

CAPÍTULO 2.4.8

DIARREA VIRAL BOVINA**RESUMEN**

El ganado bovino es susceptible de infectarse con el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) en todas las edades (ver también el Capítulo 4.3 en el Código Sanitario para los animales terrestres). Este virus está extendido por todo el mundo. Los síntomas clínicos varían desde un carácter subclínico hasta una enfermedad fulminante de desenlace fatal llamada enfermedad de las mucosas. Generalmente, las infecciones agudas pueden producir una diarrea pasajera o neumonía, en forma de brotes que afectan a grupos de animales. Se han descrito formas agudas de la enfermedad con una mortalidad alta, asociadas a menudo, aunque no siempre, a un síndrome hemorrágico. Sin embargo, la mayor parte de las infecciones de los terneros jóvenes son leves y pasan clínicamente inadvertidas. El virus se difunde principalmente por contacto entre el ganado. La transmisión vertical juega un papel importante en su epidemiología y patogenia.

Las infecciones del feto bovino pueden producir abortos, partos con terneros muertos, efectos teratogénicos o una infección persistente en el ternero neonato. Los animales con viremia persistente pueden nacer como terneros débiles o pueden tener la apariencia de terneros normales sanos que pasan clínicamente desapercibidos. Algunos de estos animales pueden desarrollar posteriormente la enfermedad de las mucosas con anorexia, erosiones gastrointestinales y diarrea profusa, lo que les conduce invariablemente a la muerte. La enfermedad de las mucosas puede producirse solo en animales infectados persistentemente.

Es importante evitar el comercio de animales con viremia. Generalmente, se considera que el ganado serológicamente positivo, sin viremia está "sano", siempre que no esté grávido. El ganado grávido que es positivo a los anticuerpos y que gesta fetos infectados persistentemente es transmisor importante del virus dentro de los rebaños. Alrededor del 15% de los animales con viremia persistente tienen anticuerpos frente a la proteína NS/2, y un porcentaje más bajo, a la glicoproteína E2. Sin embargo, el ser seropositivo no equivale a "estar sano". Se cree que las infecciones latentes no se producen generalmente después de la recuperación de infecciones agudas, aunque el semen de animales con infección aguda y, ocasionalmente, de animales recuperados, puede ser sospechoso.

Identificación del agente: *El BVDV es un pestivirus dentro de la familia Flaviviridae y está muy relacionado con los virus de la peste porcina clásica y de la enfermedad bovina de la frontera. El BVDV se presenta en dos formas: no citopatogénico y citopatogénico. Hay dos genotipos antigénicamente distintos (los tipos 1 y 2), y los aislamientos de virus dentro de estos grupos muestran una considerable diversidad biológica y antigénica.*

Los animales sanos con viremia persistente a causa de infecciones congénitas se pueden identificar fácilmente aislando el virus no citopatogénico en cultivos celulares de sangre o de suero. Es necesario usar un método de inmunomarcaje para detectar el crecimiento del virus en los cultivos. Existen también métodos alternativos basados en la detección directa del antígeno vírico o de ARN vírico en leucocitos. Se debería confirmar la persistencia del virus mediante nuevo muestreo después de un intervalo de al menos 3 semanas. Generalmente, estos animales no tienen anticuerpos contra el BVDV o niveles muy bajos.

La viremia en casos agudos es pasajera y puede ser difícil de detectar. En los casos mortales de enfermedad hemorrágica, se puede aislar el virus de tejidos post mórtem. La confirmación de la enfermedad mucosal se puede hacer mediante aislamiento del biotipo citopatogénico del BVDV, particularmente de tejidos intestinales. También se puede detectar el virus no citopatogénico, especialmente en sangre.

Pruebas serológicas: La infección aguda con el BVDV se confirma mejor demostrando la seroconversión mediante el uso de muestras pareadas secuenciales de varios animales en el grupo. El muestreo pareado (muestras de casos agudos y de convalecientes) debería hacerse con una separación mínima de 21 días, y las muestras deberían analizarse en paralelo. El enzimoimmunoensayo y la prueba de neutralización del virus son las pruebas utilizadas más ampliamente.

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: No existe una vacuna estándar para DVB, pero se dispone de varias preparaciones comerciales. La vacuna con virus vivo modificado no debería administrarse a ganado gestante (o a sus terneros lactantes) debido al riesgo de infección a través de la placenta. También existe el riesgo de inducir la enfermedad de las mucosas en animales infectados persistentemente. Generalmente, las vacunas con virus muertos requieren una vacunación de recuerdo. La vacuna ideal debería poder prevenir la infección transplacentaria en vacas gestantes.

El BVDV supone un riesgo particularmente importante en la transferencia de embriones y la fabricación de productos biológicos para uso veterinario debido a la alta frecuencia de contaminación de los lotes de suero fetal bovino, utilizados como suplemento de los medios de cultivo. Las vacas sometidas a transferencia de embriones corren el riesgo de contraer la infección.

A. INTRODUCCIÓN

El virus de la diarrea viral bovina (BVDV) es un pestivirus de la familia de las *Flaviviridae* y está muy relacionado con los virus de la peste porcina clásica y de la enfermedad ovina de la frontera (23). Existen dos genotipos antigénicamente distintos de BVDV, tipos 1 y 2, con subdivisiones suplementarias distinguibles mediante análisis genético (74). Los dos genotipos se pueden diferenciar uno de otro, y de otros pestivirus, por anticuerpos monoclonales (MAbs) dirigidos contra las glicoproteínas principales E2 y E^{RNS}, o mediante análisis genético (57, 60, 65, 68). La reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR) permite la tipificación de virus directamente de las muestras de sangre (33). Generalmente, el virus tipo 1 es el más común aunque se ha descrito que la prevalencia del tipo 2 es casi tan alta como la del tipo 1 en Norteamérica. El BVDV de ambos genotipos puede darse en formas no citopatogénicas y citopatogénicas (biotipos), clasificadas en función de si produce o no cambios visibles en los cultivos celulares. Generalmente, el que circula en las poblaciones de ganado es el biotipo no citopatogénico. Cada biotipo tiene un papel específico en una variedad de síndromes clínicos – infecciones crónicas, agudas y congénitas (5,11). Los virus del tipo 2 son generalmente no citopatogénicos y se han asociado con brotes de infección aguda severa y el síndrome hemorrágico (16). No obstante, los virus del tipo 2 recientemente aislados en el Reino Unido se han asociado con una enfermedad indistinguible de la que está relacionada con los virus del tipo 1 que se han aislado con mayor frecuencia. Algunos aislamientos del tipo 1 se han asociado con brotes de la enfermedad muy graves y fatales en el ganado adulto (20) de apariencia clínica no grave, y las infecciones clínicamente asintomáticas son comunes con ambos genotipos.

