EVALUACIÓN DE NIVELES DE ANTICUERPOS GENERADOS CONTRA EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB) A PARTIR DE LA INMUNIZACIÓN CON DIFERENTES MARCAS COMERCIALES DE VACUNAS

EVALUATION OF LEVELS OF ANTIBODIES GENERATED AGAINST BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) FROM IMMUNIZATION WITH DIFFERENT COMMERCIAL BRANDS OF VACCINES.

Báez Escalante M¹, Lara Núñez M¹, González de Vicioso A¹, Ortega Pérez Ó¹, Valenzano Ozuna P¹, Aponte Acha G¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Ciencias Fisiológicas. San Lorenzo – Paraguay

RESUMEN. El presente trabajo es un estudio retrospectivo cuyo objetivo fue determinar los niveles de anticuerpos generados (respuesta inmunitaria) contra el virus de la diarrea viral bovina (DVB) entre tres marcas comerciales de vacunas disponibles en el mercado, en un establecimiento localizado en el distrito de Teniente Picco, Chaco Paraguayo. Para el efecto se utilizaron registros de análisis de animales de la especie bovina, mestizos, hembras de 24 meses (promedio) distribuido en tres lotes, en los cuales los lotes A y B contaron con 14 animales y el lote C con 21 animales, que entraron a servicio, sin previa inmunización, en los cuales se midió el nivel de anticuerpos generados posterior a la vacunación contra DVB. Los promedios totales de titulación de anticuerpos encontrados fueron para la vacuna A 104,9, la B 94,83 y la C 99,22. Los análisis se hicieron en un laboratorio privado, y los resultados de los análisis se utilizaron para comparar la diferencia de los niveles de anticuerpos entre las tres vacunas comerciales. Los resultados no presentaron diferencias estadísticamente significativas, entre los tres grupos de animales inmunizados con las diferentes vacunas.

Palabras claves: retrospectivo, niveles, vacuna, DVB, anticuerpo.

ABSTRACT. This work is a retrospective study whose objective was determinate the levels of antibodies generated against bovine viral diarrhea (BVD) from immunization with different vaccine trademarks available in the market, in a farm in the district of colonia Teniente Picco, Paraguayan Chaco. For the purpose analysis records were used, that were made to bovine animals, mestizos, females of 24 months (average) distributed in 3 lots, in which lots A and B had 14 animals and lot C with 21 animals, that entered service, previous without immunization, in which the level of antibodies generated after vaccination against BVD was measured. The total titration titers of antibodies found were for vaccine A 104.9, B 94.83 and C 99.22. Analyzes were done in a private laboratory, and the results of the analyzes were used to compare the difference in antibody levels between the three commercial vaccines. The results showed that no statistically significant differences could be observed between the three groups of animals immunized with the different vaccines.

Key words: retrospective, levels, vaccine, DVB, antibodies

doi: 10.18004/compend.cienc.vet.2018.08.02.07-12

Dirección para correspondencia: Dra. Mónica Báez Escalante - Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Asunción - Casilla de Correo N° 1061 - Ruta Mcal. Estigarribia Km 10,5 - Campus Universitario - San Lorenzo - Paraguay

E-Mail: mbaez@vet.una.py

Recibido: 28 de junio de 2018/ **Aceptado:** 02 de noviembre de 2018

INTRODUCCIÓN

La diarrea viral bovina, enfermedad de las mucosas o el complejo patológico del pestivirus bovino es una enfermedad viral infecciosa de curso agudo, que se caracteriza por producir hemorragias y erosiones en la mucosas oral, gástrica e intestinal, además de diarrea. El nombre del virus se asignó debido a las principales manifestaciones de la enfermedad que presentaba el ganado, con diarreas y lesiones erosivas en el tracto digestivo (1).

Los aislados de BVDV presentan una gran variabilidad antigénica, y pueden ser divididos en dos grupos genéticos y antigénicamente distintos, siendo identificados como dos especies virales: BVDV-1 y BVDV-2 (2), siendo posteriormente divididos oficialmente en dos especies distintas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). La baja reactividad serológica entre los aislados y, principalmente, entre los grupos dificulta el diagnóstico y la prevención por vacunación (3).

Varios estudios demuestran que estos agentes están ampliamente distribuidos en el rebaño bovino brasileño, pero su prevalencia real es desconocida. Esto se debe, sobre todo, a la falta de estudios seroepidemiológicos amplios y representativos, así como el uso creciente de la vacunación, cuya respuesta serológica es indistinguible de aquella inducida por la infección natural (4).

