

El diagnóstico de laboratorio en los programas de control de IBR y BVD



Ignacio Arnaiz Seco

Laboratorio de Sanidade e Producción Animal de Galicia.
Consellería do Medio Rural. Xunta de Galicia



Fotos: AXÓN COMUNICACIÓN

► Introducción

En los últimos años, algunas comunidades autónomas (CCAA) han incluido en los programas sanitarios desarrollados por las agrupaciones de defensa sanitaria ganaderas de vacuno (ADSG) el control y/o la erradicación de enfermedades bovinas como la rinitraqueitis bovina infecciosa (IBR) y la diarrea vírica bovina (BVD).

Cualquier ganadero puede integrarse voluntariamente en la ADSG que le corresponda por su situación geográfica. Una vez integrado y según las normativas correspondientes de cada CCAA, debe implementar las medidas sanitarias destinadas

al control de las enfermedades incluidas en estos programas.

Los programas de control de las enfermedades animales deben evaluar las distintas estrategias a seguir según las particularidades de cada zona y los objetivos a conseguir, así como las herramientas existentes para ello. Las herramientas de diagnóstico de laboratorio son variadas, pero en función de los objetivos marcados, pueden ser útiles o no, siempre teniendo en cuenta el coste-beneficio de cada una de ellas.

Sin embargo, el diagnóstico de laboratorio es sólo una parte del proceso en

el que se fundamenta el éxito de un programa de control, que según el profesor Brownlie se basa en 5 puntos fundamentales (fig.1).

En este sentido, cuando se habla de buenos diagnósticos no nos referimos a los más avanzados o a los de mayor sensibilidad o especificidad, sino a los que mejor se adaptan a la estrategia planteada. Siempre deben tener como base la obtención del mayor beneficio con el menor coste posible. A medida que el programa va avanzando será posible su modificación en función de las necesidades que se planteen. Los buenos diagnósticos, además de implicar al personal de laboratorio que



Fig.1: Bases para el éxito de un programa de control.

debe estar capacitado para su puesta en marcha, deben ser interpretados correctamente por los veterinarios responsables de la explotación a la que van dirigidos. Un buen diagnóstico de laboratorio con una mala interpretación de los resultados implica un gasto mayor y en muchos casos un paso atrás en el éxito del programa.

Abordaje práctico del diagnóstico de laboratorio de la IBR

Antes de establecer las herramientas de diagnóstico de laboratorio del IBR se evaluarán los objetivos que se han fijado en el programa. La legislación europea, marca dos tipos de programas destinados a la erradicación del herpesvirus bovino tipo I (BHV-1) según su estrategia (fig.2):

podría plantearse a partir de la vacunación con vacuna marcadora o mediante un sistema mixto que permita la elección de vacunar o no según la prevalencia de la enfermedad en la explotación y sus riesgos de contagio.

En el caso de la IBR se debe tener en cuenta la existencia de animales con infección latente, que como consecuencia de un proceso de inmunodepresión, pueden volver a reactivar el virus y reinfectar la explotación. Por tanto todo animal seropositivo (ya sea por virus de campo o por vacuna convencional, no diferenciables serológicamente), será considerado como infectado.

La serología tiene una serie de técnicas que permiten determinar los niveles de anticuerpos en los animales o en las explotaciones (fig.3).