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. (56).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

a) Infecciones agudas

Las infecciones agudas del ganado bovino se producen particularmente en animales jóvenes, y pueden ser clínicamente no aparentes o asociadas con diarrea (1). Los animales afectados pueden estar predispuestos a infecciones secundarias, por ejemplo las que desembocan en la enfermedad del transporte, debido quizás a un efecto inmunosupresor del virus. Los toros pueden sufrir un descenso temporal de fertilidad y mostrar una excreción pasajera del virus a través del semen (54, 62). Las vacas pueden padecer también infertilidad, asociada probablemente con alteraciones de la función ovárica (35) y de las secreciones de gonadotropina y progesterona (30). Durante las infecciones agudas, se puede detectar una viremia breve y producirse la excreción nasal del virus. También puede haber una leucopenia transitoria, trombocitopenia o respuesta febril, pero estas manifestaciones varían mucho entre distintos animales. El método más seguro para diagnosticar una infección previa es la presencia de una respuesta serológica. El cuadro clínico es generalmente de alta morbilidad y baja mortalidad, aunque, a veces, se observan características más graves (11, 12). En particular, los brotes de la forma grave de la enfermedad aguda con lesiones hemorrágicas, trombocitopenia y elevada mortalidad, se han descrito esporádicamente en algunos países (1, 6) y la infección con los virus de Tipo 2 se ha demostrado que causa, en particular, una función

plaquetaria alterada (68, 76). Otros brotes agudos pueden mostrar fiebre, neumonía, diarrea y muerte súbita en cualquier grupo de edad, con síntomas hemorrágicos (16).

b) Infección congénita

Si un virus no citopatogénico infecta al feto bovino, puede producir el aborto, partos en los que el ternero nace muerto, efectos teratogénicos o infección congénita que persiste en el ternero neonato (1, 11, 26, 50, 55). A menudo resulta difícil establecer la confirmación de que el aborto está causado por el BVDV (61, 69), pero el virus puede aislarse del tejido fetal en algunos casos, o se puede demostrar la existencia de un antígeno o el genoma vírico. Se debería hacer un intento para detectar anticuerpos específicos en muestras de fluidos o de suero fetal, o en el sobrenadante de una suspensión de tejidos. Los partos en los que el ternero nace muerto o los efectos teratogénicos se pueden asociar con una respuesta inmune fetal activa al virus durante el periodo entre la mitad y el final de la gestación. La madre tendrá a menudo títulos altos de anticuerpos (>1/2.000) al BVDV, lo que sugiere una infección fetal y es debido probablemente a que el feto presenta una exposición vírica prolongada (47).

Aunque la infección congénita con BVDV conduce a menudo al aborto, esto no se detecta siempre a nivel de campo. La infección durante el primer tercio del periodo de gestación puede dar como resultado el aborto de un feto pequeño que pase desapercibido para el ganadero. La vaca vuelve a su rutina normal y la incapacidad de mantener la gestación se clasifica como un ejemplo de muerte embrionaria prematura. Otra posible consecuencia de la infección es la muerte y posterior reabsorción de los fluidos del feto, lo que produce su momificación. Frecuentemente, se observa que los fetos abortados tienen un edema subcutáneo y grandes efusiones pleurales y peritoneales. También pueden existir anomalías congénitas que producen retrasos en el crecimiento y defectos selectivos en el sistema nervioso central (SNC), tales como hipoplasia cerebral y dismielinización (62, 70), y defectos en el ojo, como cataratas y atrofia de la retina. A veces hay defectos esqueléticos, el más avanzado de los cuales es la artrogriposis.

Se ha descrito que los terneros que nacen muertos son una secuela normal de las infecciones congénitas. En general, antes de los 150 días de gestación, los terneros parecen estar totalmente desarrollados en el momento del parto, pero no sobreviven. No obstante, se ha descrito que, en muchos casos, los virus de la DVB no se pueden aislar de estos animales y que son negativos a la PCR. Si la infección ocurre después de 150 días de gestación, se desarrollará el sistema inmune del feto y la infección del feto desembocará en una respuesta de los anticuerpos y en el nacimiento de un ternero normal.

c) Infección persistente

Cuando se producen infecciones en el feto antes de aproximadamente 110 días de gestación y antes de la inmunocompetencia, el ternero puede nacer con una infección persistente. La identificación de estos animales se hace mediante la detección del BVDV no citopatogénico en la sangre. El virus puede identificarse en la piel por inmunohistoquímica. Los animales con viremia persistente carecen también de anticuerpos específicos y el diagnóstico en el ternero joven, de hasta aproximadamente 3 meses, puede ser incorrecto por la presencia de anticuerpos maternos frente BVDV. Los anticuerpos maternos también pueden interferir con el aislamiento del virus. En animales mayores con infección persistente, pueden estar presentes en niveles bajos de anticuerpos debido a su habilidad para seroconvertir a cepas de BVDV (incluyendo vacunas) "heterólogas" (antigénicamente diferente) del virus persistente (12). Para confirmar un diagnóstico de infección persistente, los animales deben de volver a someterse a pruebas después de un intervalo de, al menos, 3 semanas.

Las lesiones en el ternero virémico son no patognomónicas. Dependiendo del tiempo de gestación en el que se produce la infección, las lesiones pueden estar totalmente determinadas por los efectos del virus en la diferenciación celular del feto, por la maduración del sistema inmune del feto en desarrollo o por ambas cosas al mismo tiempo. Los síntomas clínicos varían desde un animal sano y aparentemente normal a un ternero débil y con dificultad para mantenerse en pie y mamar. Estos últimos terneros pueden mostrar defectos en el SNC, como temblores musculares, incoordinación y ceguera. A menudo mueren en días cercanos a su nacimiento, contribuyendo, por tanto, al "síndrome del ternero débil".

Aproximadamente entre el 1 y el 2% del ganado de una población está infectado de forma permanente; muchos terneros virémicos sobreviven hasta la madurez sexual y se retienen para reproducción. Los terneros nacidos de estas madres infectadas son siempre persistentemente virémicos, y a menudo son débiles en el momento de nacer y no se desarrollan. Los animales virémicos persistentes son una fuente continua de virus infeccioso para el resto del ganado, y por tanto se requiere su identificación rápida y su retirada de la manada. En los animales para comercio, se debe comprobar la ausencia de viremia DVB persistente.

Los toros con infección persistente generalmente tienen un semen muy infeccioso de baja calidad y, en consecuencia, una fertilidad reducida (41, 45, 67). Todos los toros destinados a inseminación natural o artificial deberían ser sometidos a pruebas para detectar infección persistente de DVB.

Una circunstancia ocasional, posiblemente causado por la infección aguda durante la pubertad, puede ser la infección permanente de los testículos y, por tanto, en toros fuertemente seropositivos (59, 75). Este fenómeno también se ha observado tras la vacunación con un virus atenuado (34). Las hembras usadas como receptoras de embriones deberían ser siempre negativas a la viremia de DVB antes de su primer uso. Las vacas donantes infectadas persistentemente con el BVDV representan también una fuente de infección potencial, ya que los ovocitos sin zona pelúcida intacta se muestran susceptibles a la infección *in vitro* (65, 73). Sin embargo, un estudio limitado de dos animales infectados persistentemente reveló que la mayoría de los ovocitos eran negativos para BVDV (63, 73). Los embriones también pueden resultar contaminados después de una infección aguda del donante (3). Los productos biológicos utilizados para técnicas de fertilización *in vitro* (suero bovino, cultivos celulares bovinos) tienen un alto riesgo de contaminación y deberían examinarse para detectar BVDV (9). Incidentes recientes de introducción aparente del virus a través de tales técnicas (24, 43, 48) han puesto de manifiesto este riesgo. Se considera esencial que los suplementos de suero utilizados en los medios de cultivo se esterilicen como se detalla en el artículo 3.3.1.5 del *Código sanitario para los animales terrestres, de la OIE*, y como se resume en la sección B.1.a. de este capítulo. Los países importadores pueden pedir pruebas adicionales para confirmar la esterilización, detalladas en el artículo 3.3.1.6 del referido *Código*.

d) Enfermedad de las mucosas

Se ha descrito que los animales persistentemente virémicos pueden padecer la enfermedad de las mucosas (11); sin embargo, los casos son muy raros. Se ha demostrado que este síndrome está asociado con la presencia del biotipo citopatogénico, que puede surgir bien por superinfección (5, 14), recombinación entre biotipos no citopatogénicos, o por mutación del biotipo persistente (5, 50). Consecuentemente, el diagnóstico confirmativo de la enfermedad de las mucosas debería incluir el aislamiento del virus citopatogénico del ganado afectado. Este biotipo puede a veces aislarse de la sangre, pero se puede recuperar más repetidamente de otros tejidos, en particular del tejido intestinal y de las placas de Peyer (17). El aislamiento del virus también puede realizarse fácilmente del bazo. Este órgano es fácil de recoger y raras veces es tóxico para el cultivo de células después de su preparación para el aislamiento vírico. El aislamiento de las muestras de intestino puede resultar difícil si se ha producido autólisis; en este caso deberían probarse suspensiones de nódulos linfáticos o amígdalas. El virus no citopatogénico puede también detectarse, particularmente en la sangre o en órganos asociados a la sangre. Para detectar antígenos víricos por inmunofluorescencia o marcadores con inmunoperoxidasa se pueden teñir cortes de tejido congelado de casos de enfermedad de las mucosas.

