



Rafael Paiva

Diagnóstico de enfermedades de alto impacto económico

Rafael Paiva

Esp. en Reproducción Bovina
Universidad del Zulia
(Venezuela)

Médico Veterinario
Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado
(Venezuela)

Cargo actual:
Gerente de Bovinos y Leche para Latinoamérica en Idexx

rafael-paiva@idexx.com
Venezuela - Estados Unidos

Christoph Egli
Idexx Laboratories Inc.

Jorge Orjuela
Aqualab

Resumen

Los virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB) y la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR por sus siglas en inglés) son unos de los más importantes y patogénicos en ganado bovino, que causan pérdidas considerables en la industria de leche y carne del mundo. Dos estudios fueron realizados en Costa Rica y Colombia en los que se vigilaron y monitorearon las muestras de tanque de leche para medir los anticuerpos contra DVB, en 92 explotaciones lecheras, en Costa Rica, y en Colombia, en 113 hatos para DVB y 117 hatos para IBR. El fin de los estudios era analizar el movimiento del nivel de estos anticuerpos durante un periodo de tres meses.

En Costa Rica, la prevalencia resultante por finca para DVB fue de 79,35%. En Colombia el 64,1% de las explotaciones estudiadas

fueron positivas para IBR y el 88,49% fueron positivas para DVB. Se encontró que esta vigilancia y monitoreo fue posible realizarla con muestras de tanque de leche. Tomadas en forma continua y organizada, estas se constituyen en una herramienta que ayuda a medir los niveles de anticuerpos contra la DVB y la IBR en rebaños lecheros. Explotaciones con alta probabilidad de tener un animal persistentemente infectado (PI) en su rebaño son identificadas por niveles de anticuerpos altos que se mantienen en el tiempo. Con estos datos, las pruebas de antígeno para detectar los PI tienen soporte técnico y económico.

Palabras clave

Anticuerpos, monitoreo, muestra de tanque de leche, vigilancia.

Abstract

Bovine Viral Diarrhoea (BVD) and the Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) are some of the most important pathogenic viruses in cattle, causing considerable losses in the dairy and beef industries worldwide. Two studies were made in Costa Rica and Colombia, where it was made surveillance and monitoring of bulk tank milk samples to measure antibodies against BVD in 92 dairy farms in Costa Rica, and Colombia, in 113 herds for DVB and 117 herds for IBR. The aim of the studies was to analyze the movement of the antibody level during a three months period.

In Costa Rica, the resulting prevalence per farm for DVB was 79.35%. In Colombia 64.1% of the farms studied were positive for IBR and 88.49% were positive for DVB.

It was found that with bulk tank testing, surveillance and monitoring of antibody levels is possible. Bulk tank testing in a scheduled and continuous way is a helpful tool to measure antibody levels against BVD and IBR in dairy herds. Due to antibody tests, farms with high probability to have a persistently infected animal (PI) in their herd can be identified by high and continuous antibody levels. With the study results, antigen testing has technical data support and justifies its investment.

Key words

Antibodies, bulk tank, milk samples, monitoring, surveillance.

.....

Introducción

Vigilancia es definida como “todas las actividades regulares enfocadas en determinar el estatus sanitario de una población dada, con el objeto de la detección temprana y control de enfermedades de importancia económica nacional, seguridad alimentaria y comercio”. Monitoreo es “toda actividad realizada con el objeto de detectar cambios en los parámetros epidemiológicos de una enfermedad específica” (Fao, s.f.).

La clave para el éxito en epidemias es la detección temprana. Si una enfermedad puede ser detectada temprano, en la fase de desarrollo epidémico, existe una alta posibilidad de que sea controlada y eliminada antes de que cause daños (Fao, s.f.).

Los virus de: la Diarrea Viral Bovina (vDVB), la Enfermedad de la Frontera (Border Disease Virus - BDV) y del Cólera Porcino (Classical Swine Fever Virus - CSFV) son tres miembros del género *Pestivirus*

dentro de la familia *Flaviviridae*. El vDVB es uno de los más importantes desde el punto de vista patogénico, en el ganado bovino. Este causa pérdidas considerables en la industria láctea y de carne en todo el mundo. Los síntomas típicos son diarrea y fiebre, seguidas por una reducción en la producción de leche. La inmunosupresión potencia infecciones por otros microorganismos.

