeterminada en tampón bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. Se recubren filas alternas de una placa de microtitulación de grado ELISA con virus y antígenos control durante toda la noche a 4°C. A continuación, las placas se lavan en PBS con Tween 20 al 0,05% o Tween 80 (PBST) antes de utilizarlas en la prueba.
- iv) Los sueros problema se diluyen a 1/50 en diluyente sérico (NaCl 0,5 M; tampón fosfato 0,01 M; Tween 20 al 0,05%; ácido etilendiaminotetraacético 0,001 M; polivinilpirrolidona al 1%, pH 7,2) y se añaden a pocillos recubiertos con virus o con control durante 1 hora a 37°C. A continuación, las placas se lavan cinco veces con PBST.
- v) Se añade anticuerpo anti IgG bovina conjugado a peroxidasa a una dilución predeterminada (en diluyente sérico) durante 1 hora a 37°C, y a continuación las placas se lavan de nuevo cinco veces con PBST.
- vi) Se añade un sustrato enzimático adecuado, como peróxido de hidrógeno/tetrametil bencidina. Tras la aparición de color, se detiene la reacción con ácido sulfúrico y la absorbancia se lee en un lector de placa de ELISA. En cada suero problema, el valor obtenido con el antígeno control se resta de la reacción obtenida con el suero, para obtener un valor de absorbancia neta.
- vii) Se recomienda convertir los valores de absorbancia neta en un cociente muestra:control positivo (o porcentaje de positividad) dividiendo la absorbancia neta de la muestra entre la absorbancia neta obtenida en esa prueba con un suero estándar positivo que tenga una absorbancia neta de alrededor de 1,0. Este procedimiento de estandarización conduce a resultados más constantes y reproducibles.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

Las vacunas contra el VDVB se utilizan principalmente con fines de control de la enfermedad, aunque pueden tener ventajas para la producción, sobre todo en ganado bovino criado de forma intensiva, como los animales de engorde. En algunos países en que se está trabajando para la erradicación del VDVB, se elimina a los animales IP y el ganado restante se vacuna para mantener un nivel alto de infección y prevenir la aparición de más animales IP. La vacunación destinada al control de las infecciones por el VDVB puede ser difícil debido en parte a la variabilidad antigénica del virus y a la aparición de infecciones persistentes que surgen como consecuencia de las infecciones fetales. En el medio natural, el virus se mantiene principalmente por los animales IP, que son producto de una infección intrauterina. Los objetivos de una vacuna deben ser la prevención de la viremia sistémica y que el virus no atraviese la placenta. Si se logran, es probable que la vacuna prevenga la gran mayoría del resto de signos clínicos, como los reproductivos, los respiratorios y los entéricos, así como la inmunosupresión y sus correspondientes consecuencias. En cada país se dispone de unas vacunas determinadas. Clásicamente, las vacunas contra la DVB se clasifican en vivas o inactivadas. Se han descrito vacunas de subunidades recombinantes experimentales que contienen la glucoproteína E2 del VDVB expresada con baculovirus o plantas transgénicas, así como vacunas de ADN con la glucoproteína E2 del VDVB, pero muy pocas llegan a comercializarse, si es que se comercializa alguna. Ofrecen una expectativa de “vacunas marcadoras” cuando se utilizan junto a una prueba serológica complementaria.

1.1. Características del producto ideal

Clásicamente, las vacunas contra la DVB se han dividido en dos categorías: las vacunas con virus vivo y las vacunas con virus modificado. El requisito básico para ambos tipos es que prevengan en gran medida la infección fetal. En muchas de las vacunas vivas se ha utilizado una cepa citopática del virus incapaz de atravesar la placenta. Aun así, es importante asegurarse de que el virus vacunal no causa infección fetal. En general, para garantizar una protección óptima y evitar posibles riesgos de infección fetal, la vacunación de animales reproductores debe terminar mucho antes de la

