

SEROEPIDEMIOLOGIA DE LA DIARREA VIRAL BOVINA EN EXPLOTACIONES LECHERAS DE LA SABANA DE BOGOTÁ*

Jorge Luis Parra A.**
Víctor J. Vera A.**
Luis C. Villamil J.**
Gloria C. Ramírez N.**

RESUMEN

La actividad del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) en Colombia data de 1975 en un lote de novillas importadas de Holanda. En la Sabana de Bogotá, se demostró su presencia en 1987 asociada a cuadros clínicos tales como aborto y retardo en el crecimiento.

La presente investigación se desarrolló en 4 fincas bovinas lecheras, no vacunadas, de la Sabana de Bogotá, Colombia, a 2600 m.s.n.m., escogiendo al azar 21-25 animales por finca en forma proporcional a los grupos de edad. Cada 30 días en promedio se sangraron 96 animales, de los cuales el 13% fueron terneras, el 17% novillas y el 71% vacas. Se colectaron 1048 sueros que fueron sometidos a la prueba de seroneutralización con 100 DITC50% de la cepa Singer en diluciones dobles desde 1:4 hasta 1:8192 en cultivos de RFB suplementados con SFB al 10% libre de VDVB-NCP.

Para el análisis de los resultados se construyó una base de datos en el programa panacea y se aplicó estadística descriptiva, análisis de varianza, regresiones y procedimientos no paramétricos.

De las diversas cepas virales empleadas junto con dos procedimientos básicos de cosecha viral, se determinó que los títulos virales más altos ($10^{7.0}$) se obtuvieron con la cepa viral Singer en cultivo de Riñón Fetal Bovino (RFB) empleando el procedimiento de congelación-descongelación de los sobrenadantes del cultivo celular.

De los 1048 sueros bovinos examinados, el 56% presentaron títulos 1:4, siendo la reactividad de los sueros de vacas, terneras y novillas de 68%, 48% y 24% respectivamente. La mediana general de los títulos fue de 1:256, igual para vacas y 1:64 para terneras y novillas. Por grupos de edad los títulos presentaron diferente proporción siendo bajos para terneras y novillas, mientras que las vacas oscilaron entre títulos medianos y altos.

El 11% de los animales evaluados no presentaron títulos, siendo de gran importancia dentro de la epidemiología de la enfermedad ya que dichos animales podrían estar en la categoría de inmunotolerantes o susceptibles.

Analizando el comportamiento de los títulos virales según el mes de sangría, todos los predios presentaron un comportamiento diferente y particular con fluctuaciones en diversos periodos del año. Esta circunstancia demuestra que en los predios con respuesta serológica al VDVB el resultado de un solo muestreo no sea indicativo del verdadero estado y forma de evolución de la enfermedad.

La variable finca fue la más asociada con la reactividad ($P \geq 0.001$), así como el grupo etáreo (P). La edad explicó en forma inversa en terneras y directa en vacas ($P \geq 0.001$) la variación en los títulos (R^2 : 0.32 y 0.06).

Los resultados del presente trabajo sugieren una respuesta serológica activa al virus de la DVB en la Sabana de Bogotá. En esta respuesta intervienen una serie de variables dependientes del agente, del medio ambiente propio de cada

subregión y de las prácticas de manejo establecidas para cada hato. A partir de este diagnóstico se advierte la necesidad de establecer dentro de los registros de las explotaciones lecheras un seguimiento serológico de la enfermedad con el fin de determinar el comportamiento particular de la misma en cada predio y así optar por medidas de control apropiadas. Se recomienda además realizar futuras investigaciones que aborden el aislamiento y caracterización molecular de las cepas presentes en nuestro medio, como también la presencia de animales persistentemente infectados.

INTRODUCCION

La Diarrea Viral Bovina (DVB) es una enfermedad causada por un pestivirus clasificado dentro de la familia *Flaviviridae* (Franeki, 1991; citado por Hooft et al., 1992), cuyo ácido nucleico es RNA de una sola cadena abierta (Horzinek, 1971) de polaridad positiva (Dubovi, 1990), posee cubierta lipídica donde se aloja la glicoproteína estructural GP-53 responsable de la seroneutralización viral siendo el antígeno que genera la mayor respuesta inmunológica en bovinos (Corapi et al., 1990; Dubovi, 1990), glicoproteína que ha mostrado un perfil electroforético ligeramente variable, entre 55 y 58 Kd (Purchio et al., 1984; Donis et al., 1987; Collett et al., 1988; Meyers et al., 1991).

Se conocen dos biotipos del virus cuya denominación corresponde a su capacidad para producir o no efecto citopático en cultivos celulares: el biotipo citopático (CP) que origina vacuolización y destrucción de la monocapa celular y

el biotipo no citopático (NCP) que no causa daños visibles o este es muy sutil (Bolin et al., 1987) haciéndose necesario el uso de técnicas inmunohistoquímicas como inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa para su detección (Roberts and Etchinson, 1988).

La infección con el virus de DVB puede resultar en una amplia variedad de condiciones patológicas dependiendo de su ocurrencia durante la vida prenatal o postnatal y el estado inmune del animal al momento de la infección (Duffell et al., 1985; Baker, 1987; Ernst, 1983; Moenning, 1990). Se han clarificado algunos aspectos de su epidemiología al interrelacionar el papel que el biotipo NCP y CP tienen en la presentación de la Enfermedad de las Mucosas y otras formas de presentación de la enfermedad (Bolin, 1984; Wilhelmssen et al., 1991; Brownlie et al., 1989).