La diarrea viral bovina (DVB) es una enfermedad de distribución mundial y tiende a ser enzoótica en la mayoría de las poblaciones bovinas, alcanzando prevalencias de 60 a 80% (5).

La enfermedad ocasiona pérdidas económicas en la industria lechera, ya que el animal infectado puede disminuir la producción de leche, así como presentar fallas reproductivas, desórdenes respiratorios o digestivos, y retardo en el crecimiento, entre otros trastornos (5).

Estas pérdidas se relacionan con el aumento en el número de días abiertos, abortos, disminución en la calidad de semen, así como en los costos de tratamiento en animales enfermos y en las pérdidas de producción (6).

Tiene alta morbilidad y baja mortalidad, encontrándose diseminado en todo el mundo,

aunque el grado de difusión varía entre regiones y países. La prevalencia de seropositivos, en los países donde ha sido evaluada, varía entre 50 y 90%. Los títulos de anticuerpos generados por los bovinos, infectados naturalmente con la DVB, disminuyen lentamente y por lo común permanecen toda la vida del animal (1).

Las estrategias de erradicación dependen de la situación epidemiológica regional; básicamente consisten en la identificación y eliminación de bovinos persistentemente infectados, principal fuente de infección y reservorio del virus (7).

A pesar del uso extendido de la vacunación, ésta no ha logrado la reducción de la prevalencia e incidencia de la DVB y actualmente se usa para prevenir el pasaje del virus al feto, así como para evitar las fallas reproductivas causadas por el virus. Los títulos de anticuerpos generados por los bovinos, una vez que han sido infectados naturalmente con el VDVB, disminuyen lentamente y por lo general permanecen durante toda la vida del animal (8).

Existen diferentes tipos (referido a eficacia y seguridad) de vacunas contra DVB tanto en vías de desarrollo como disponibles en el mercado. Tanto las vacunas a virus vivo como a virus inactivado están presentes en el ámbito internacional, no obstante, en nuestro país sólo están autorizadas las vacunas inactivadas (9).

Un apropiado protocolo de vacunación debe seleccionar el antígeno correcto, con liberación óptima y en el tiempo correcto logrando una respuesta que pueda proteger al animal; en general, una respuesta inmune exitosa debe producir la misma respuesta humoral y celular que las resultantes de una infección natural, con mínimos efectos adversos para la salud del animal. El virus de la DVB presenta tropismo hacia células linfoides, pudiendo generar distintos grados de inmunosupresión, que pueden llegar a la tolerancia, impidiendo de esa manera que la inmunidad ejerza mecanismos efectivos para su control (9).

En el Paraguay los estudios referentes al impacto de las enfermedades reproductivas, y entre ellas de la diarrea viral bovina, aún son escasos y no existe un real conocimiento de la prevalencia de la infección en las distintas regiones ganaderas. Datos aportados por el laboratorio CEDIVEP S.R.L. de San Lorenzo, Paraguay dan cuenta de una incidencia de

39.6%, con un número de 11.463 de casos positivos, sobre un total de 28.976 muestras analizadas.

A nivel internacional la prevalencia de esta enfermedad es estudiada, pero los datos no aportan mucha información sobre el verdadero estado de la enfermedad. Tal es el caso de Brasil en donde varios estudios demuestran que el agente está ampliamente distribuido en el rebaño bovino, pero su prevalencia real es desconocida (10)

Para un control eficiente de la enfermedad es importante que la vacunación confiera altos niveles de protección para la madre y para el feto; así mismo, que la vacuna proteja contra los dos genotipos de VDVb (11).

El objetivo general de esta investigación es aportar datos sobre distintos aspectos de la diarrea viral bovina y buscar conocer los niveles séricos de anticuerpos generados contra el virus de la diarrea viral bovina (DVB) utilizando tres marcas comerciales de vacunas disponibles en el mercado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los registros utilizados en este trabajo de investigación son resultado de un esquema de inmunización realizado en los meses de agosto, setiembre y octubre del año 2013. Se efectuaron tres muestreos diferentes, uno por mes. En un solo establecimiento se formaron tres lotes de animales. El lote A con 14 animales, lote B con 14 animales y lote C con 21 animales; cada lote recibió un tipo de vacuna diferente, las vacunas utilizadas fueron A, B y C todas a virus atenuado.

Previamente a la primovacunación se procedió a la toma de muestra de sangre, mediante punción de la vena coccígea, para la medición de niveles de anticuerpos. Las muestras fueron remitidas a un laboratorio privado, empleándose el método del test de ELISA indirecto por medio de kit comercial, para la cuantificación de anticuerpos en suero mediante una lectura de la densidad óptica y expresada en porcentaje.