El virus cruza la placenta en vacas gestantes infectadas, lo que causa pérdidas económicas por abortos, natimortos y muertes peri-natales. Algunos terneros que sobreviven son inmunotolerantes al virus y excretan grandes cantidades del mismo durante toda su vida. Es importante identificar estos “portadores” para romper el ciclo infeccioso dentro del rebaño. El animal portador generalmente muere de “enfermedad de las mucosas” en los primeros dos años de vida.

La identificación temprana de las enfermedades que afectan a los bovinos se puede conseguir por medio de una adecuada vigilancia. Su efecto radica en reducir los brotes y focos que incrementan los costos de producción, reducen las posibilidades de intercambio y disminuyen el tamaño del rebaño. La vigilancia debe ser realizada en forma continua durante un año para entender la dinámica de los anticuerpos

en el rebaño. Cada rebaño es único, con su manejo, genética, nutrición, programa sanitario, ecosistema y micro clima; esto conlleva a una dinámica individual de los anticuerpos para cada enfermedad, lo cual no permite la aplicación de vacunas en intervalos específicos como se ha hecho hasta ahora.

Los resultados de las pruebas de anticuerpos en tanque de leche proveen una vista momentánea y repetible del estatus del anticuerpo en un rebaño. Es importante hacer notar que una sola muestra puntual solo brinda una guía aproximada. En muchas situaciones, es prudente remitir muestras repetidas para confirmar los resultados antes de tomar decisiones, particularmente cuando los resultados preliminares no coinciden con la historia sanitaria y los factores de riesgo del rebaño (Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, 2013).

Las muestras de leche en tanques son usadas para determinar el estatus de anticuerpos del rebaño y para monitorear cambios en sus niveles. Es una alternativa simple y económica en comparación del muestreo serológico. Estas permiten iniciar investigaciones en distintas enfermedades a costos mínimos, proveen alertas tempranas para la introducción de nuevas infecciones y promueven el interés en

bioseguridad, adicionalmente hacen parte del panorama de la explotación (Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, 2013).

En un estudio en Escocia, que se hizo de 2007 a 2008, se tomaron muestras de tanque de 374 explotaciones lecheras. Los resultados mostraron un 73% de prevalencia en rebaños con altos niveles de anticuerpos. La inclusión de DVB en el plan sanitario de las explotaciones se asoció con la disminución de anticuerpos en tanques de leche (Humphry, Brülisauer, McKendrick, Nettleton & Gunn, 2012).

Allí se hicieron pruebas para detectar la presencia de DVB por Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR del inglés *Reverse transcription polymerase chain reaction*) en muestras de leche de los rebaños bajo estudio. En cuatro de ellos se detectó la presencia de animales persistentemente infectados (PI). Muestras de suero individuales se tomaron posteriormente de cada vaca y fueron analizadas por RT-PCR y captura de antígeno por Elisa para identificar los animales PI. En las pruebas individuales se encontró 1/223, 1/130, 2/800 y 1/275 de animales PI respectivamente en los cuatro establecimientos. Luego de remover los PI de los rebaños, se tomaron nuevas

muestras de tanque de leche, las cuales resultaron negativas a DVB por RT-PCR. Todos los animales PI identificados por esta metodología estaban en el segmento del 10 al 20% de los animales de menor producción del rebaño.

En Nueva Zelanda, esta aproximación a muestreo dirigido utilizando la tecnología PCR en conjunto con información de producción, ha reducido marcadamente los costos de diagnóstico para DVB. Un cuestionario de seguimiento en 81 establecimientos positivos a DVB (15% de los analizados) indicó que la identificación estratificada fue capaz de identificar los animales PI en producción, en el 90% de los casos, y redujo el número de pruebas individuales a un 12% en el rebaño en producción (Hill, Reichel & Tisdall, 2010).