inseminación. La vacuna con virus vivo también puede ser inmunosupresora y precipitar otras infecciones. Por otra parte, en el caso de las vacunas con virus vivo modificado es posible que baste con una sola dosis. El uso de un producto vivo que contenga una cepa citopática del VDVB puede precipitar la enfermedad de las mucosas por sobreinfección de animales con viremia persistente. Las vacunas inactivadas que se formulan adecuadamente son muy seguras, pero para que generen niveles satisfactorios de inmunidad normalmente se precisan revacunaciones, lo cual puede ser un inconveniente. La aplicación de un protocolo de vacunación combinada en el que se emplee vacuna inactivada seguida de vacuna viva podría reducir el riesgo de reacción adversa a la cepa viva. Dada la tendencia a la variabilidad antigénica, tanto las vacunas vivas como las inactivadas deben contener cepas del VDVB que estén estrechamente emparentadas con los virus que se encuentren en la zona en la que vaya a utilizarse el producto. Por ejemplo, en los países con cepas del VDVB de tipo 2, es importante que la vacuna contenga una cepa apropiada de tipo 2. Para optimizar la inmunidad contra las cepas de tipo 1, deberán incluirse antígenos de los subtipos dominantes (por ejemplo, 1a y 1b). Debido a la necesidad de adaptar las vacunas a las cepas que sean más frecuentes en el país o región en cuestión, no resulta viable crear un banco de antígeno vacunal a partir del cual pueda trabajarse a nivel internacional.

En el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de las vacunas veterinarias* se ofrece una guía para la producción de vacunas veterinarias. Las directrices que se exponen en este documento y las del capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden complementarse con los requisitos que tenga cada país o región.

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

2.1. Características del inóculo

Para optimizar la eficacia, se considera que debe haber una estrecha concordancia antigénica entre los virus que contiene la vacuna y los que circulan en la población de destino. Deberán incluirse cepas del VDVB de tipo 2 según necesidad. Debido a las variaciones regionales en los genotipos y los subtipos del VDVB, para poder conferir una protección aceptable, muchas vacunas deben contener más de una cepa del VDVB. Realizando análisis con paneles de MAb se pueden conocer bien las características antigénicas de cada cepa (Paton *et al.*, 1995).

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

A menudo se mezclan cepas de virus citopático con el biotipo no citopático. La separación y purificación de ambos biotipos a partir de un cultivo mixto inicial resulta importante para mantener las características esperables del inóculo y se logra con varios ciclos de una técnica de dilución limitante, en el caso del virus no citopático, o con una selección en placa en el caso del virus citopático. La pureza del virus citopático debe confirmarse mediante, como mínimo, un pase más a la dilución limitante. Cuando se clonen cepas, deben confirmarse su identidad y características antigénicas clave. La identidad del virus del inóculo debe confirmarse mediante secuenciación. Cuando en la vacuna hay múltiples cepas, cada una tiene que prepararse de forma independiente.

Las cepas escogidas para el inóculo deben mantener las características antigénicas deseables, pero cuando se utilicen para vacunar animales susceptibles, estos no podrán presentar signos de enfermedad. Las vacunas vivas atenuadas no deben ser transmisibles a animales no vacunados que entren en contacto con los vacunados, y no pueden tener capacidad de infectar al feto. Teóricamente, los inóculos que se preparen para producir vacunas inactivadas deben cultivarse hasta títulos altos para minimizar la necesidad de concentrar los antígenos, y una cantidad mínima de proteína de los cultivos celulares debe incorporarse al producto final. Deben prepararse reservas de cepas originales tanto para las vacunas vivas como para las inactivadas, aplicando un sistema de lotes de inóculo en el que se trabaje con reservas de cepas originales y de trabajo que puedan utilizarse para la producción, de tal manera que el número de pases se pueda limitar y que se minimice la deriva antigénica. Aunque para este propósito no se han establecido criterios absolutos, por norma general, el inóculo que se utilice para producción no debe someterse a más de 20 pases desde el inóculo primario, y el inóculo primario debe tener el mínimo número posible de pases desde la cepa original.