Esta enfermedad es invariablemente mortal. Su aparición puede ser tan rápida que los primeros síntomas que se ven sean los animales muertos o moribundos. Sin embargo, es más común que los animales se vuelvan anoréxicos durante un periodo de varios días, en los que se les ve apáticos, y con signos de dolor abdominal. Pueden desarrollar una diarrea profusa y perder rápidamente peso. Se pueden apreciar a menudo erosiones en la boca, particularmente a lo largo del margen gingival. Se produce lacrimación y salivación excesiva. Generalmente, los casos de enfermedad que afecten a las mucosas son esporádicos y raros.

El examen post mórtem revela erosiones en varias partes de la mucosa a lo largo del tracto gastrointestinal. Las más llamativas son las que se encuentran por encima de las placas linfoides de Peyer en el intestino delgado y en los nódulos linfoides ileocecales. En un examen histológico hay una clara demostración de destrucción del tejido linfoide asociado al intestino. La mayoría de las células linfoides de las placas de Peyer se lisan y reemplazan por células inflamatorias, restos y células del epitelio superior colapsado.

La infección aguda grave por DVB puede ser clínicamente similar a la enfermedad de las mucosas y producir confusión, particularmente cuando están afectados varios animales. La enfermedad de las mucosas puede aparecer entre poblaciones de animales infectados persistentemente cuando se lleva a cabo la sincronización del celo. La diferenciación requiere un examen cuidadoso de historias clínicas y pruebas de detección de anticuerpos así como de antígenos o de virus entre los animales infectados y los recuperados. La seroconversión entre animales recuperados es indicativa de infección aguda, mientras que resultados positivos a dos antígenos o a virus con las muestras de un animal infectado, tomadas con una separación de 3 semanas, constituye un diagnóstico de la enfermedad en las mucosas. Generalmente, esos animales son negativos a anticuerpos, aunque a veces se pueden detectar niveles bajos de anticuerpos.

1. Identificación del agente (prueba prescrita para el comercio internacional)

Todos los métodos probados deben validarse sobre poblaciones de ganado infectado y no infectado, incluyendo animales con viremias de baja y de alta titulación. Debe demostrarse que los métodos basados en ensayos por fijación de MAb o en reconocimiento del ácido nucleico detectan el espectro completo de diversidad antigénica y genética encontrada entre virus DVB. Hay dos Laboratorios de Referencia de la OIE para la DVB (véase el

cuadro en la parte 3 de este *Manual*); los laboratorios de referencia para la peste porcina clásica pueden ofrecer también asesoramiento.

a) Aislamiento del virus

El virus puede aislarse en monocapas de algunos cultivos celulares bovinos (e.g. riñón, pulmones, testículos o cornetes). El crecimiento de ambos biotipos es generalmente satisfactorio. El BVDV no citopatogénico es un contaminante común de tejidos bovinos frescos, y ha de comprobarse por pruebas regulares que los cultivos celulares están libres de virus contaminantes (8, 28). Los cultivos primarios o secundarios deben congelarse como suspensiones de células en nitrógeno líquido. Estos pueden probarse en una serie de pasos, o sembrarse en otras células susceptibles y comprobarse antes del uso rutinario. Tales problemas pueden superarse mediante el uso de líneas celulares continuas, que pueden obtenerse sin el DVB (8).

El suero bovino fetal que se selecciona para uso en cultivo celular debe estar también libre no solo de virus, sino también, del anticuerpo neutralizante frente a BVDV (28). 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 bovino fetal dan positivo por PCR incluso después de que el virus ha sido inactivado por irradiación. Cuando se considere apropiado, el suero de caballo se puede sustituir por suero bovino fetal, aunque a menudo se encuentra que es menos adecuado para promocionar el crecimiento celular.

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 post mortem deben prepararse por métodos estándar. También se puede examinar el semen, pero es preferible una muestra de sangre del toro donante si es posible obtenerla. Existe un informe de una excreción atípica y persistente de BVDV en semen de un toro en fase no virémica (75). El semen puro es citotóxico y debe diluirse en medio de cultivo. En general, el semen completo puede inocularse directamente sobre las monocapas celulares, pero ocasionalmente puede causar citotoxicidad. Por estas razones, es importante controlar el estado de las células por examen microscópico a intervalos durante la incubación.

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. Esto puede incluir uno o más paso(s) *in-vitro*. Para detectar el crecimiento de virus no citopatogénico, se usan los métodos convencionales de aislamiento de virus, con la adición de un paso final de inmunomarcado (fluorescencia o enzimático). Por tanto los cultivos en tubo deberían incluir cubres sueltos, mientras que los cultivos en placa pueden fijarse y marcarse directamente en la placa. A continuación se incluyen ejemplos.

- **Método de la inmunoperoxidasa en microplaca para análisis masivo de detección de virus en muestras de suero (54)**
 - i) Se colocan en cada uno de los 96 pocillos de las microplacas de cultivos de tejido 10 µl de la muestra de suero. Esto se repite para cada muestra. Se incluyen controles positivos y negativos conocidos.
 - ii) Se añaden a todos los pocillos 100 µl de una suspensión de células con 150.000 células/ml en medio sin suero fetal bovino (FCS). NB: La propia muestra actúa como suplemento del crecimiento celular. Si se prueban otras muestras que no sean sueros, se usa un medio con 10% FCS que esté libre de anticuerpos frente a los pestivirus de los rumiantes.
 - iii) Se incuba la placa a 37°C durante 4 días, en una atmósfera de CO₂ al 5% o con la placa sellada.
 - iv) Cada pocillo se examina microscópicamente para detectar evidencia de efecto citopático (ECP) o síntomas de citotoxicidad.
 - v) Se vacía la placa suavemente mediante inversión y se enjuaga con solución salina tamponada con fosfato (PBS).
 - vi) Se fija la placa como se indica a continuación: se sumerge en un baño con acetona al 20% en PBS, se vacía inmediatamente, y se transfiere después a un baño fresco con acetona al 20% en PBS durante 10 minutos. Se deja escurrir la placa totalmente y se retira tanto fluido como sea posible mediante empapado con papel y secado. Se seca la placa por completo durante al menos 3 horas a una temperatura de 25–30°C (e.g. usando calor radiante de una lámpara de la mesa de trabajo). NB: el secado es parte del proceso de fijación.
 - vii) Los métodos de fijación alternativa incluyen paraformaldehído o calor (véase el capítulo 2.8.3. Peste porcina clásica, sección B.2.b.viii).
 - viii) Las células fijadas se enjuagan añadiendo PBS a todos los pocillos.