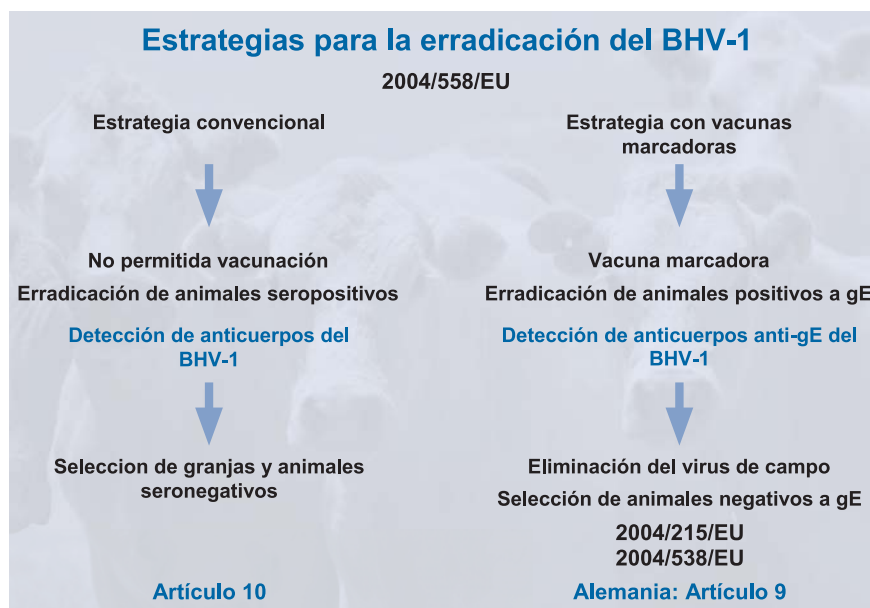


Fig.2: Estrategias europeas para la erradicación del BHV-1.

Dado que en España el uso de las vacunas no marcadoras está aún en uso en muchas comunidades autónomas, y que por tanto la prevalencia de la enfermedad es elevada, parece claro que el primer paso a implementar en un plan de control debe ser la prohibición de este tipo de vacunas. Tras esta primera decisión la erradicación

La seroneutralización (NT) fue el método serológico de referencia empleado hasta el desarrollo de los ELISAs, que con una sensibilidad y especificidad igual o superior, fueron sustituyendo a este método en el diagnóstico de la IBR. Los ELISAs por su capacidad para el procesamiento de un elevado nº de muestras, sencillez y bajo

coste, se han impuesto como el método de elección en los programas sanitarios, además de permitir el diagnóstico diferencial cuando se emplean vacunas marcadoras (ELISA de detección de gE). El ELISA anti-gB es el de mayor sensibilidad y especificidad en muestras de suero, siendo el indirecto o de anticuerpos totales el más sensible en muestras de leche. El ELISA anti-gE, es el menos sensible de los tres (fig. 3 y 4), pero hasta ahora es el único método existente para diferenciar animales vacunados con vacunas marcadoras (fig. 5), lo que lo hace imprescindible en los programas de control.

Propuesta de abordaje de la IBR en rebaños bovinos

En ausencia de un plan nacional de erradicación, el objetivo fundamental será la disminución de la prevalencia, de forma que en el caso de su implementación, dispongamos del mayor nº de explotaciones libres (ya sea a gB o a gE) o en disposición de serlo en poco tiempo (con prevalencias inferiores al 10%).

Los pasos a seguir serán:

- 1º Conocer la prevalencia aproximada del rebaño.
- 2º Investigar la antigüedad de la infección (edad de los animales seropositivos).
- 3º Evitar incorporaciones de animales seropositivos.
- 4º Eliminación progresiva de los animales seropositivos.

1º Determinación de la prevalencia del rebaño

En rebaños de aptitud láctea: muestra de leche de tanque (fig.6). Los rebaños no reactivos a anticuerpos de IBR indicarán por lo general una prevalencia inferior al 10% (mayor si la analítica es de anticuerpos anti-gE), por lo que podrán optar a la calificación de libres en un corto espacio de tiempo según los resultados de los muestreos serológicos.

Si el resultado del tanque es positivo, por lo general indicará una prevalencia elevada superior al 10%, por lo que será necesario plantearse un cronograma de muestreo serológico con el fin de localizar los animales seronegativos, que serán sobre los que se realicen los posteriores muestreos con el fin de comprobar nuevas infecciones.