2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

Es fundamental garantizar que todos los materiales que se utilicen para preparar los antígenos a granel se hayan analizado a fondo para asegurar que están libres de agentes extraños. Ello debe incluir los inóculos primario y de trabajo, los cultivos celulares y todos los suplementos de los medios, como el suero bovino. También es especialmente importante asegurarse de que

todo suero utilizado sea de origen bovino y esté libre tanto de VDVB de cualquier genotipo como de anticuerpos contra cepas del VDVB, puesto que incluso bajas concentraciones de virus pueden enmascarar la presencia de anticuerpos, y viceversa. En todos los materiales e inóculos vacunales deben comprobarse la esterilidad y la ausencia de contaminación por otros agentes, sobre todo virus, como se describe en los capítulos 1.1.8 y 1.1.9.

2.1.3. Validación como cepa vacunal

Todas las vacunas deben superar pruebas estándar de eficacia. Estas pruebas deben incluir, como mínimo, la demostración de una respuesta con anticuerpos neutralizantes tras la vacunación, una reducción de la excreción del virus tras la exposición de ganado bovino vacunado y, teóricamente, una prevención de la viremia. Las pruebas de eficacia que se realizan en las vacunas contra la DVB evaluando parámetros clínicos en ganado bovino no gestante pueden tener el inconveniente de que no siempre aparecen signos clínicos, pero cuando se empleen, deberá realizarse un seguimiento de parámetros clínicos como la temperatura rectal y la leucopenia. Por más que al utilizar el aislamiento del virus en cultivo celular pueda resultar difícil demostrar en todos los casos los bajos niveles de viremia que se asocian a una infección aguda, la PCR en tiempo real podría considerarse un método alternativo para establecer los niveles de virus circulante.

Si una vacuna supera las pruebas básicas, la eficacia de la vacunación debe medirse en último término por su capacidad de prevenir la transmisión transplacentaria. Si se observa una reducción sustancial y, teóricamente, una prevención completa de la infección fetal, lo esperable es que la vacuna sea muy efectiva en otras situaciones (por ejemplo, para prevenir los signos respiratorios). Se puede establecer un sistema de exposición por inoculación intranasal de virus no citopático a vacas gestantes que se encuentren en los 60 a 90 días de gestación (Brownlie *et al.*, 1995). Normalmente, este sistema produce de manera fiable terneros con viremia persistente de vacas no inmunes. En los países en que suelen encontrarse VDVB de tipo 2, debe medirse la eficacia de la vacuna para proteger contra infecciones por el VDVB2.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Tanto los biotipos citopáticos como los no citopáticos crecen en gran variedad de cultivos celulares de origen bovino. Pueden emplearse procedimientos estándar, con los cuales lo esperable será recoger virus no citopático los días 4–7 y virus citopático los días 2–4. El nivel de producción de virus infeccioso depende de varios factores, como el cultivo celular, la cepa utilizada y la tasa inicial de inoculación de virus. Para establecer cuáles son las condiciones óptimas para la producción de virus a gran escala, deben tenerse en cuenta estos factores y se debe investigar la cinética de replicación del virus. Tanto en las vacunas vivas como en las inactivadas, el objetivo esencial será producir una reserva de virus de título alto. A continuación, esta preparación de antígeno a granel se puede preparar según el tipo de vacuna que se pretenda producir.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

La mayoría de vacunas contra el VDVB se cultivan en cultivos celulares de origen bovino que a menudo van suplementados con componentes de origen animal. El material más delicado es el suero bovino, debido a la posible contaminación por distintos virus de la DVB y por anticuerpos contra estos virus. Estos contaminantes accidentales no solo afectan a la eficiencia de la producción sino que también pueden enmascarar la presencia de concentraciones bajas del VDVB infeccioso, que puede tener características indeseables. La esterilidad y la ausencia de contaminación por otros agentes, sobre todo virus, debe comprobarse no solo en los inóculos de virus sino también en el resto de materiales, como se describe en los capítulos 1.1.8 y 1.1.9. Además, los materiales de origen bovino u ovino deben proceder de un país con riesgo insignificante de encefalopatías espongiiformes transmisibles [EET] (véase el capítulo 1.1.9).