La evaluación de los niveles de anticuerpos por vacunación no es utilizada en la industria bovina. El uso de líneas base, vigilancia continua y monitoreo es una tecnología no aplicada por ganaderos de leche alrededor del mundo.

La recolección de muestras de leche es sencilla, las plantas de leche tienen la logística y el procedimiento bien estandarizado. La frecuencia del muestreo puede ser aumentada por los bajos costos. Las muestras pueden ser tomadas

del tanque de leche o de los animales individualmente.

Objetivos del estudio en Costa Rica

- Vigilar y monitorear muestras de leche en tanques de 92 explotaciones lecheras para medir anticuerpos contra DVB.
- Observar la evolución de la dinámica de los anticuerpos contra DVB en un periodo de tres meses
- Realizar pruebas de antígeno de DVB en las explotaciones con altos niveles de anticuerpos contra DVB.

Objetivos del estudio en Colombia

- Vigilar y monitorear muestras de leche en tanques de explotaciones lecheras de Antioquia, para medir anticuerpos contra Rinotraqueitis Infecciosa Bovina - IBR y DVB.
- Evaluar la dinámica de los anticuerpos contra IBR y DVB.

- Correr pruebas de antígeno de DVB a las explotaciones con altos niveles de anticuerpos contra la DVB.

Materiales y métodos

La prueba Elisa utilizada (Idexx* BVDV Total Ab Test) es una prueba de inmunoensayo indirecta, diseñada para detectar anticuerpos contra DVB en muestras de suero, plasma y leche de bovinos. Un formato de microfiltración ha sido configurado para inmovilizar el antígeno de DVB en las placas. Los anticuerpos de DVB en la muestra se unen al antígeno en las placas. Luego de la incubación de la muestra en el pozo, los anticuerpos capturados son detectados por un conjugado anti-bovino de peroxidasa de rábano. Posteriormente, el conjugado libre es lavado y se agrega una solución sustrato cromógeno. En presencia de una enzima, el sustrato se convierte en un producto que reacciona con el cromógeno para generar un color azul. Luego de añadir la solución de preparada, se genera un color amarillo. Se mide la absorbancia a una longitud de onda única de 450 nm [A(450)] o a una longitud de onda dual de 450 nm y 650 nm [A(450/650)] usando un espectrofotómetro. La relación muestra-control positivo es calculada utilizando

la absorbancia [A(450)] o [A(450/650)] obtenida con la muestra problema y el valor del control positivo, corregida por la absorbancia del control negativo. El desarrollo de color indica la presencia de anticuerpos contra DVB en la muestra (resultado positivo).

La prueba de Elisa fue realizada como es descrita por el fabricante en el inserto. Se colectaron muestras del tanque de leche en 92 establecimientos una vez al mes durante tres meses consecutivos. El tanque se homogenizó durante cinco minutos. 200 mililitros de leche se colocaron en una botella plástica, que se mantuvo refrigerada y fue transportada al laboratorio. Las muestras se congelaron posteriormente a -20 grados centígrados para realizar todas las pruebas al mismo momento.

Para el diagnóstico de IBR se utilizó el Idexx IBR gB X3 Test Kit el cual es un ensayo inmunoenzimático para detectar la presencia de anticuerpos frente a IBR/ IPV en suero o leche de bovinos. Esta técnica inmunoenzimática Elisa detecta también las respuestas de anticuerpos inducidas por las vacunas, las cuales contienen la glicoproteína B (gB) de BHV1. La prueba es un Elisa de bloqueo con placas de microtitulación tapizadas con antígenos virales de IBR. Tras incubación de la muestra a analizar en el pocillo tapizado con antígenos, el

anticuerpo específico de IBR forma un complejo con los antígenos virales inmovilizados. Después de eliminar mediante lavado los materiales no unidos, se añade el conjugado de anticuerpos monoclonales específico gB, que no se unirá al antígeno de BHV1 cuando el determinante antigénico haya sido bloqueado anteriormente por anticuerpos de la muestra a analizar. Después se lava la placa para eliminar el conjugado no unido y se añade una solución de sustrato cromógeno. En presencia de la enzima, el sustrato se convierte en un producto que reacciona con el cromógeno, generando una coloración azul. Con la adición de la solución de frenado se genera un color amarillo. La absorbancia se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda única de 450 nm [A(450)] o doble de 450 nm y 650 nm [A(450/ 650)]. El porcentaje de bloqueo de las muestras se calcula usando la absorbancia [A(450)] o [A(450/650)] obtenida con la muestra analizada y un suero negativo que contiene anticuerpos no específicos.