- ix) Se secan los pocillos y se añade el anticuerpo contra DVB (50 µl) a todos los pocillos a una dilución predeterminada en PBS que contiene 1% Tween 80 (PBST) y 5% de suero de caballo. (El suero de caballo puede añadirse para reducir el marcaje inespecífico). La placa se incuba a 37°C durante 15 minutos.
- x) Se vacía la placa y se lava tres veces en PBST.
- xi) La placa se seca y se añade un suero anti-especie apropiado conjugado a peroxidasa a una dilución predeterminada en PBST (50µl por pocillo) durante 15 minutos a 37°C.
- xii) La placa se vacía y se lava tres veces in PBST.
- xiii) Se añade peróxido de hidrógeno recién preparado como sustrato con un cromógeno adecuado, por ejemplo 3-amino-9-etil carbazol (AEC). La solución base es: AEC (0,1 g) disuelto en dimetil formamida (15 ml). Para empleo, se añade a solución base (0,3 ml) a 0,05 M de tampón acetato (5 ml, pH 5,0), y posteriormente H₂O₂ al 30% (se añaden 5 µl). Se puede hacer un sustrato alternativo compuesto de 9 mg de tetrahidrocloruro de diaminobenzidina y 6 mg de perborato sódico tetrahidratado disuelto en 15 ml de PBS. Aunque la tinción no es tan intensa, estos productos químicos tienen la ventaja de que pueden enviarse por vía aérea.
- xiv) Se examina la placa microscópicamente. Las células positivas para el virus muestran tinción citoplásmica de color marrón rojizo.

- **Método en tubo para suspensiones de tejido o capa leucocitaria, o muestras de semen**

NB: Este método puede adaptarse convenientemente a placas de plástico de 24 pocillos.

- i) Se agrupan las muestras de tejido y se hace una suspensión al 10% en medio de cultivo. Se centrifuga y se retiran los restos. El semen puro se diluye al 1/10 en medio de cultivo.
- ii) Se inoculan cultivos en tubos de ensayo (con cubres sueltos) que contienen monocapas confluentes o subconfluentes de células bovinas susceptibles con 0,1 ml de cada muestra. El cultivo se deja absorber durante 1 hora a 37°C.
- iii) Se lava el cultivo con 1 ml de medio; después se desecha y se añade 1 ml de medio de mantenimiento de cultivo.
- iv) El cultivo se incuba durante 4–5 días a 37°C y se examina microscópicamente para detectar ECP o las alteraciones de la citotoxicidad.
- v) El cultivo puede ser congelado y descongelado para pasarse a cultivos frescos, o se puede retirar el cubre, fijarlo con acetona y teñirlo con un conjugado de inmunofluorescencia directa para BVDV. En este caso, se debe examinar en un microscopio de fluorescencia para observar la característica fluorescencia citoplásmica difusa de los pestivirus.

Alternativamente, los cultivos pueden recogerse por congelación/descongelación y pasarse a placas microtituladas para cultivo y para la tinción por el método de la inmunoperoxidasa (véase la sección anterior sobre el método de la inmunoperoxidasa en microplaca para examen masivo de muestras de suero) o por el método de inmunofluorescencia descrito en este capítulo.

b) Enzimoimmunoensayo para la detección del antígeno

Se han publicado varios métodos de enzimoimmunoensayo (ELISA) para detección del antígeno (por ejemplo, ref. 29) y hay algunos kits comercializados. La mayoría están basados en el principio del ELISA tipo sandwich, con un anticuerpo de captura ligado a la fase sólida, y un detector de anticuerpo conjugado a un sistema de señal, tal como la peroxidasa. Se describen ambos sistemas basados en anticuerpos monoclonales y policlonales. La prueba es adecuada para la detección de animales infectados persistentemente y por lo general mide el antígeno de DVB en lisados de leucocitos periféricos de la sangre; la nueva generación de los ELISA de captura de antígenos (ELISA de captura ERNS) son capaces de detectar antígeno de DVB en la sangre así como en muestras de plasma o suero. El mejor método da una sensibilidad similar al aislamiento del virus, y puede ser el de elección en aquellos casos raros donde una viremia persistente se combina con seropositividad. El ELISA puede tener una baja sensibilidad en presencia de anticuerpos contra el BVDV del calostro. En presencia de anticuerpos, se debería usar la PCR con transcripción inversa (RT-PCR), ya que es el método de detección más sensible en esta circunstancia. El antígeno ELISA parece ser menos útil para la detección del virus en infecciones agudas de DVB.

Los ELISA NS2-3 pueden ser menos efectivos en terneros jóvenes que tienen una sensibilidad baja y en el calostro debido a la presencia de anticuerpos maternos frente al BVDV. Se debe utilizar la transcripción inversa PCR (RT-PCR) puesto que es probablemente el método de detección más sensible para esta circunstancia, pero también se ha demostrado que el ERNS ELISA es una prueba sensible y fiable sobre todo cuando se utiliza con muestras obtenidas mediante una incisión en la oreja (18).

c) Inmunohistoquímica

Los métodos de marcaje con enzima son útiles para detectar antígeno de BVDV en cortes de tejido (69, 77), particularmente cuando se dispone de MAbs adecuados. Es importante que los reactivos y procedimientos usados estén completamente validados, y que se elimine la reactividad inespecífica. Para ganado infectado persistentemente puede usarse casi cualquier tejido, pero se obtienen mejores resultados con nódulos linfáticos, tiroides, piel, cerebro, cuarta cavidad del rumen y placenta. Se ha demostrado que las biopsias de la piel, como las obtenidas por incisión en la oreja, son útiles para el diagnóstico *in-vivo* de la infección persistente por BDV (17).

d) Detección del ácido nucleico

El método PCR-RT se puede adaptar a la detección de ARN vírico de DVB para fines de diagnóstico (10, 36, 40, 42, 44, 46). Esto puede tener un valor especial cuando se sospecha contaminación vírica de bajo nivel, por ejemplo en lotes sospechosos de FCS, o en productos biológicos tales como vacunas (38). Se necesita precaución en la interpretación de los resultados, ya que la detección de ARN vírico no implica *per se* que el virus infeccioso esté presente. Se puede utilizar la PCR múltiple para amplificar y tipificar el virus de cultivo celular, o de muestras de sangre, originando productos de PCR de diferente tamaño (33). Las últimas metodologías incorporan el uso de sondas de ADN marcadas con fluorescencia, que confirman la identidad del producto de la PCR, proporcionan lectura automatizada y permiten también diferenciar entre pestivirus en tiempo real (53). Se deben evitar las pruebas para detectar virus después de la inoculación de cultivos celulares utilizando la PCR ya que pueden dar resultados positivos falsos si se ha usado suero fetal bovino contaminado con los pestivirus de los rumiantes en el medio de crecimiento. Se deben seleccionar cebadores para regiones conservadas del genoma, a ser posible, como la región 5'-no codificante, o la NS3 (gen de la p80). Las pruebas moleculares son propensas a la contaminación del personal no entrenado adecuadamente. Consecuentemente, se deberían tomar precauciones rigurosas para evitar la contaminación por ADN en el sistema de la prueba, y se deben aumentar los controles rigurosos (véase el capítulo 1.1.5, *Validación y control de calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas*).

La técnica RT-PCR también es lo suficientemente sensible como para permitir la detección de vacas lactantes con infección persistente en una manada de hasta 100 animales o más, analizando las células somáticas en la leche completa (25, 58, 66). Un resultado positivo indica que al menos uno de tales animales está presente en la manada ordeñada. Se necesita seguimiento mediante aislamiento del virus o pruebas de detección del antígeno para identificar al individuo (s).

Se puede detectar el ácido nucleico vírico en tejidos mediante hibridación *in situ* con ribo-sondas ligadas a enzima (22). Esta es una técnica sensible que se puede aplicar a tejido incluido en parafina y fijado con formalina, permitiendo de esa forma, un análisis retrospectivo. En este contexto, se ha descrito la extracción del ácido nucleico y la RT-PCR con tales muestras, permitiendo también el análisis filogenético (2).