Se utilizaron 87 bovinos de razas mixtas, con edad entre ocho y doce meses, previamente probados y seronegativos para BoHV-1 y 5 y BVDV-1 y 2 por la prueba de virus neutralización (12).

La segunda toma se realizó a los 30 días con su respectiva extracción de muestras; más un último muestreo a los 30 días siguientes.

Los datos generados en las planillas correspondientes, fueron clasificados según los niveles de anticuerpos en dos categorías: negativo (rango menor a 30 títulos de anticuerpos), y positivo (rango mayor a 30 títulos de anticuerpos). Estos datos fueron cargados según los lotes de animales en estudio, tabulados y sometidos al análisis estadístico correspondiente.

Para comparar las medias de los muestreos utilizando las tres vacunas, se analizó la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el test de ANOVA de dos factores mediante el paquete estadístico SPSS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo consistió en el análisis de los registros de las inmunizaciones realizadas en el año 2013 en un establecimiento localizado en Teniente Pico, Chaco Paraguayo. El principal objetivo fue determinar los niveles de anticuerpos generados (respuesta inmunitaria) contra el virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB) entre tres marcas comerciales de vacunas disponibles en el mercado, donde las vacunas A, B y C contenían virus inactivado.

Se realizaron tres muestreos, con intervalo de un mes entre cada uno. El muestreo 1 fue realizado el mismo día previo a la primera vacunación, el muestreo 2 se realizó al cabo de un mes y coincidió con la aplicación de la dosis de refuerzo y el muestreo 3 se realizó un mes posterior al muestreo 2, siendo dos meses del inicio del trabajo.

Describiendo y analizando el comportamiento de los grupos inmunizados con las vacunas A, B y C, se puede observar un promedio similar entre ellas. En el primer muestreo previa a la primovacunación los títulos de anticuerpos para la vacuna A fueron de 104, para la B 88,36 y la C 91,86. En cada lote se puede observar coeficientes de variación un tanto elevados, lo que indicaría una respuesta heterogénea entre los individuos de cada lote.

En el segundo muestreo, correspondiente a la segunda vacunación, existió un leve descenso de

titulación de anticuerpos de parte de las tres vacunas. En el último muestreo las vacunas B y C indujeron aumento de títulos de anticuerpos respecto del muestreo 2. Por otro lado, la vacuna A presentó títulos de anticuerpos un tanto menores; debido a una pobre respuesta vacunal. En todos los muestreos y con las tres vacunas se mantuvo el comportamiento heterogéneo de los individuos en cuanto a la titulación de anticuerpos. Cabe destacar que sí se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de muestreo para cada tipo de vacuna utilizada, según se denota en la Tabla 1.

Tabla 1. Media (M) y error estándar (EE) de muestreos en diferentes tiempos, en distintos lotes, diferenciados de acuerdo a la vacuna utilizada. Teniente Pico, Paraguay, 2017.

Vacuna	Muestreo 1		Muestreo 2		Muestreo 3	
	M ± EE	CV	Media (%)	DECV	Media (%)	DECV
A	104,71 ± 39	36,90	103,36 ± 27	26,24	106,50 ± 22	20,76
B	88,36 ± 39	44,41	87,07 ± 33	38,69	109,07 ± 31	28,81
C	91,86 ± 34	36,68	90,19 ± 35	38,94	115,62 ± 39	33,86
TOTAL MUESTREO						
p-valor	0,4597		0,3707		0,6988	

Teniendo en cuenta los títulos de anticuerpos de las tres vacunas evaluadas por cada muestreo no se encontraron diferencias significativas entre las medias, aplicando el análisis estadístico de varianza (ANOVA de dos factores). Realizando el análisis de los datos hallados, en el muestreo 1, se encontró que el porcentaje de animales con titulación de anticuerpos positivos a DVB, fue del 98%, según la escala de análisis utilizada por el laboratorio donde considera positivos valores superiores a 30 títulos de anticuerpos.

Gráfico 1. Comparación de la titulación de anticuerpos en los tres muestreos con vacunas A, B y C. Teniente Pico, Paraguay, 2017. (Curva inmunológica)

Como los animales no fueron previamente inmunizados, si bien con la técnica empleada no se pueden distinguir entre anticuerpos posvacunales y de infección a campo, se presume que los anticuerpos encontrados son producidos por el contacto con el virus a campo, ya que además se contó con informaciones de historial de merma entre hembras preñadas y terneros nacidos de las mismas. El virus de la DVB es de distribución mundial y posee la particularidad de expresarse en dos grupos genética y antigénicamente distintos, siendo identificados como dos especies virales (10).