Resultados para el caso costarricense

En Costa Rica, las fincas en estudio tuvieron dos ordeños por día y

alimentación a base de pasto principalmente, con una ración de concentrado durante el ordeño. Los programas de vacunación contra la IBR y la DVB tienen un amplio rango de métodos e intervalos de aplicación. Para ello se utilizan diferentes marcas de vacunas, con niveles variables de buenas prácticas de aplicación y manejo de los productos. Las vacunas a virus muerto son las más utilizadas. De los 92 establecimientos, 52 no tenían plan sanitario contra estas enfermedades.

La prueba Elisa de DVB para captura de antígeno fue realizada a todo el rebaño en una sola de las haciendas. La muestra utilizada fue muesca de oreja de 1 centímetro aproximadamente. La piqueteadora o muescadora se lavó en agua, luego en una solución clorada y, luego, fue enjuagada nuevamente con agua. Las muescas de oreja se guardaron en botellas plásticas y fueron enviadas al laboratorio para su análisis.

Se utilizó el Idexx BVDV Ag/ Serum Plus Test que es una prueba de inmunoensayo diseñada para detectar antígenos de DVB en suero, plasma, sangre completa y muesca de oreja. Un formato de microfiltración se ha configurado para inmovilizar anticuerpos monoclonales específicos a DVB (Erns) en las placas.

Tabla 1.

Prevalencia de la DVB por finca.

	#	%
Positivo	73	79,35
Negativo	19	20,65
Total	92	100,00

La prevalencia por finca encontrada fue de 79,35 % (73 de 92), medida por el promedio de la relación “cantidad de muestras”/“resultados positivos”, de los muestreos tomadas en marzo, abril y mayo de 2013. (Tabla 1).

En la Figura 1 se observan los niveles de anticuerpos para la DVB de las 92 fincas en estudio, organizados de menor a mayor cantidad de anticuerpos. Hay 7 establecimientos negativos, esto significa que los animales no han estado en contacto con el virus. Hay 10 haciendas con niveles de anticuerpos por encima de la desviación estándar, lo que sugiere contacto con el virus (animales PI). Fincas negativas con ciertos niveles de anticuerpos sugieren que algunos animales han estado en contacto con el virus a bajo nivel o hace mucho tiempo.

El coeficiente de variación, 58,81%, demuestra una alta variación de niveles

de anticuerpos entre las explotaciones, debido a las diferencias de planes sanitarios, vacunas usadas, intervalos de vacunación, estatus inmunitario del rebaño y manejo.

En explotaciones con altos niveles de anticuerpos, hay altas probabilidades de encontrar animales PI. Por lo tanto, en esas fincas se procedió a realizar pruebas de antígeno, debido a que los animales PI presentes están infectando constantemente otras vacas que producen anticuerpos contra la DVB.

En el grupo de explotaciones vacunadas hay 4 negativas. Esto es indicativo de que el plan sanitario contra la DVB no está dando los resultados esperados. En esas fincas, el plan de vacunas debe ser evaluado para corregir errores y así tener anticuerpos contra la enfermedad, producidos por las vacunas, que garanticen la protección necesaria. El coeficiente de variación es alto (48,1%), lo que indica niveles de anticuerpos muy diferentes entre las fincas. En las 4 haciendas que tienen los más altos niveles de anticuerpos, incluso estando vacunadas, este resultado puede deberse a la presencia de animales PI en el rebaño (Figura 2).