En los rebaños libres de enfermedad, la muestra de tanque de leche es una herramienta muy útil para detectar nuevos brotes. Su eficacia va a depender de la frecuencia de muestreo. En este sentido, los países con gran nº de rebaños libres de IBR van sustituyendo los muestreos individuales en

Herramientas de Diagnóstico de Laboratorio: SEROLOGÍA

- Seroneutralización: (old) "golden standard"
- ELISA indirecto: Detección de anticuerpos del virus BHV-1
- ELISA de bloqueo: Detección de anticuerpos específicos anti gB o gE

Sensibilidad

Validación en suero: gB-ELISA>ind. ELISA>NT(96-99.9%)>>gE-ELISA (74-86%)

Especificidad

NT=indirect ELISA=gB-ELISA(98-99.9%)>gE

Sensibilidad / Especificidad

Validación en leche: ELISA indirecto>>gB-ELISA>>>gE ELISA

Fig.3: Técnicas serológicas para la detección de anticuerpos frente al BHV-1.

suero por muestreos en leche de tanque, que como en el caso de Holanda, se realizan mensualmente.

En rebaños de aptitud cárnica, el muestreo inicial se realizará a partir del segundo punto.

2º Investigar la antigüedad de la infección

La edad de los animales seropositivos nacidos en la explotación, indicará si la presencia de anticuerpos se debe a una infección o vacunación reciente (en el caso que desconozcamos las vacunaciones anteriores realizadas en la explotación) o antigua. Se deberá muestrear un porcentaje de animales de cada grupo de edad. El grupo de animales menores de 36 meses nacidos en la explotación será el más indicativo y por tanto el que debe ser sometido a un muestreo más intenso: si los animales son seronegativos, tendremos la certeza de que el virus de la IBR no ha circulado en los últimos tres años en la explotación. La razón de incluir animales de 24-36 meses se debe a que son los más sensibles al contagio debido al estrés y por tanto la inmunodepresión que supone el

primer parto. Los animales de entre 9 (en los que ya no influyen los anticuerpos ca-lostrales) y 24 meses indicarán si el virus circuló recientemente.

Estos resultados permitirán establecer un cronograma de erradicación de la enfermedad e igualmente podrá servir para evaluar la necesidad de vacunar o no con vacuna marcadora.

3º Evitar la incorporación de animales seropositivos

Todas las incorporaciones deben ser muestreadas antes de su entrada en la explotación. Serán negativas a gE o a gB según se plantee el programa de control con vacunas marcadoras o sin vacunación. Hay que recordar que todo animal seropositivo a gE será considerado como infectado (a pesar de que sepamos que ha sido vacunado con vacuna convencional) a efectos de calificación de explotación.

Como incorporaciones se consideran tanto los animales comprados como aquellos que abandonan la explotación temporalmente y entran en contacto con otros animales (ferias, subastas, etc.). En el caso

de estos últimos se debería mantener una cuarentena hasta realizarle las técnicas. Hay que recordar que la aparición de anticuerpos puede variar de 8-10 días post-infección (con gB) a 14-30 (con gE), por lo que una analítica muy temprana podría dar como resultado un falso negativo. En este sentido se debería presionar para que los eventos que supongan concentración de animales exijan que sean gE negativos.

4º Poner en marcha un plan de eliminación progresiva de los animales seropositivos

Una vez determinada la prevalencia de la enfermedad, se deben ir eliminando los animales seropositivos en función de los recursos de la explotación. Los animales seropositivos no deberán muestrearse repetidamente, centrando el muestreo en los animales seronegativos. Los animales seropositivos serán reemplazados con seronegativos para que en un plazo lento pero progresivo la prevalencia vaya disminuyendo.