El porcentaje de positivos observados al inicio es elevado comparando con datos de la región. En el estado de Veracruz, México, la prevalencia encontrada es de 50,6% (13). Por otro lado, reportes de Brasil indican que la prevalencia real en dicho país ha sido hasta el momento difícil de determinar con exactitud, debido a la falta de estudios seroepidemiológicos representativos, así como el uso creciente de vacunas.

Las vacunas inactivadas presentan como principales ventajas su seguridad, estabilidad, y su conservación inalterada durante más tiempo. Sin embargo, suelen inducir una respuesta inmunitaria menor. El comportamiento observado en la baja capacidad de desafiar al sistema inmune resulta un tanto llamativa, pues se esperaría una respuesta inmune superior frente a la primovacunación y el refuerzo correspondiente. Existen casos de animales con infección persistente que presentan viremias durante toda su vida y no producen anticuerpos contra las cepas que les originó inmunotolerancia. Si bien la infección persistente puede cursar con signos, muchos animales son clínicamente normales (7). Sin embargo, analizando la titulación de anticuerpos en cada muestreo, sin tener en cuenta el tipo de vacuna, se observó el impacto de la vacunación con diferencias estadísticamente significativas entre muestreos.

Este hecho abre un nuevo abanico de oportunidades, puesto que al no haber diferencias entre vacunas se podría elegir el tipo de vacuna teniendo en cuenta otros aspectos (marca, precio, tipo), tal como señala la evidencia hay un antes y un después de la vacunación. Esta situación puntual con respecto a la inmunización como método de prevención y control de la DVB ha sido objeto de estudio de varias investigaciones. Tal es el caso de la

investigación realizada en la cual se evaluó la capacidad inmunogénica de ocho vacunas para DVB disponibles en el mercado brasileiro. Sus resultados demostraron que el componente DVB de la gran mayoría de las vacunas no indujeron respuesta neutralizante consistente frente a la DVB-1 y principalmente DVB-2, concluyendo que resulta evidente que las estrategias de formulación en la producción de vacunas deben ser urgentemente revisadas (10). Independientemente de las vacunas utilizadas se observaron incrementos, revelados con el análisis de la interacción entre muestreos. Esta experiencia coincide con otros resultados locales en donde los investigadores indican las limitaciones de la vacunación para la DVB (9). Recalca que la vacunación en sí, no elimina los virus del individuo o del rodeo, pero disminuye las consecuencias negativas sanitarias, reproductivas y económicas que estos ocasionan. El tipo de vacuna, la vía de administración y las características del adyuvante pueden diferenciar la respuesta inmune que influirá en la protección. En los programas de erradicación de la enfermedad se cuenta con dos opciones: una es el control sistémico sin vacunación y la otra es el control sistémico con vacunación. Este último programa se desarrolla en países donde el control mediante la eliminación de animales infectados no son suficientes o viables (11). A pesar de los inconvenientes presentados en la erradicación con la vacunación, esta sigue siendo la opción más viable para nuestro medio; los esquemas de vacunación sugeridos son variados y ampliamente discutidos. Una investigación indica que para un control eficiente de la enfermedad es importante que la vacunación confiera altos niveles de protección para la madre y el feto, sugiriendo una primovacuna con vacuna inactivada y una revacunación al mes con una vacuna a virus modificado con el fin de generar una eficiente inmunidad humoral y celular (11).

Por otro lado, la vacunación posee inconvenientes puesto que el virus tiene una gran capacidad de mutación; por lo tanto, tiene alta potencialidad de mutar en respuesta a una selectiva presión inmunológica. La mutación es una de las estrategias utilizadas para escapar de la respuesta inmune del hospedador y persistir en la población bovina. El control de la infección mediante la vacunación es complicado debido a la diversidad antigénica entre los aislamientos, lo cual compromete la posibilidad de poder establecer un estado de inmunidad cruzada a través de la

vacunación. Las vacunas pueden ser útiles solo cuando se aplica en forma estratégica y sistemática, es decir, como una medida de bioseguridad y conjuntamente con la detección de animales persistentemente infectado o PI y vigilancia permanente (14).

CONCLUSIÓN

El presente trabajo de investigación en el que se evaluó los niveles de anticuerpos generados contra el virus de la diarrea viral bovina (DVB) a partir de la inmunización con diferentes marcas comerciales de vacunas, se puede concluir cuanto sigue: no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de animales inmunizados con las diferentes vacunas; considerando los promedios generales de titulación de anticuerpos para la vacuna A de 104,9, para la B 94,83 y la C de 99,22.