En la Figura 3 están las haciendas no vacunadas. Allí se observan 16 negativas y 7 con niveles de anticuerpos muy altos. Establecimientos negativos pueden permanecer negativos con un adecuado programa de

bioseguridad, buena cuarentena y pruebas de antígenos a todas las nuevas introducciones y recién nacidos. Haciendas con altos niveles de anticuerpos pueden ser seleccionadas para pruebas de antígenos debido a

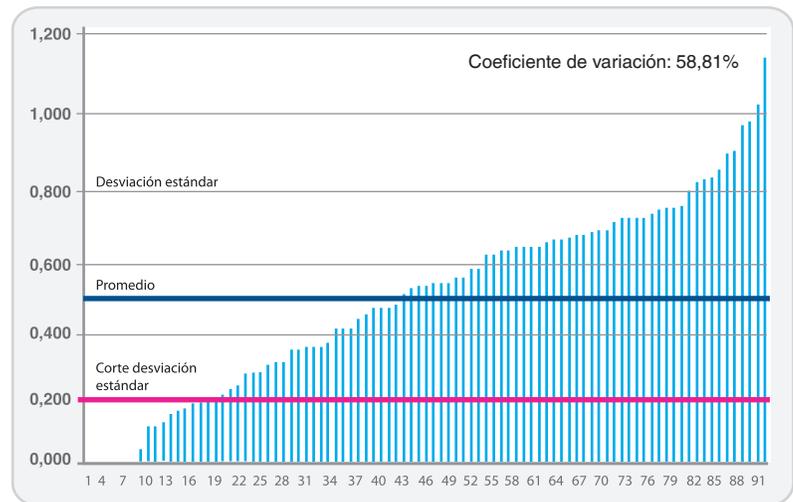


Figura 1.

Anticuerpos del vDVB en tanque de leche en todas las fincas.



Figura 2.

Anticuerpos del vDVB en tanques de leche de las fincas vacunadas (n=40).

la alta probabilidad de encontrar animales PI.

La Figura 4 muestra todas las 92 haciendas estudiadas segregadas según el tiempo transcurrido desde la última vacunación, no hay diferencia

significativa entre los coeficientes de variación. Los mayores niveles de anticuerpos se encuentran en el grupo con más de 12 meses de vacunadas, los otros 3 grupos no tienen diferencias. En el grupo de 6-9 meses hay una finca con niveles de anticuerpos muy altos

que sugiere la presencia de animales PI.

El promedio de anticuerpos en cada mes (marzo, abril y mayo de 2013), de las 92 explotaciones, se muestra en la Figura 5. La relación “cantidad de muestras”/”resultados positivos” disminuye de abril a mayo aunque siguen manteniéndose positivas, con niveles de anticuerpos dos veces el punto de corte.

Los niveles de anticuerpos por zona se muestran en la Figura 6. Todas las 4 zonas estudiadas tienen la misma disminución de anticuerpos de marzo a mayo de 2013. La zona con mayores anticuerpos (Coronado) corresponde a la zona con más bajo nivel en tecnología, manejo animal y nutrición. La zona con menores anticuerpos (Alajuela) corresponde con las unidades de producción de más alta tecnología aplicada y mejor manejo animal, nutrición y programas sanitarios.

Luego de los resultados obtenidos en la Figura 3, la finca con niveles más altos de anticuerpos (No. 52) fue seleccionada para pruebas de antígenos, por ser la que tiene mayores probabilidades de tener un animal PI en el rebaño. Se realizaron 288 pruebas de todos los grupos etáreos (100% del rebaño), de donde se concluyó que dos animales eran PI, ambos hembras entre 18 y 20 meses de edad. La prevalencia encontrada fue del 0,7% (Tabla 2).