Abordaje práctico del diagnóstico de laboratorio de la BVD

Cuando se plantea un programa de control de la BVD, se deberá partir de premisas diferentes al de la IBR. Mientras que en este último caso el primer paso para la erradicación será la disminución de la seroprevalencia, ya que consideramos un animal seropositivo como "infectado" y posible difusor de la infección, en la BVD, un animal positivo a anticuerpos normalmente no contagia la enfermedad. Sin embargo la existencia de animales persistentemente infectados (PI), portadores y diseminadores del virus durante toda su vida, hace que un rebaño con una prevalencia muy elevada sea sospechoso de la presencia de un PI. La detección y eliminación de estos animales será la base del control de la BVD (fig.7).

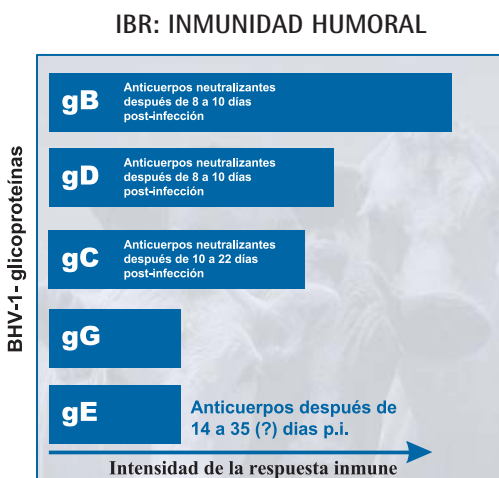


Fig.4: Respuesta humoral a las distintas glicoproteínas del BHV-1 (M. Beer, P. Koening).

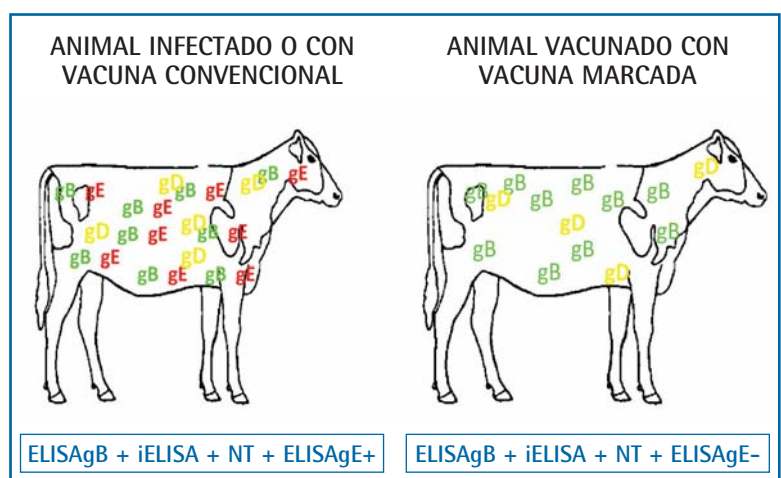


Fig.5: Resultados de serología en animales vacunados con vacunas marcadoras.