2. Pruebas serológicas

Se pueden detectar anticuerpos contra el BVDV en sueros de ganado mediante pruebas estándar de neutralización de virus (NV) o mediante ELISA, utilizando uno de los varios métodos publicados (27, 40, 43, 55, 63). Deben incluirse en cada prueba sueros control positivos y negativos. Estos deberían dar resultados dentro de límites predeterminado para que la prueba se considere válida. Un ELISA para detectar anticuerpos en muestras de leche completa puede proporcionar una indicación del estado de DVB en una manada (52, 58). Un valor de ELISA de 1.0 o más unidades de absorbancia indica una alta probabilidad de que la manada ha estado expuesta al BVDV en un pasado reciente, muy probablemente debido a la presencia de uno o más animales con viremia persistente. Como contraste, un valor muy bajo o negativo ($\leq 0,2$) indica que es improbable que haya animales persistentemente virémicos. Se ha sugerido una categorización adicional para valores intermedios, pero depende del sistema de explotación en uso. En al menos un estudio, se ha demostrado que los valores ELISA son un indicador poco fiable de la presencia en explotaciones de animales persistentemente infectados (70), debido a las diferentes formas de explotación (78) y a la presencia de antígeno vírico en la leche entera, que pueden interferir con el ensayo de anticuerpos (60). Se ha sugerido que la determinación de la presencia de anticuerpos en un número pequeño de ganado joven (9–18 meses) es un indicador de una exposición reciente al BVDV (39), pero estos son dependientes igualmente del grado de contacto entre diferentes grupos de animales en el rebaño. Se pueden utilizar "pruebas puntuales" rápidas en un examen inicial como parte del control de DVB y de programas de erradicación (49).

a) Pruebas de neutralización del virus

La mayoría de los laboratorios utilizan cepas de BVDV adaptadas al laboratorio muy citopatogénicas para pruebas de NV porque facilitan su lectura, aunque en la actualidad hay técnicas de inmunomarcaje que permiten la detección del crecimiento o la neutralización de cepas no citopatogénicas cuando se considere deseable. No es probable que haya ninguna única cepa ideal para todas las circunstancias, pero en la

práctica se debería seleccionar una que detecte la mayor proporción de reacciones serológicas en la población local de ganado. Dos cepas citogénicas ampliamente utilizadas son “Oregón C24V” y “NADL”. La prueba de neutralización que utiliza la cepa tipo 1 del virus no detecta niveles bajos de anticuerpo contra el virus tipo 2 de DVB, y viceversa (32). Es importante que se usen en la prueba los tipos 1 y 2 de DVB y no solo aquél que se sospeche que está presente, ya que esto puede conducir a un informe incorrecto.

A continuación se incluye el esquema de un protocolo para una prueba de microtitulación de NV (27):

- i) Los sueros de la prueba se inactivan por calor durante 30 minutos a 45°C.
- ii) De una dilución inicial de 1/5 se hacen diluciones seriadas dobles en una placa para microtitulación de 96 pocillos con el fondo plano, utilizando medio de cultivo celular como diluyente. Para cada muestra, se utilizan dos o cuatro pocillos en cada dilución, dependiendo del grado de precisión requerido. También deberían probarse sueros control positivos y negativos.
- iii) Se añade a cada pocillo un volumen igual (por ejemplo 50 µl) de un stock de cepa citopatogénica de BVDV que contiene 100 DICT₅₀ (50%), dosis infectivas medias de cultivo de tejido. También se hace una titulación del stock del virus en algunos pocillos de repuesto para comprobar la potencia del virus (límites de aceptación 30–421 DICT₅₀).
- iv) La placa se incuba durante 1 hora a 37°C.
- v) Un recipiente con células adecuadas (por ejemplo de cornetes o testículos bovinos) se tripsiniza y la concentración celular se ajusta a 3×10^5 /ml. Se añaden 50 µl de la suspensión celular a cada pocillo de la placa de microtitulación.
- vi) La placa se incuba a 37°C durante 5 días, en atmósfera de CO₂ al 5% o con la placa cerrada.
- vii) Los pocillos se examinan al microscopio para detectar ECP. El título de NV para cada suero es la dilución a la cual se neutraliza el virus en 50% de los pocillos. Esto se puede calcular mediante el método de Spearman–Kärber. Un animal seronegativo no mostrará neutralización a la dilución más baja (1/5), equivalente a la dilución final de 1/10.

b) **Enzimoimmunoensayo**

Se pueden usar pruebas tanto indirectas como bloqueantes (40, 43, 55, 63). En el mercado existen algunos kits. La mayor dificultad para configurar la prueba radica en la preparación de un antígeno vírico con suficiente potencia. El virus ha de cultivarse bajo condiciones óptimas utilizando un tipo de célula muy permisivo. Ningún suero utilizado en el medio debe inhibir el crecimiento del BVDV. El tiempo óptimo para la recogida debe determinarse experimentalmente para el sistema individual de cultivo. El virus se puede concentrar y purificar por centrifugación en gradiente de densidad. Alternativamente, puede prepararse un antígeno potente mediante tratamiento de cultivos de células infectadas con detergentes, tales como Nonidet P40, N-decanoil-N-metilglucamina (Mega) 10, Triton X-100 o 1-octil-beta-D-glucopiranosido (OGP). También se han utilizado células enteras fijadas e infectadas como antígeno. En el futuro, se hará más uso de antígenos artificiales producidos por expresión genes víricos específicos en sistemas bacterianos o eucarióticos (64, 72). Tales sistemas deberían validarse probando sueros específicos contra un gran espectro de cepas diferentes de virus. En el futuro, esta tecnología debería permitir la producción de pruebas serológicas complementarias a vacunas marcadoras o con subunidades, permitiendo de esa forma la diferenciación entre el ganado vacunado y el infectado naturalmente.

A continuación se incluye un esquema de un protocolo para un ELISA indirecto (27).

- i) Se inoculan cultivos rodantes de células secundarias de testículo de ternero con alta multiplicidad de infección (alrededor de uno) con cepa Oregón C24V del BVDV, mantenidas con medio sin suero e incubadas durante 24 horas a 37°C.
- ii) Se separan y centrifugan las células. Se retira el sobrenadante del medio. El precipitado se trata con dos volúmenes de 2% de OGP en PBS durante 15 minutos a 4°C, y se centrifuga para retirar los restos de células. El antígeno de sobrenadantes se almacena en pequeñas alícuotas a –70°C, o liofilizado. Las células no infectadas se procesan en paralelo para hacer un antígeno control.
- iii) Se diluye el antígeno hasta una dilución predeterminado en 0,05 M de tampón bicarbonato, pH 9,6. Se cubren las filas alternas de una placa de microtitulación de ELISA con antígenos víricos y con el antígeno control durante la noche a 4°C. Se lavan las placas en PBS con 0,05% de Tween 20 o Tween 80 (PBST) antes de su utilización en la prueba.
- iv) Se diluyen los sueros problema 1/50 en diluyente de suero (0,5 M de NaCl; 0,01 M de tampón fosfato; 0,05 % de Tween 20; 0,001 M de ácido etiléndiamino tetraacético; 1% de polivinil pirrolidona, pH 7,2) y se añaden a pocillos revestidos de antígeno vírico y de antígeno control durante 1 hora a 37°C. Las placas se lavan después cinco veces con PBST.