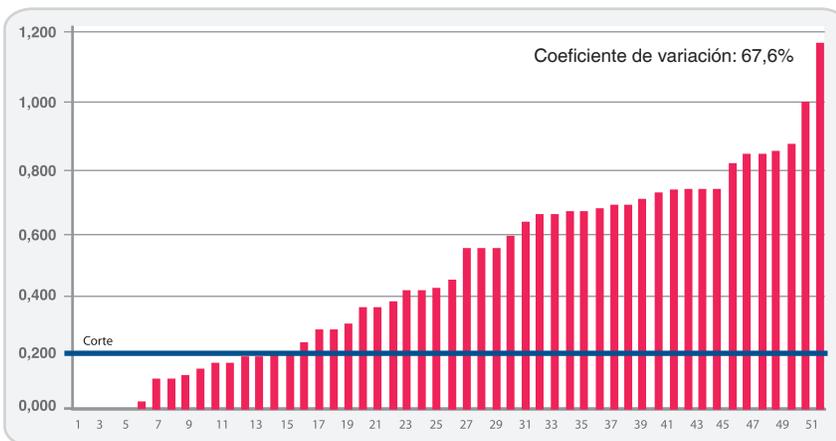


Figura 3.

Anticuerpos del vDVB en tanques de leche de fincas no vacunadas (n=52).

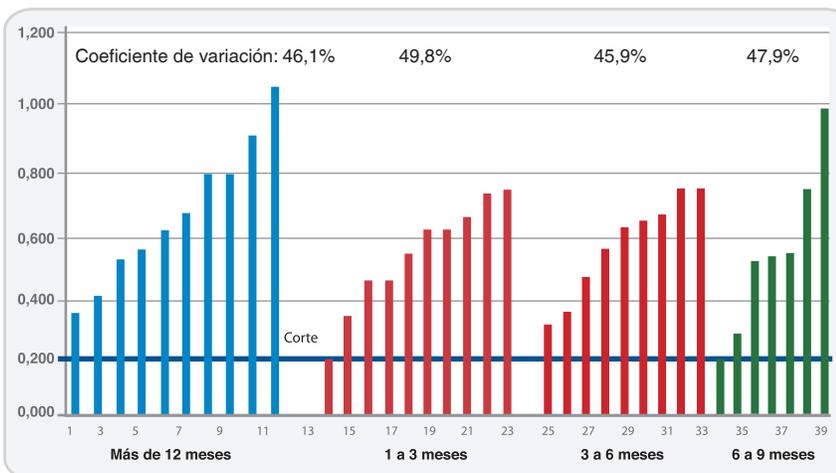


Figura 4.

Anticuerpos del vDVB en tanque de leche según tiempo de vacunación.

Tabla 2.

Prevalencia de antígeno de DVB. Hacienda No. 52.

	#	%
Positivo	286	99,30
Negativo	2	0,70
Total	288	100,00

Resultados para el caso colombiano

Las fincas en estudio están localizadas en los altiplanos norte y oriente del departamento de Antioquia, con dos ordeños por día y alimentación a base de pasto principalmente, con una ración de concentrado durante el ordeño.

La prevalencia a la DVB por finca fue de 88,49% (100/113), medida por el promedio de la relación “cantidad de muestras”/“resultados positivos” en dos muestreos (Tabla 3).

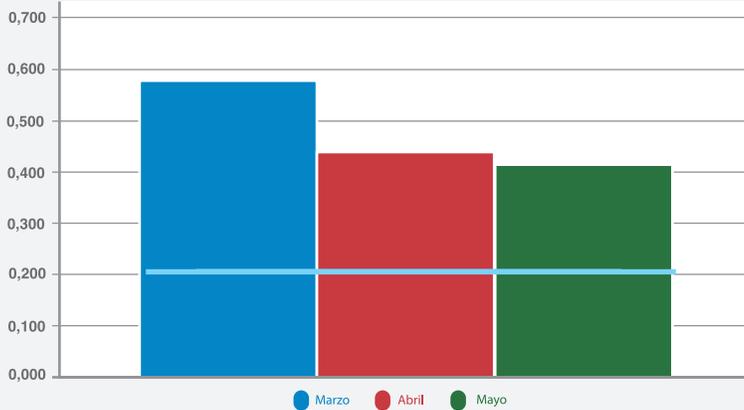


Figura 5.

Anticuerpos del vDVB en todas las fincas durante los tres meses de estudio.