2.2.3. Controles durante el proceso

Los controles que se realizan durante el proceso forman parte del proceso de fabricación. Los cultivos deben inspeccionarse periódicamente para asegurar que permanecen libres de contaminación y para comprobar la salud de las células y determinar si aparece o no ECP, según corresponda. Aunque el requisito básico de eficacia es la capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes aceptable, de manera indirecta, mediante la evaluación de la calidad del virus infeccioso o de la masa antigénica que se produzca, durante

la producción puede realizarse un seguimiento de la concentración objetivo de antígeno que se requieren para lograr una respuesta aceptable. Las pruebas de diagnóstico rápidas, como el ELISA, permiten conocer la producción de antígeno del VDVB. Como alternativa, la calidad de un lote de antígeno se puede determinar por titulación de la cantidad de virus infeccioso que se encuentre presente, aunque ello podría infraestimar la cantidad de antígeno. En el caso de las vacunas inactivadas, la infectividad se evalúa antes de la inactivación; en estas vacunas debe determinarse la cinética de inactivación para establecer un margen de seguridad adecuado que pueda emplearse en los procesos habituales de producción. Al final de la producción, deben llevarse a cabo pruebas en cultivo celular para confirmar que la inactivación se ha completado. Estas pruebas de inocuidad deben incluir un número suficiente de pases y un volumen de inóculo adecuado como para garantizar que se podrían detectar incluso concentraciones de virus infeccioso muy bajas.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se establecen en el Capítulo 1.1.9.

ii) Identidad

Cuando en una instalación que produce múltiples vacunas se propagan varias cepas, las pruebas de identidad deben demostrar que no hay ninguna otra cepa del VDVB.

iii) Seguridad

Las pruebas de seguridad consistirán en detectar toda posible reacción anómala, ya sea local o sistémica, a la vacuna administrada por cualquiera de la(s) vía(s) de vacunación. Se precisan pruebas de seguridad lote a lote a no ser que la seguridad del producto se haya demostrado y esté APROBADA en el expediente de registro y que la producción se lleve a cabo con arreglo a lo establecido en el capítulo 1.1.8.

La prueba de seguridad es distinta de la de inocuidad (véase arriba).

Las vacunas vivas deben demostrar su seguridad en ganado bovino gestante (es decir, que no se transmiten al feto) o bien autorizarse con una advertencia de que no se utilicen en animales gestantes. Las vacunas vivas que contengan cepas citopáticas deben incluir una advertencia del riesgo de inducir la enfermedad de las mucosas en ganado bovino IP.

iv) Potencia del lote

Las vacunas contra la DVB deben demostrar que generan respuestas inmunitarias suficientes cuando se utilicen en su formulación final de acuerdo con las instrucciones que haya publicado el fabricante. Deberá determinarse cuál es la cantidad mínima de virus infeccioso y/o de antígeno necesario para producir una respuesta inmunitaria aceptable. Deben emplearse pruebas *in vitro* para realizar el seguimiento de lotes durante la producción.

2.3. Requisitos para la autorización/registro/licencia

2.3.1. Proceso de fabricación

Para registrar una vacuna, deben presentarse a las autoridades todos los datos relativos a la fabricación de la vacuna y a las pruebas de control de calidad. A no ser que las autoridades especifiquen lo contrario, deben presentarse estos datos relativos a tres lotes consecutivos de vacuna con un volumen que no sea inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

No existe ningún método estándar para fabricar una vacuna contra la DVB, pero pueden aplicarse técnicas convencionales de laboratorio con cultivos celulares estacionarios, rodantes o en suspensión (micro-portadores). Las vacunas inactivadas se pueden preparar mediante métodos convencionales, como la inactivación por etilénimina binaria o por beta-propiolactona (Park & Bolin, 1987). Existen varios adyuvantes que pueden utilizarse.