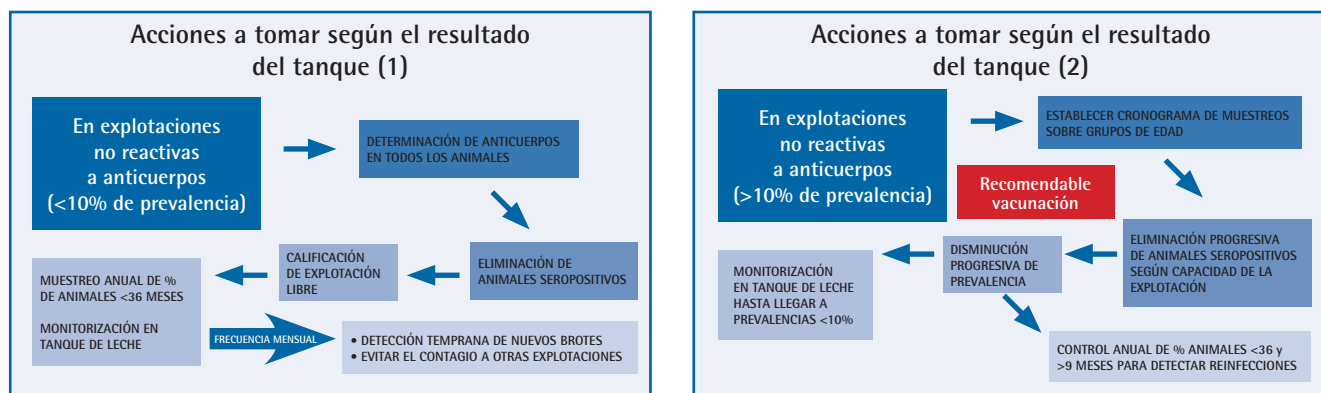


Fig.6: Diagnóstico de la IBR en muestra de leche de tanque: posible actuación según los resultados.



Fig.8: Muestra de muesca de oreja para realización de ELISA de detección de antígeno (1 y 2 Idexx).

La presencia de un PI, provoca una rápida difusión del virus a los demás animales del rebaño y por tanto una respuesta casi inmediata de anticuerpos en la mayoría de éstos. El animal PI es, en cambio, seronegativo a anticuerpos en el 99% de los casos, salvo en animales muy jóvenes y recién castrados en los que a veces convive el virus y los anticuerpos durante un cierto tiempo.

El diagnóstico de la BVD ha evolucionado en los últimos años, existiendo herramientas de diagnóstico que permiten detectar la infección y por tanto los animales PI con bastante eficacia. Las técnicas disponibles para el análisis rutinario son:

- Seroneutralización: para determinación de anticuerpos. Era la técnica utilizada como estándar antes de la aparición y mejora de las técnicas de ELISA. Detecta anticuerpos neutralizantes del virus de la BVD. Su uso es limitado ya que requiere la utilización de virus vivo y por su complejidad, no permite la realización de un nº elevado de muestras.
- ELISA de detección de anticuerpos. Su sensibilidad y especificidad es equiparable a la de la seroneutralización. La ventaja es su facilidad de realización, precio y capacidad de hacer gran nº de muestras: actualmente en el mercado existen de dos tipos:
 - Indirectos o de detección de anticuerpos totales.
 - De detección de la proteína no estructural p80/NS3 que sólo se produce cuando hay replicación viral, por lo que no debería detectarse cuando los animales se vacunan con vacunas inactivadas.

- ELISA de detección de antígeno: actualmente permiten la detección del virus en muestra de suero, sangre entera e incluso de tejidos (muesca de oreja, fig.8). La última generación de estos ELISAs tiene sensibilidades semejantes a la PCR en muestras individuales.
- Otras técnicas útiles pero menos empleadas:
 - PCR, por su dificultad y elevado coste no es de elección para muestras individuales, pero sí para la detección del virus en *pooles* de muestras de suero o en muestras de leche de tanque por su elevada sensibilidad y especificidad.
 - Inmunohistoquímica y aislamiento vírico: útiles en el diagnóstico directo sobre fetos abortados o animales muertos.

➤ Propuesta de abordaje de la BVD en rebaños bovinos

Como ya se señaló, el programa se enfocará a la detección de explotaciones

infectadas y a la eliminación de animales PI si los hubiera.

El proceso se desarrollará en varias fases cuando no tenemos información epidemiológica de la enfermedad:

- 1º *Determinar la posible existencia de infección activa.*
- 2º *Detección y eliminación de PIs.*
- 3º *Asegurar la ausencia de circulación vírica.*
- 4º *Evitar las reinfecciones por incorporación de animales: medidas de bioseguridad.*

1º Determinar la posible existencia de infección activa

En esta fase no es necesario el muestreo de gran nº de animales. En este caso, al contrario de la IBR, no interesa la eliminación de animales seropositivos, sino comprobar la existencia de circulación vírica.