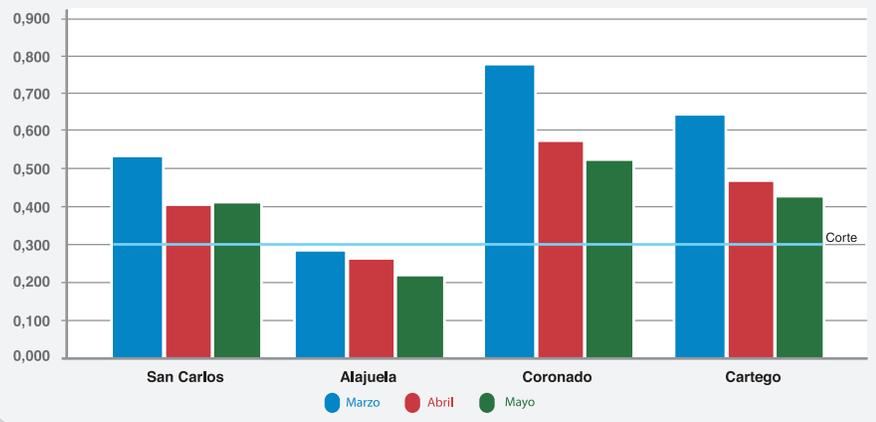


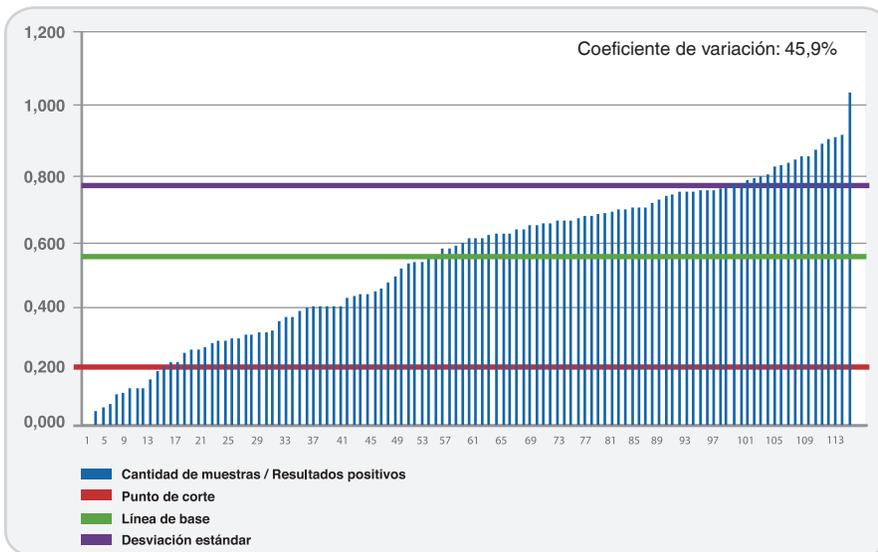
Figura 6.

Niveles de anticuerpos del vDVB por zona.

Tabla 3.

Prevalencia por finca a DVB en Antioquia, Colombia.

	#	%
Positivo	100	88,49
Negativo	13	11,51
Total	113	100,00

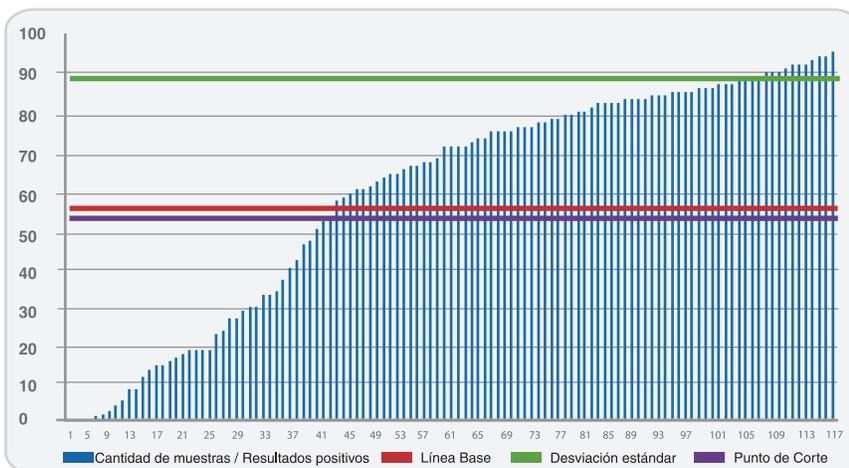

Figura 7.