2.3.2. Requisitos de inocuidad

Deben realizarse pruebas *in vivo* empleando una sola dosis, sobredosis (solo en el caso de las vacunas vivas) y dosis repetidas (teniendo en cuenta el número máximo de dosis para la vacunación primaria y, si es el caso, para la primera revacunación o vacunación de recuerdo),

que contengan la máxima carga de antígeno permitida y, en función de la formulación de la vacuna, el máximo número de cepas vacunales.

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

La inocuidad de la formulación del producto final, tanto en las vacunas vivas como en las inactivadas, debe evaluarse en terneros de corta edad susceptibles que estén libres de anticuerpos maternos y en ganado bovino gestante. Se debe comprobar si presentan reacciones locales tras la administración, y, en el caso de los animales gestantes, si aparecen efectos en el ternero no nacido. Las vacunas vivas atenuadas pueden generar inmunosupresión, y ello podría aumentar la mortalidad. Asimismo, pueden contribuir a la aparición de la enfermedad de las mucosas en animales IP, lo cual conduce a un problema de bienestar animal. Por lo tanto, deberá evitarse la vacunación de animales IP con vacunas vivas atenuadas que contengan VDVB citopático. Las vacunas vivas atenuadas no deben poder transmitirse a animales no vacunados que entren en contacto directo con los vacunados.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas y consideraciones medioambientales

Para confirmar que no hay signos de enfermedad, deben inocularse a terneros de corta edad inóculos víricos que se hayan sometido al menos al número límite de pases especificado para el inóculo en cuestión, y preferiblemente a más pases. Si una vacuna viva atenuada se ha registrado para su uso en animales gestantes, las pruebas de reversión a la virulencia también deberán incluir animales gestantes. Las vacunas vivas atenuadas no deben ser transmisibles a animales no vacunados que hayan entrado en contacto con los vacunados.

iii) Precauciones (peligros)

El VDVB no se considera un peligro para la salud humana. Las buenas prácticas de microbiología deben ser suficientes para manipular el virus en el laboratorio. Una vacuna con virus vivo se considerará inocua para las personas que administren el producto a pesar de que los adyuvantes que lleven las vacunas, vivas o inactivadas, puedan causar daños al ser humano. Los fabricantes deben incluir las advertencias correspondientes de que deberá procurarse asistencia médica en caso de auto-inyección (incluso de adyuvantes, vacunas en emulsión oleosa, conservantes, etc.); dichas advertencias deberán aparecer en la ficha técnica y prospecto del producto para que el personal que lo utilice conozca todos los posibles peligros.

2.3.3. Requisitos de eficacia

La potencia de la vacuna debe determinarse mediante la inoculación a terneros seronegativos y negativos para el virus, y con el seguimiento de la respuesta de anticuerpos. La concentración antigénica se puede determinar mediante un ELISA y ajustarse según corresponda a un nivel estándar para la vacuna en cuestión. No existen protocolos analíticos estandarizados que sean aplicables a todas las vacunas. Los lotes de vacuna viva se pueden analizar determinando el título de la infectividad. Cada lote de producción de vacuna debe someterse a pruebas de potencia y de inocuidad para poder ser liberado. Cuando se utiliza la formulación final de las vacunas contra la DVB de acuerdo con las instrucciones que ha publicado el fabricante (como se indica arriba), debe comprobarse que generan respuestas inmunitarias suficientes.