- v) Se añade IgG antibovina de conejo conjugada con peroxidasa a una dilución predeterminada (en suero diluyente) durante 1 hora a 37°C, y después se lavan las placas de nuevo cinco veces en PBST.
- vi) Se añade un sustrato adecuado de la enzima, tal como peróxido de hidrógeno/ tetrametil benzidina. Después del desarrollo de color, se para la reacción con ácido sulfúrico y se lee la absorbancia en un lector de placas ELISA. El valor obtenido con el antígeno control se resta de la reacción problema para dar un valor de absorbancia neto para cada suero.
- vii) Se recomienda convertir los valores de absorbancia neta a relación muestra: positiva (o porcentaje de positividad), dividiendo la absorbancia neta por la absorbancia neta en esa prueba de un suero positivo estándar que tiene una absorbancia neta de alrededor de 1,0. Este procedimiento de normalización conduce a resultados más significativos y reproducibles.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL DE DIAGNÓSTICO

La infección por el tracto orofaríngeo y respiratorio es probablemente la ruta de transmisión del BVDV más importante en las granjas. La protección contra la dispersión por esta forma tendría un efecto beneficioso para controlar la enfermedad debida al virus, particularmente en animales jóvenes. Se requiere también la formulación de una vacuna que proporcione protección al feto para prevenir el amplio espectro de síndromes que resultan de una infección *in útero* (13).

Aún no se ha desarrollado una vacuna estándar para protección contra la infección, pero hay algunas preparaciones comerciales disponibles, por ejemplo, en Europa y Norteamérica. Tradicionalmente, las vacunas de DVB se han basado en una cepa citopatogénica del virus y son de dos clases: vacunas con virus vivos modificados o vacunas inactivadas.

Aunque las vacunas con virus vivos se encuentran disponibles en algunos países, deberían utilizarse bajo cuidadoso control veterinario porque una cepa citopatogénica puede precipitar la enfermedad de las mucosas por sobreinfección de animales virémicos persistentes, mientras que en ganado gestante, un componente no citopatogénico de la vacuna puede cruzar la placenta e infectar el feto como se describe en la sección B.b. La vacuna con virus vivos puede ser también inmunosupresora y provocar otras infecciones. Por otra parte, las vacunas con virus vivos modificados pueden requerir solamente una dosis única. Las vacunas constituidas adecuadamente que contienen virus muertos son seguras pero, para obtener niveles satisfactorios de inmunidad, requieren generalmente vacunaciones de refuerzo, lo que puede resultar molesto. Un protocolo de vacunación combinada usando virus inactivados seguido de vacunas con virus vivos puede reducir el riesgo de reacción adversa a la cepa viva (31).

Se han descrito vacunas experimentales inactivadas basadas en la glicoproteína vírica E2 de DVB expresada por baculovirus. Ofrecen una perspectiva futura de "vacunas marcadoras" cuando se usan en conexión con una prueba serológica complementaria (15). No obstante, debe advertirse que tales vacunas contra el virus estrechamente asociado a la peste porcina clásica no han resultado tan efectivas, debido probablemente a su incapacidad para inducir una fuerte respuesta inmune mediada por células. El BVDV es particularmente importante como riesgo en la producción de materiales biológicos para uso veterinario por la alta frecuencia de contaminación de lotes de FCS utilizados como suplemento de medios de cultivo (38). Especial atención se debe proporcionar a los sueros diseñados para administración a animales, o utilizados como suplemento de crecimiento en transferencia de embriones o procedimientos de fertilización *in-vitro*. El suero usado para tales fines debería tratarse para garantizar la esterilidad. Se recomienda que las pruebas post-tratamiento, tal como se detallan en el capítulo 1.1.9., se utilicen para asegurar que el suero está libre de BVDV.

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se dan en el capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las normas dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 intentan ser de naturaleza general y se pueden suplementar con los requisitos nacionales y regionales.

1. Control del inóculo

a) Características del inóculo

Una vacuna ideal debería contener una cepa (o cepas) de virus que se haya demostrado que protege contra la amplia diversidad antigénica demostrada por BVDV. Se puede obtener una buena apreciación de las características antigénicas de cepas individuales mediante análisis con series de MAbs (56, 64). La identidad del virus del inóculo se debería confirmar por secuenciación (60, 68).

La emergencia de genotipo 2 DVB ha planteado preguntas respecto al grado de protección conferido por vacunas de tipo 1 contra genotipo 2. Un estudio *in-vitro* de la habilidad neutralizante de los sueros inducidos por una vacuna reveló una amplia reactividad con diversas cepas de Europea y de EE.UU., incluyendo

cepas tipo 2 (37). Otro trabajo ha mostrado que la vacuna derivada de un genotipo puede proporcionar un grado de protección del otro (19, 21, 47, 52). Sin embargo, la eficacia de la vacunación de cualquier genotipo, particularmente con una vacuna muerta, es menos predecible para evitar la transmisión transplacentaria, ya que la viremia raramente se evita por completo.

Los aislamientos del virus citopático se mezclan a menudo con el biotipo no citopático. La separación y purificación de los dos biotipos de un cultivo inicial mezclado depende de tres ciclos de una técnica de dilución limitante para el virus nocitopatogénico, o de tres ciclos de selección de calvas para el virus citopatogénico. La pureza del virus citopatogénico debe confirmarse mediante al menos un paso adicional de dilución limitante. Cuando se han clonado los aislamientos, su identidad debería confirmarse mediante tinción directa o indirecta con anticuerpo específico ligado a fluoresceína o enzima.

b) Método de cultivo

Ambos biotipos crecerán en una variedad de cultivos celulares de origen bovino. Se pueden utilizar procedimientos estándar, con la expectativa de recoger virus no citopatogénico a los 5–7 días y virus citopatogénico a los 2–4 días. Los detalles para un rendimiento óptimo dependen de varios factores, incluyendo el cultivo celular y el aislamiento utilizado y la proporción de inoculación inicial del virus (42).

c) Validación como vacuna

Todas las vacunas deberían pasar pruebas estándar de inocuidad y eficacia. Es crucial asegurar que los cultivos celulares y el suero bovino fetal incluido en el medio de cultivo estén libres de BVDV espontáneo y de anticuerpos (descrito en la sección B), y de otros microorganismos. Se debe demostrar que las vacunas vivas son seguras en el ganado (es decir, sin transmisión al feto), o bien se autorizan con una advertencia para no utilizarlas en animales gestantes. Las vacunas vivas que contienen cepas citopatogénicas tienen una advertencia apropiada sobre el riesgo de inducir enfermedad de las mucosas en ganado infectado persistentemente.

Las pruebas de eficacia de vacunas de DVB en ganado no gestante están limitadas por la dificultad de establecer un modelo satisfactorio de desafío. Las pruebas deberían incluir como mínimo la demostración de la seroconversión después de la vacunación, la reducción en la eliminación del virus después de la inoculación de desafío en ganado vacunado, y la disminución de los parámetros clínicos medibles, tales como la respuesta de temperatura rectal y la leucopenia (4, 13, 42). Las vacunas propuestas para el uso en ganado adulto deberían evaluarse por su eficacia en reducir la transmisión transplacentaria, consiguiendo, desde un punto de vista ideal, la prevención completa. En este caso, se puede establecer un sistema adecuado de desafío por inoculación intranasal de virus no citopatogénico en vacas gestantes con menos de 90 días de gestación (13). Generalmente este sistema producirá con fiabilidad crías persistentemente vírémicas en vacas no inmunes.

2. Método de producción

No hay un método estándar de producción de una vacuna DVB, pero se pueden usar las técnicas convencionales de laboratorio con cultivos celulares estacionarios, rodantes o en suspensión (micro-transportadores). Las vacunas inactivadas se pueden preparar por métodos convencionales, tales como inactivación con etilénimina binaria o beta-propiolactona (42, 53, 61). Se pueden usar una variedad de adyuvantes (42, 51, 57).

3. Control en el proceso

Se han de inspeccionar regularmente los cultivos para asegurarse de que están libres de contaminación, y para controlar de modo adecuado la salud de las células y el desarrollo o ausencia de ECP.