Anticuerpos contra DVB. Antioquia, Colombia.

En la Figura 7 se observan los niveles de anticuerpos para DVB de las 113 fincas en estudio arreglados de menor a mayor cantidad de anticuerpos. Hay 13 establecimientos negativos, esto sugiere que los animales no han estado en contacto con el virus. Hay 17 haciendas con niveles de anticuerpos por encima de la desviación estándar lo que sugiere contacto con el virus (animales PI). Fincas negativas con ciertos niveles de anticuerpos sugieren que algunos animales han estado en contacto con el virus a bajo nivel o hace largo tiempo.

El coeficiente de variación, 45,9%, demuestra una alta variación de niveles de anticuerpos entre las explotaciones debido a diferentes planes sanitarios, diferentes vacunas usadas, intervalos de vacunación, estatus inmunitario del rebaño y manejo.

En explotaciones con altos niveles de anticuerpos hay altas probabilidades de encontrar un animal PI por lo que se recomienda realizar pruebas de antígeno, esto debido a que los animales PI presentes están infectando constantemente otras vacas que producen anticuerpos contra la DVB.


Figura 8.

Anticuerpos contra IBR. Antioquia, Colombia.

Tabla 4.

Prevalencia por finca a IBR en Antioquia, Colombia.

	#	%
Positivo	75	64,1
Negativo	42	35,9
Total	117	100,00

La prevalencia de IBR por finca se observa en la Tabla 4. Allí, el 64,1% de los tanques muestreados son positivos (75/117).

En la Figura 8 están reflejados los niveles de anticuerpos contra IBR de todos los tanques de leche muestreados, ordenados de menor a mayor. Hay 42 fincas negativas y 11 que están por encima de la desviación estándar.

Con ambas enfermedades es muy importante determinar el plan sanitario a implementar y si se aplica vacunación, el intervalo de la misma y la época de vacunación, además de la bioseguridad en la explotación para poder evaluar la cinética de los anticuerpos en cada caso.

Conclusiones

Con muestra de leche en tanques, el diagnóstico, vigilancia y monitoreo de niveles de anticuerpos es posible en rebaños de vacas lecheras.

Las pruebas de leche en tanques, realizadas de forma organizada, programada y continua, constituyen una herramienta útil para medir los niveles de anticuerpos presentes para el vDVB en los rebaños de producción lechera.

Explotaciones con alta probabilidad de tener un animal PI en su rebaño pueden ser identificadas por presentar niveles de anticuerpos altos y continuos. Pruebas dirigidas pueden ser realizadas posteriormente para identificar los animales PI y confirmar los resultados encontrados en el tanque de leche.

Las muestras de leche en tanques deben ser tomadas en forma constante para poder observar la cinética de los anticuerpos en el rebaño. Esto permite evaluar el manejo y el plan sanitario que se realiza contra la enfermedad estudiada.

Mayor cantidad de muestras deben ser evaluadas para hacer una adecuada vigilancia y monitoreo de los niveles de anticuerpos en una explotación.

Referencias

Animal Health and Veterinary Laboratories Agency. (2013). *Bulk Milk Testing in Cattle*. TC0123.

Fao - Food and Agriculture Organization of the United Nations (s.f.). *Agriculture and Consumer Protection. Manual on Livestock Disease Surveillance and Information Systems*.

Hill, F.I., Reichel, M.P. & Tisdall, D.J. (2010). Use of molecular and milk production information for the cost-effective diagnosis of bovine viral diarrhoea infection in New Zealand dairy cattle. *Vet. Microbiol.*, 142(1-2), 87-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.047

Humphry, R.W., Brülisauer, F., McKendrick, I.J., Nettleton, P.F., & Gunn, G.J. (2012). Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and associated risk factors in Scottish dairy herds. *Vet Rec.*, 171(18), 445. doi: 10.1136/vr.100542.■