En *rebaños de aptitud láctea*, la muestra de leche de tanque es la mejor opción para un primer acercamiento al estado de la explotación, y en muchos casos es sufi-

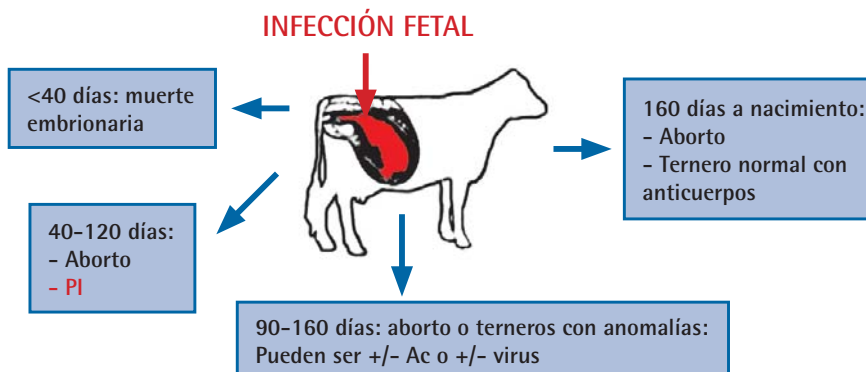


Fig.7: Resultado de la infección por BVD en una vaca gestante.

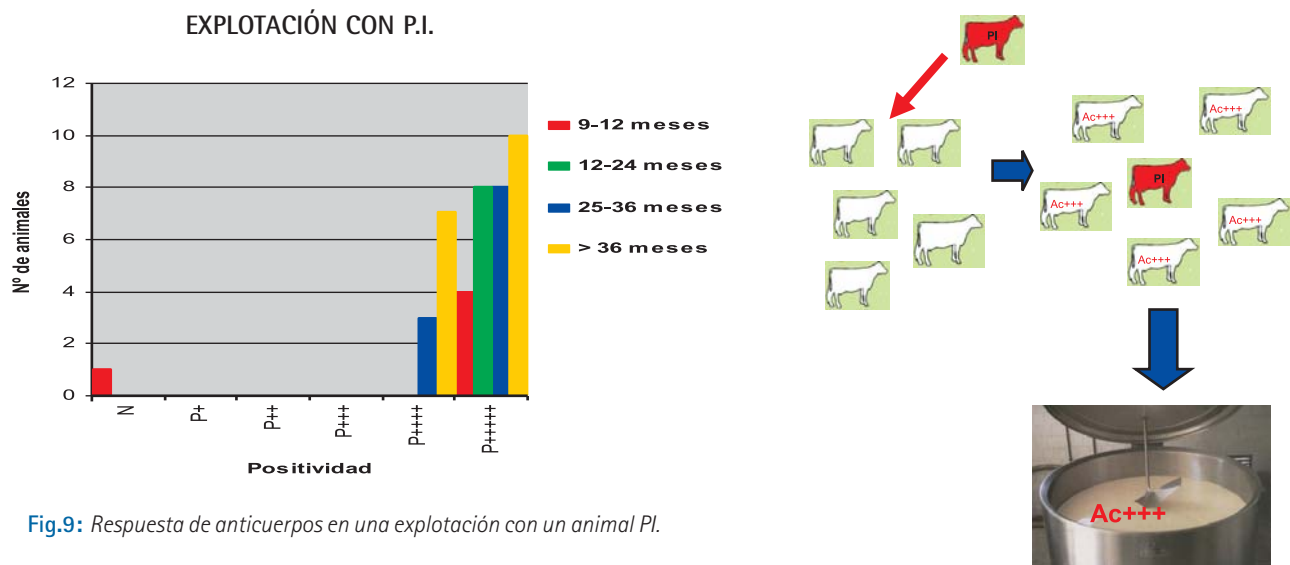


Fig.9: Respuesta de anticuerpos en una explotación con un animal PI.

ciente para descartar la circulación del virus en el rebaño que está en lactación. Si los niveles de anticuerpos anti-p80 del tanque son bajos o inexistentes, podremos concluir que en ese momento no hay circulación de virus. Hay que recordar que la presencia de un animal PI produce una respuesta rápida de anticuerpos en los animales que están en contacto con él (fig.9).