2.3.4. Vacunas que permiten una estrategia DIVA (detección de infección en animales vacunados)

Hasta la fecha, no existen vacunas comerciales contra el VDVB que permitan una verdadera estrategia DIVA. Se han descrito vacunas experimentales de subunidades que contienen la glucoproteína vírica E2 del VDVB expresada por baculovirus, pero no se comercializan. Ofrecen una expectativa de “vacunas marcadoras” cuando se utilizan junto con una prueba serológica complementaria. También se han descrito vacunas experimentales de ADN de la E2 del VDVB y vacunas de la subunidad E2 del VDVB que se expresan mediante plantas transgénicas y un replicón de alfavirus.

2.3.5. Duración de la inmunidad

Existen pocos datos publicados sobre la duración de los anticuerpos tras la vacunación con un producto comercial. Los protocolos de utilización suelen recomendar un ciclo primario de dos inoculaciones, y revacunaciones anuales. Se dispone de algún dato sobre niveles de anticuerpos que se correlacionan con la protección contra infecciones respiratorias (Bolin y

Ridpath, 1995; Howard *et al.*, 1989) o intrauterinas (Brownlie *et al.*, 1995). No obstante, existen muchas formulaciones comerciales distintas e implican gran variedad de adyuvantes que podrían comportar distintos periodos de eficacia. En consecuencia, la duración de la inmunidad dependerá de cada producto comercial y se determinará a partir de pruebas de exposición que se realizarán al final del periodo de inmunidad propuesto.

2.3.6. Estabilidad

No existen directrices aceptadas relativas a la estabilidad de las vacunas contra la DVB, pero puede considerarse que la vacuna con virus atenuado (liofilizada) conserva su potencia durante al menos 1 año si se conserva a 4°C. La vacuna con virus inactivado podría tener un periodo de validez más largo si se mantiene a 4°C. Si se aplican temperaturas inferiores, se podría prolongar el periodo de validez de cualquier tipo de vacuna, aunque los adyuvantes de las vacunas muertas pueden impedirlo. Los antígenos a granel que no se hayan procesado hasta incorporarlos en la vacuna final pueden guardarse congelados sin problema a bajas temperaturas, pero antes de incorporarlos a un lote de vacuna, deberá controlarse la calidad de los mismos con pruebas *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- BAKER J.C. (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet. Clin. North. Am. – Food Animal Practice*, **11**, 425–445.
- BAUERMANN F.V., FLORES E.F. & RIDPATH J.F. (2012). Antigenic relationships between bovine viral diarrhea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. *J. Vet. Diagn. Invest.* (official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians), **24**, 253–261.
- BAUERMANN F.V., HARMON A., FLORES E.F., FALKENBERG S.M., REECY J.M. & RIDPATH J.F. (2013). *In vitro* neutralization of HoBi-like viruses by antibodies in serum of cattle immunized with inactivated or modified live vaccines of bovine viral diarrhea viruses 1 and 2. *Vet. Microbiol.*, **166**, 242–245.
- BOLIN S.R. & RIDPATH J.F. (1992). Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. *Am. J. Vet. Res.*, **53**, 2157–2163.
- BOLIN S.R. & RIDPATH J.F. (1995). Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhea virus in calves. *Am. J. Vet. Res.*, **56**, 755–759.
- BROWNLIE J. (1985). Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea/mucosal disease complex in cattle. *In Practice*, **7**, 195–202.
- BROWNLIE J. (1990). The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **9**, 43–59.
- BROWNLIE J., CLARKE M.C., HOOPER L.B. & BELL G.D. (1995). Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. *Vet. Rec.*, **137**, 58–62.
- CORNISH T.E., VAN OLPHEN A.L., CAVENDER J.L., EDWARDS J.M., JAEGER P.T., VIEYRA L.L., WOODARD L.F., MILLER D.R. & O'TOOLE D. (2005). Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 110–117.
- DUFFELL S.J. & HARKNESS J.W. (1985). Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.*, **117**, 240–245.
- EDWARDS S. (1990). The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **9**, 115–130.
- FRAY M.D., MANN G.E., BLEACH E.C.L., KNIGHT P.G., CLARKE M.C. & CHARLESTON B. (2002). Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Reproduction*, **123**, 281–289.
- FULTON R.W., SALIKI J.T., BURGE L.J., DOFFAY J.M., BOLIN S.R., MAES R.K., BAKER J.C. & FREY M.L. (1997). Neutralizing antibodies to type-1 and type-2 bovine viral diarrhea viruses – detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **4**, 380–383.