Es importante mencionar el hallazgo encontrado del impacto de la vacunación puesto que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los muestreos, realzando la importancia de incorporar un esquema de vacunación estratégica. Se recomienda para los futuros trabajos de investigación, utilizar animales con información inmunitaria conocida, previa a la primovacuna; realizar muestreos a los seis meses y doce meses de la primera vacunación, a fin de analizar los grupos de animales protegidos durante el tiempo que el laboratorio recomienda revacunar. Por último, comparar los niveles de anticuerpos con los porcentajes de preñez y merma de cada lote según la vacuna con la que fueron inmunizados. También sería de interés la concienciación a los productores del cuidado de la bioseguridad en sus rodeos y remarcar su propia responsabilidad sobre esto, a fin de mantener una situación favorable luego que un programa de vacunación ha sido terminado. Se debe poner un especial esfuerzo en establecer una actitud de persistencia en los objetivos de la comunidad productiva.

BIBLIOGRAFÍAS

1. Hoet A. Bioseguridad para el rebaño. En: C. González-Stangaro, E. Soto-Belloso Manual de ganadería doble propósito. Maracay: Astro Data; 2005. p. (283 - 290)

2. Ridpath JF, Bolin SR, Duboi EJ. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*. [Revista en Internet]. 1994. [acceso 9 de junio de 2013]; 205: 66-74. Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682284716205>>.
3. Bianchi E, Martins M, Weiblen R, Flores F. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* [Revista en Internet]. 2011. [acceso 15 de junio de 2013]; 31: 649 - 655. Disponible en: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v31n8/a03v31n8.pdf>>.
4. Flores EF, Gil LHG, Botton SA, Weiblen R, Fridpath J, Kreutz CK, Pilati C, Driemeyer D, Moojen A, Wendelstein C. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet Microbiol.* [Revista en Internet]. 2000. [acceso 7 de junio de 2013]; 77: 175 - 183. Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113500002741>>.
5. Houe H. Epidemiology of bovine virus diarrhoea. *Bovine viral diarrhoea virus*. *Vet. Clin. Food Anim. Pract (North Am)*. 1995; 11(3): 521.
6. Valle P, Skjerve E, Wayne S, Larsen R, Nyberg O. Ten years of BVDV control in Norway: a cost benefits analysis. *Prev Vet Med.(Amsterdam)*. 2005; 72: 189.
7. Lértora W.J. Diarrea viral bovina: actualización. *Rev Vet (Bs.As.)*. 2003; 14 (1) 42: 51.
8. Lindberg, A., S. Alenius. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet. Microbiol (Amsterdam)*. 1999; 64: 197-222.
9. Nava Lotuffo Z. M., Bracamonte Pérez M. B, Hidalgo Díaz M. A., Escobar Ladrón de Guevara R. T. Seroprevalencia de la diarrea viral bovina en rebaños lecheros de dos municipios del estado Barinas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* [Revista en Internet]. 2013. [acceso 27 de junio de 2018]; 33 (2): 162 - 168. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562013000200014&lng=es.
10. Gogorza L, Morán P, Larghi J, Iglesias M, Pérez A. Vacunación contra la diarrea viral bovina: fortalezas y limitaciones. Tandil: Universidad de Ciencias Veterinarias de la UNCPB. 2001. p. 8.
11. Anziliero D. 2015. Resposta sorológica aos herpes virus bovino tipos 1 e 5 e virus da diarrrea viral bovina induzida por vacinas comerciais. *Ciencia Rural Santa Maria*. [Revista en Internet]. 2015. [acceso 7 de junio de 2018]; 45: 58 - 63. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20130167>.
12. Vargas D, Jaime J, Vera V. Perspectivas para el control del virus de la diarrea viral bovina. *RCCP. (Antq.)*. 2009; 22: 677-688.
13. OIE. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animal. Paris: OIE. 2013. v.1, section 2.4, chapter 2.4.8 and 2.2.13. Disponible en: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acceso en: 3 de agosto 2018.
14. De La Trinidad S H. Seroprevalencia y factores de riesgo de rinotraqueitis infecciosa bovina en ranchos ganaderos de la Choapas, Minatitlán y Moloacan ubicados en la zona sur del estado de Veracruz, México. [Tesis Médico Veterinario Zootecnista]. Veracruz, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2010. 48 p.
15. Hermelinda, R. Evolución del conocimiento sobre la enfermedad de la diarrea viral bovina y su agente etiológico. *Rev Inv Vet Perú. (Lima)*. 2008. 19(2): 176-182.