4. Control de lotes

a) Esterilidad

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación de los productos biológicos se pueden encontrar en el capítulo 1.1.9.

b) Inocuidad

Es esencial que se elimine todo el material infeccioso durante la preparación de una vacuna inactivada, y las muestras deben someterse a varios pases en cultivo celular para asegurar la ausencia de BVDV vivos.

También puede resultar necesario asegurarse de que varios agentes prohibidos están ausentes (previamente a la inactivación) antes de que se autorice la utilización de la vacuna.

c) Potencia

Idealmente, la potencia de la vacuna debe determinarse mediante inoculación en terneros seronegativos y sin virus, y analizando después la respuesta de anticuerpos; sin embargo, esto es muy caro para el control de lotes. El contenido antigénico se puede probar por ELISA y ajustarse según se requiera a un nivel estándar de la vacuna en particular (4, 46, 51). No existen protocolos de ensayo estandarizado que puedan aplicarse a todas las vacunas. Los lotes de vacunas vivas pueden probarse por titulación de la infectividad.

d) Duración de la inmunidad

Existen pocas publicaciones sobre la duración de los anticuerpos después de la vacunación con un producto comercial. Los protocolos en uso recomiendan generalmente un procedimiento inicial de dos inoculaciones y recuerdos con intervalos anuales. Solo se dispone de datos limitados sobre los niveles de anticuerpos que se correlacionan con la protección contra las infecciones respiratorias (7, 41) o las infecciones *in útero* (13).

e) Estabilidad

No existen normativas aceptadas en cuanto a la estabilidad de las vacunas contra la DVB, pero se supone que una vacuna viva atenuada (liofilizada) debe permanecer activa por lo menos durante 1 año si se mantiene a 4°C. Las vacunas con virus inactivados pueden tener una caducidad mayor a 4°C. En ambos casos, las temperaturas inferiores pueden prolongar la caducidad, aunque los adyuvantes de las vacunas inactivadas pueden evitarlo.

f) Precauciones

El BVDV no se considera un peligro para la salud humana. Unas buenas prácticas microbiológicas estándar deberían ser adecuadas para manejar el virus en el laboratorio.

5. Pruebas sobre el producto final

a) Pruebas de inocuidad

La inocuidad del producto final, tanto en el caso de las vacunas vivas como inactivadas, debe determinarse en terneros susceptibles a fin de detectar la aparición de reacciones locales después de su administración, y en ganado gestante por sus efectos en el ternero neonato. Las pruebas para lotes individuales se describen en la sección C.4.b.

b) Pruebas de potencia para antigenicidad

Se debe demostrar que las vacunas contra la BVD producen una respuesta inmune adecuada, como se indica en la sección C.4.c., cuando se usan con su formación final según las instrucciones publicadas por el fabricante. Se pueden utilizar ensayos *in-vitro* (sección C.4.c.) para controlar los lotes individuales.

REFERENCIAS

1. BAKER J.C. (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet. Clin. North. Am. – Food Animal Practice*, **11**, 425–445.
2. BHUDEV I. & WEINSTOCK D. (2003). Detection of bovine viral diarrhea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real time RT-PCR (Taqman). *J. Virol. Methods*, **109**, 25–30.
3. BIELANSKI A., SAPP T. & LUTZE WALLACE C. (1998). Association of bovine embryos produced by *in vitro* fertilization with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhea virus type II. *Theriogenol.*, **49**, 1231–1238.
4. BOLIN S.R. (1993). Immunogens of bovine viral diarrhea virus. *Vet. Microbiol.*, **37**, 263–271.
5. BOLIN S.R. (1995). The pathogenesis of mucosal disease. *Vet. Clin. North. Am.*, **11**, 489–500.
6. 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.

7. 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.
8. BOLIN S.R., RIDPATH J.F., BLACK J., MACY M. & ROBLIN R. (1994). Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhea virus. *J. Virol. Methods*, **48**, 211–221.
9. BOOTH P.J., STEVENS D.A., COLLINS M.E. & BROWNLIE J. (1995). Detection of bovine viral diarrhoea virus antigen and RNA in oviduct and granulosa cells of persistently infected cattle. *J. Reprod. Fertil.*, **105**, 17–24.
10. BROCK K.V. (1995). Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet. Clin. North. Am.*, **11**, 549–561.
11. BROWNLIE J. (1985). Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea/mucosal disease complex in cattle. *In Practice*, **7**, 195–202.
12. BROWNLIE J. (1990). The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **9**, 43–59.
13. 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.
14. BROWNLIE J., CLARKE M.C. & HOWARD C.J. (1984). Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.*, **114**, 535–536.
15. BRUSCHKE C.M., VAN OIRSCHOT J.M. & VAN RIJN P.A. (1999). An experimental multivalent bovine virus diarrhea virus E2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep. *Vaccine*, **17**, 1983–1991.
16. CARMAN S., VAN DREUMEL T., RIDPATH J., HAZLETT M., ALVES D., DUBOVI E., TREMBLAY R., BOLIN S., GODKIN A. & ANDERSON N. (1998). Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993–1995. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 27–35.
17. CLARKE M.C., BROWNLIE J. & HOWARD C.J. (1987). Isolation of cytopathic and non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus from tissues of infected animals. *In: Pestivirus Infections of Ruminants*, Harkness J.W., ed. Commission of the European Communities, Brussels, Belgium, EUR10238, 3–10.
18. 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.
19. CORTESE V.S., WEST K.H., HASSARD L.E., CARMAN S. & ELLIS J.A. (1998). Clinical and immunologic responses of vaccinated and unvaccinated calves to infection with a virulent type-II isolate of bovine viral diarrhea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **213**, 1312.
20. DAVID G.P., CRAWSHAW T. R., GUNNING R.F., HIBBERD R.C., LLOYD G.M. & MARSH P.R. (1994). Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *Vet. Rec.*, **134**, 468–472.
21. DEAN H.J. & LEYH R. (1999). Cross-protective efficacy of a bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 1 vaccine against BVDV type 2 challenge. *Vaccine*, **17**, 1117–1124.
22. DESPORT M., COLLINS M.E. & BROWNLIE J. (1994). Detection of bovine virus diarrhoea virus RNA by *in situ* hybridisation with digoxigenin-labelled riboprobes. *Intervirology*, **37**, 269–276.
23. DONIS R.O. (1995). Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *Vet. Clin. North. Am.*, **11**, 393–423.
24. DREW T.W., SANDVIK T., WAKELEY P., JONES T. & HOWARD P. (2002). BVD virus genotype 2 detected in British cattle. *Vet. Rec.*, **151**, 551.
25. DREW T.W., YAPP F. & PATON D.J. (1999). The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Vet. Microbiol.*, **64**, 145–154.