- GIVENS M.D., RIDDELL K.P., WALZ P.H., RHOADES J., HARLAND R., ZHANG Y., GALIK P.K., BRODERSEN B.W., COCHRAN A.M., BROCK K.V., CARSON R.L. & STRINGFELLOW D.A. (2007). Noncytopathic bovine viral diarrhea virus can persist in testicular tissue after vaccination of peri-pubertal bulls but prevents subsequent infection. *Vaccine*, **25**, 867–876.
- HOFFMANN B., DEPNER K., SCHIRRMIEIER H. & BEER M. (2006). A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J. Virol. Methods*, **136**, 200–209.
- HOUE H., BAKER J.C., MAES R.K., RUEGG P.L. & LLOYD J.W. (1995). Application of antibody titers against bovine viral diarrhea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**, 327–332.
- HOWARD C.J., CLARKE M.C. & BROWNLIE J. (1989). Protection against respiratory infection with bovine virus diarrhoea virus by passively acquired antibody. *Vet. Microbiol.*, **19**, 195–203.
- LETELLIER C. & KERKHOFS P. (2003). Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus. *J. Virol. Methods*, **114**, 21–27.
- MCGOLDRICK A., BENSAUDE E., IBATA G., SHARP G. & PATON D. J. (1999). Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *J. Virol. Methods*, **79**, 85–95.
- MCGOWAN M.R. & KIRKLAND P.D. (1995). Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *Br. Vet. J.*, **151**, 263–270.
- MEYLING A. (1984). Detection of BVD virus in viraemic cattle by an indirect immunoperoxidase technique. *In: Recent Advances in Virus Diagnosis (CEC Seminar)*, McNulty M.S. & McFerran J.B., eds. Martinus Nijhoff, Belfast, UK, 37–46.
- MOENNIG V. & LIESS B. (1995). Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. *Vet. Clin. North. Am.*, **11**, 477–487.
- MOENNIG V., HOUE H. & LINDBERG A. (2005). BVD control in Europe: current status and perspectives. *Anim. Health Res. Rev.*, **6**, 63–74.
- NISKANEN R. (1993). 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**, 341–344.
- PARK B.K. & BOLIN S.R. (1987). Molecular changes of bovine viral diarrhea virus polypeptides treated with binary ethylenimine, beta-propiolactone and formalin. *Res. Rep. Rural Dev. Admin. (L&V) Korea*, **29**, 99–103.
- PATON D.J., SANDS J.J. LOWINGS J.P., SMITH J.E., IBATA G., EDWARDS S. (1995). A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing. *Vet. Res.*, **26**, 92–109.
- VILCEK S., PATON D.J., DURKOVIC B., STROJNY L., IBATA G., MOUSSA A., LOITSCH A., ROSSMANITH W., VEGA S., SCICLUNA M.T. & PALFI V. (2001). Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.*, **146**, 99–115.
- VOGES H., HORNER G.W., ROWE S. & WELLENBERG G.J. (1998). Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viremic bull. *Vet. Microbiol.*, **61**, 165–175.
- ZIMMER G., SCHOUSTRA W. & GRAAT E. A.M. (2002). Predictive values of serum and bulk milk sampling for the presence of persistently infected BVDV carriers in dairy herds. *Res. Vet. Sci.*, **72**, 75–82.

*

* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la diarrea viral bovina
(puede consultarse la página web de la OIE:

<https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la diarrea viral bovina

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2015.