En rebaños donde existió un brote de BVD en los últimos años, los niveles de anticuerpos en el tanque se mantendrán elevados durante unos años (el tiempo de-

pende de lo que se tarde en ir reponiendo con animales seronegativos) ya que la infección con virus vivo produce una respuesta de anticuerpos que dura toda la vida del animal. Por este motivo se deberá tomar una muestra de los animales menores de 24 meses y mayores de 9 meses nacidos en la explotación con el fin de determinar si el virus sigue circulando. Este mismo muestreo será necesario en los *rebaños de aptitud cárnica*, en los que incluiremos el muestreo de animales hasta los 36 meses. Si en esta población de animales existe una proporción elevada de seropositivos, se deberá

sospechar de la presencia de animales PI. La ausencia de anticuerpos en esta población de animales descartará la circulación reciente del virus.

2º Detección y eliminación de PIs

Si la realización de las pruebas anteriores indicara la posible presencia de animales PI, se deberá buscar el grupo de animales donde se encontrarán con mayor probabilidad. Según la bibliografía, los PI normalmente son animales débiles que suelen morir en el primer año de vida. La práctica nos ha



Fotos AXON COMUNICACIÓN

demostrado que es posible encontrar en algunas explotaciones hasta tres generaciones de animales PI, sin sintomatología aparente. Por ello no se debe pensar que el PI va a aparecer siempre entre el grupo de animales jóvenes (a no ser que tengamos información previa de la explotación).

En explotaciones de aptitud láctea con un censo superior a 30-40 animales en lactación, la muestra de elección será la de leche del tanque y la técnica a realizar la PCR. Aunque sea una técnica cara, permitirá saber si existe un animal PI entre todos los animales que aportan leche al tanque. Un resultado negativo descartará la presencia de PI en este grupo de animales, evitando de esta forma el muestreo individual de los mismos, que se limitará a los animales en secado y a las novillas y terneros. La PCR también permitirá realizar *pool*es de sueros. El ELISA de antígeno no es recomendable en los *pool*es de muestras individuales ni en la muestra de leche de tanque por su menor sensibilidad. Además puede producirse el fenómeno de secuestro del antígeno debido a la alta concentración de anticuerpos presentes en los animales de explotaciones infectadas.

En caso de sospecha de PI, los muestreos individuales de antígeno se limitarán en un principio a los animales seronegativos, ya que es muy rara la presencia de anticuerpos en estos animales. En los terneros calostrados, pueden convivir los anticuerpos con el virus e incluso llegar a secuestrarlo durante un periodo, en el cual nos darán falsos negativos. Para evitar esta situación, se recomienda en animales menores de 6 meses, la muestra de muesca de oreja para someterla a análisis de ELISA antígeno. Esta muestra evita en el mayor nº de casos el fenómeno de secuestro del virus por los anticuerpos calostrales y por lo tanto la posibilidad de fallo en el diagnóstico de PIs.

Todo animal positivo a antígeno, deberá ser confirmado con una segunda analítica al menos tres semanas después de la primera. En explotaciones con circulación del virus, es posible detectar animales con viremias transitorias, en los que el virus puede estar presente hasta que la respuesta de anticuerpos lo haga desaparecer.

La detección precoz de animales PI es fundamental para el éxito del programa y su eliminación debe ser inmediata para evitar la circulación continua del virus.

3º Asegurar la ausencia de circulación vírica

No se puede asegurar el fin de la infección hasta comprobar que un año después de la eliminación del último animal PI de la explotación no hay nacimientos de animales positivos a antígeno. Esto implica que todos los animales que nazcan a partir de ahí, deben someterse a analítica de ELISA antígeno en muesca de oreja con resultado negativo. Estos animales (que serán también negativos a anticuerpos) en un futuro se irán incorporando al grupo de reproductoras, disminuyendo los niveles de anticuerpos presentes en este grupo, lo que repercutirá en el tanque de leche en el caso de las explotaciones con esta aptitud.