26. DUFFELL S.J. & HARKNESS J.W. (1985). Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.*, **117**, 240–245.
27. EDWARDS S. (1990). The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **9**, 115–130.
28. EDWARDS S. (1993). Bovine viral diarrhoea virus. In: Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures, Doyle A., Griffiths J.B. & Newell D.G., eds. John Wiley & Sons, Chichester, UK. Module 7B:5, 1–8.
29. ENTRICAN G., DAND A. & NETTLETON P.F. (1995). A double monoclonal antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. *Vet. Microbiol.*, **43**, 65–74.
30. 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.
31. FREY H.R. & EICKEN K. (1995). Untersuchungen über die Wirksamkeit einer inaktivierten BVD-Vakzine sur Erhöhung der Sicherheit einer BVD-Lebendvakzine. *Tierarztl. Umsch.*, **50**, 86–93.
32. 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 diarrhoea viruses – detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **4**, 380–383.
33. GILBERT S.A., BURTON K.M., PRINS S.E. & DEREGT D. (1999). Typing of bovine viral diarrhoea viruses directly from blood of persistently infected cattle by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 2020–2023.
34. 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 diarrhoea virus can persist in testicular tissue after vaccination of peri-pubertal bulls but prevents subsequent infection. *Vaccine*, **25**, 867–876.
35. GROOMS D.L., BROCK K.V. & WARD L.A. (1998). Detection of bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 125–129.
36. HAMEL A.L., WASYLYSHEN M.D. & NAYAR G.P.S. (1995). Rapid detection of bovine viral diarrhoea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 287–291.
37. HAMERS C., DI VALENTIN E., LECOMTE C., LAMBOT M., JORIS E., GENICOT B. & PASTORET P.-P. (2002). Virus neutralising antibodies against 22 bovine viral diarrhoea virus isolates in vaccinated calves. *Vet. J.*, **163**, 61–67.
38. HARASAWA R. (1995). Adventitious pestivirus RNA in live virus vaccines against bovine and swine diseases. *Vaccine*, **13**, 100–103.
39. HOUE H., BAKER J.C., MAES R.K., RUEGG P.L. & LLOYD J.W. (1995). Application of antibody titers against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**, 327–332.
40. HOWARD C.J., CLARKE M.C. & BROWNLIE J. (1985). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle sera. *Vet. Microbiol.*, **10**, 359–369.
41. 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.
42. HOWARD C.J., CLARKE M.C., SOPP P. & BROWNLIE J. (1994). Systemic vaccination with inactivated bovine virus diarrhoea virus protects against respiratory challenge. *Vet. Microbiol.*, **42**, 171–179.
43. KATZ J.B. & HANSON S.K. (1987). Competitive and blocking enzyme-linked immunoassay for detection of fetal bovine serum antibodies to bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods*, **15**, 167–175.
44. KIM S.G. & DUBOVI E.J. (2003). A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. *Biologicals*, **31**, 103–106.

45. KIRKLAND P.D., MACKINTOSH S.G. & MOYLE A. (1994). The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. *Vet. Rec.*, **135**, 527–529.
46. LETELLIER C. & KERKHOFS P. (2003). Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods*, **114**, 21–27.
47. LINDBERG A., GROENENDAAL H., ALENIUS S. & EMANUELSON U. (2001). Validation of a test for dams carrying foetuses persistently infected with bovine viral diarrhoea virus based on determination of antibody levels in late pregnancy. *Prev. Med.*, **51**, 199–214.48. LINDBERG A., ORTMAN K. & ALENIUS S. (2000). Seroconversion to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy heifers after embryo transfer. 14th International Congress on Animal Reproduction Stockholm, Sweden, Volume I, p. 250.
49. LINDBERG A.L.E. & ALENIUS S. (1999). Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet. Microbiol.*, **64**, 197–222.
50. LOEHR B.I., FREY H.R., MOENNIG V. & GREISER WILKE I. (1998). Experimental induction of mucosal disease: consequences of superinfection of persistently infected cattle with different strains of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Arch. Virol.*, **143**, 667–679.
51. LUDEMANN L.R. & KATZ J.B. (1994). Enzyme-linked immunosorbent assay assessment of bovine viral diarrhoea virus antigen in inactivated vaccines using polyclonal or monoclonal antibodies. *Biologicals*, **22**, 21–27.
52. MAKOSCHEY B., JANSSEN M.G.J., VRIJENHOEK M.P., KORSTEN J.H.M. & VANDER MAREL P. (2001). An inactivated bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2. *Vaccine* **19**, 3261–3268.
53. MCGOLDRICK A., BENSANDE 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.
54. 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.
55. MOENNIG V. & LIESS B. (1995). Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North. Am.*, **11**, 477–487.
56. MOENNIG V., HOUE H. & LINDBERG A. (2005). BVD control in Europe: current status and perspectives. *Anim. Health Res. Rev.*, **6**, 63–74.
57. NEATON H.J. (1986). Which BVD vaccine should I use? *Vet. Med.*, **81**, 876–881.
58. 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.
59. NISKANEN R., ALENIUS S., BELAK K., BAULE C., BELAK S., VOGES H. & GUSTAFSSON H. (2002). Insemination of susceptible heifers with semen from a non-viraemic bull with persistent bovine viral diarrhoea virus infection localized in the testes. *Reprod. Domest. Anim.*, **37**, 171–175.
60. OBRITZHAUSER W., OBRITZHAUSER G., DEUTZ A., KOEFER J., MOSTL K. & SCHEIBNER H. (2002). Influence of cows persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) on BVD bulk milk diagnosis. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, **89**, 254–259
61. PARK B.K. & BOLIN S.R. (1987). Molecular changes of bovine viral diarrhoea virus polypeptides treated with binary ethylenimine, beta-propiolactone and formalin. *Res. Rep. Rural Dev. Admin. (L&V) Korea*, **29**, 99–103.
62. PATON D.J., GOODEY R., BROCKMAN S. & WOOD L. (1989). Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. *Vet. Rec.*, **124**, 63–64.
63. PATON D.J., IBATA G., EDWARDS S. & WENSVOORT G. (1991). An ELISA detecting antibody to conserved Pestivirus epitopes. *J. Virol. Methods*, **31**, 315–324.

64. 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.
65. PELLERIN C., VANDENHURK J., LECOMTE J. & TIJSSEN P. (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, **203**, 260–268.
66. RADWAN G.S., BROCK K.V., HOGAN J.S. & SMITH K.L. (1995). Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.*, **44**, 77–91.
67. REVELL S.G., CHASEY D., DREW T.W. & EDWARDS S. (1988). Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, **123**, 122–125.
68. RIDPATH J.F. BOLIN S.R. & DUBOVI E.J. (1994). Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, **205**, 66–74.
69. RUTH G.R. (1987). Bovine viral diarrhoea: a difficult infection to diagnose. *Vet. Med.*, **81**, 870–874.
70. TRAUTWEIN G., HEWICKER M., LIESS B., ORBAN S. & GRUNERT E. (1986). Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. III. Occurrence of central nervous system malformations in calves born from vaccinated cows. *J. Vet. Med.*, **B33**, 260–268.
71. TSUBOI T. & IMADA T. (1998). Detection of BVDV in bovine embryos derived from persistently infected heifers by PCR. *Vet. Rec.*, **142**, 114–115.
72. VANDERHEIJDEN N., DEMOERLOOZE L., VANDENBERGH D., CHAPPUIS G., RENARD A. & LECOMTE C. (1993). Expression of the bovine viral diarrhoea virus osloss-p80 protein: its use as ELISA antigen for cattle serum antibody detection. *J. Gen. Virol.*, **74**, 1427–1431.
73. VANROOSE G., NAUWYNCK H., VAN SOOM A., VANOPDENBOSCH E. & DE KRUIF A. (1998). Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in zona-free and zona-intact *in vitro*-produced bovine embryos and the effect on embryo quality. *Biol. Reprod.*, **58**, 857–866.
74. 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.
75. 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.
76. WALZ P.H., BELL T.G., GROOMS D.L., KAISER L., MAES R.K. & BAKER J.C. (2001). Platelet aggregation responses and virus isolation from platelets in calves experimentally infected with type 1 or type II bovine viral diarrhoea virus. *Can. J. Vet. Res.*, **65**, 241–247.
77. WILHELMSSEN C.L., BOLIN S.R., RIDPATH J.F., CHEVILLE F.N. & KLUGE J.P. (1991). Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhoea. *Am. J. Vet. Res.*, **52**, 269–275.
78. 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: Existe un laboratorio de referencia de la OIE para la diarrea viral bovina (véase el cuadro en la parte 3 de este *Manual de animales terrestres* o consúltese la lista más actualizada en la página web de la OIE: www.oie.int).