En el caso de producirse abortos, éstos también deberán ser analizados, para confirmar que la causa no es el BVD. En estos casos, además del ELISA antígeno en la muesca de oreja, es útil la técnica del aislamiento vírico.

4º Evitar las reinfecciones por incorporación de animales: medidas de bioseguridad

Una explotación libre de BVD es aquella en la que el virus no está circulando, por lo que no deben existir seroconversiones entre los animales seronegativos. El virus de la BVD se difunde con mucha facilidad por lo que la vigilancia debe hacerse de forma periódica.

Todo animal que se incorpore al rebaño, debe someterse a analítica para determinar la existencia de antígeno y de anticuerpos, evitando la entrada de animales que puedan reintroducir el virus. Aunque la positividad a anticuerpos no indica que el animal porte la infección, hay que tener en cuenta la incorporación de animales seropositivos preñados (fig.10). Estos animales, sobre todo si no se tiene información de la explotación de origen, pueden ser portadores de un PI e introducir la enfermedad en el

momento del parto o del aborto. En el caso de incorporar un animal de estas características se deberá mantener en cuarentena hasta el parto y realizar inmediatamente las pruebas de antígeno al ternero. Actualmente es la principal causa de reintroducción de la enfermedad en un rebaño.

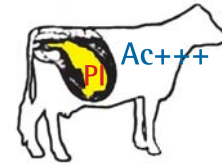


Fig.10: Vaca portadora de PI.

Las medidas de bioseguridad habituales para las enfermedades infecciosas, junto con la monitorización periódica de la explotación, son la mejor herramienta para evitar la introducción de la BVD. La vacunación es una herramienta que puede apoyar estas medidas, pero que por sí sola no impedirá la presencia de nuevas infecciones.

Bibliografía

- ARNAIZ I, EIRAS C, DIÉGUEZ FJ. (2010). LA DIARREA VÍRICA BOVINA, UNA ENFERMEDAD QUE SE PUEDE CONTROLAR. GANADERÍA, DIC: 70: 30 - 33.
- BROWNLIE J. (2007). NEW PERSPECTIVES IN BVD CONTROL (CONGRESO). BUDAPEST.
- DIÉGUEZ, FJ; FOUZ, R; EIRAS, C; MENÉNDEZ, S; CALVO, C; ARNAIZ, I; YUS, E. (2009). MANUALES DE GESTIÓN SANITARIA DE DIARREA VÍRICA BOVINA (BVD), RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA (IBR) Y PARATUBERCULOSIS BOVINA. ISBN: 978-84-612-7401-7.
- EIRAS C, ARNAIZ I (2007). EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO COMO HERRAMIENTA PARA EL CONTROL DE LA DIARREA VÍRICA BOVINA. PRODUCCIÓN ANIMAL 232: 4-16.
- KRAMPS JA, BANKS M, BEER M, KERKHOF P, PERRIN M, WELLENBERG GJ, OIRSCHOT JT (2004). EVALUATION OF TESTS FOR ANTIBODIES AGAINST BOVINE HERPESVIRUS 1 PERFORMED IN NATIONAL REFERENCE LABORATORIES IN EUROPE. VET MICROBIOL SEP 8;102(3-4):169-81.
- MAKOSCHY B, FRANKEN P, MARS JM, DUBOIS E, SCHROEDER C, THIRY J, ALVAREZ M, RYPUŁA K, CAVIRANI S, ARNAIZ I, HOUTAIN JY, BARTAK P, BROWNLIE J, WOLF G, MEYER G, KLEES W, BEER M, MOENNIG V, THIRY E. (2010). IBR AND BVD CONTROL: THE KEY TO SUCCESSFUL HERD MANAGEMENT. BERL MUNCH TIERARZTL WOCHENSCHR. NOV-DEC;123(11-12):519-21.