En vacas gestantes susceptibles después de infectarse en condiciones naturales por vía respiratoria y/o oral sobreviene una viremia de 7-12 días y una intensa pero corta inmunodepresión, con paso del virus a través de la placenta e infección del feto (Ohmann, 1988; Done et al., 1980) lo cual puede desencadenar aborto, momificación o muerte embrionaria, o subsistir el animal a la injuria y montar una respuesta inmune *in utero* si su sistema inmune ya es competente o "aceptar como propios" los determinantes antígenicos virales y ocasionar un animal infectado persistentemente o inmunotolerante, en el cual se multiplica el virus por el resto de su vida intra y extrauterina, dichos animales no desarrollan an-

* El presente trabajo se realizó en el Posgrado de Salud y Producción animal de la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional, con el apoyo de Colciencias mediante el proyecto "Estudio prospectivo de limitantes de salud en ganado lechero de la Sabana de Bogotá y el Valle de Ubaté".

** Respectivamente: DMV., MSc Corpoica Villavicencio; DMV, MSc; DMV, PhD., DMV, MSc., Profesores Universidad Nacional de Colombia.

ticuerpos detectables a la cepa adquirida *in utero* pero si a otros virus de DVB si son antigénicamente diferentes a la cepa residente (Corapi et. al., 1986; Boli, 1988; Wilhelmson et. al., 1991).

Los animales persistentemente infectados pueden presentar al nacer efectos teratogénicos como microcefalia, hidrocefalia, disgenesia o hipoplasia cerebelar, desmielinización de la médula espinal, aplasia del timo, atrofia de la retina, tremor muscular del neonato, o animales de baja talla y peso (Done et. al., 1980; Hewicker et. al., 1990). Estos animales generalmente tienen una tasa de supervivencia menor que la de no infectados, ya que por ser inmunodeprimidos son más susceptibles a contraer enfermedades respiratorias y/o digestivas donde se asocian otros virus y/o bacterias (Nagele., 1984; Barber et. al., 1985; Pritchard et. al., 1989).

La principal fuente de infección son los animales inmunotolerantes que pueden considerarse como reservorios y la infección transplacentaria tiene el mayor peso en la transmisión y supervivencia del virus en la naturaleza (Brownlie et. al., 1989; Brownlie et. al., 1984; Loken et. al., 1991).

Los trabajos experimentales con biotipo CP no han podido demostrar la infección transplacentaria e inducción de inmunotolerantes pero si interferencia en la fertilización, situación observada para los 2 biotipos. De otro lado, en condiciones naturales y experimentales el biotipo NCP ha estado implicado en la infección transplacentaria (Brownlie et. al., 1989; Ghan et. al., 1989; Whitmore et. al., 1981; Virakul et. al., 1988).

El biotipo NCP se ha encontrado frecuentemente como contaminante de los cultivos celulares de diferente origen empleados en investigación, diagnóstico e industria de vacunas y biológicos en Medicina Humana y Veterinaria (Potts et. al., 1989; De Galvis, 1991; Levings et. al., 1991; Vera y cols., 1992) así como en Suero Fetal Bovino el más importante nutriente para la multiplicación celular *in vitro* (Bolin et. al., 1991; Vera y cols., 1992).

Los autores hacen una clara diferenciación entre cepas y aislamientos para ambos biotipos. Las cepas son consideradas aquellos aislamientos sometidos durante mucho tiempo en laboratorios a pa-

ses en diferentes sistemas celulares y/o en animales experimentales, mientras los aislamientos son considerados aún cepas de campo que no han sufrido en forma continuada este proceso (Moening, 1990). Cepas de referencia conocidas que son empleadas como antígeno en pruebas de seroneutralización como NADL, Singer y Oregon C24 se han comportado en forma diferente a un panel de anticuerpos monoclonales originados en la cepa Singer pudiéndose considerar antigénicamente diferentes (Corapi et. al., 1990) situación que también ha sido observada en aislamientos de campo con ambos biotipos (Dubovi et. al., 1986).

Los estudios sobre DVB en Colombia datan de 1975 cuando se importaron de Holanda terneras Holstein que desarrollaron el cuadro clásico de Enfermedad de las mucosas diagnóstico confirmado por el gobierno Holandés (Borda, 1975). A la luz de los actuales conocimientos y teniendo en cuenta el estatus serológico exigido para las terneras importadas y sus madres, es posible que algunos animales hayan desarrollado EM, sin embargo un síndrome descrito recientemente en neonatos susceptibles no inmunotolerantes ocasionado por biotipo NCP concuerda con lo observado en aquella época (Corapi et. al., 1989; Corapi et. al., 1990).

Posteriormente Gallego (1987) aisló el virus en fincas de la Sabana de Bogotá observando abortos, seroconversión y retardo en el crecimiento (Gallego y cols., 1987).

El más amplio estudio serológico en bovinos de leche fue el desarrollado por Griffiths y cols (1982) en 9 subregiones naturales de Colombia, donde hallaron una tasa de reactores de 47.2 % para animales y de 82 % para predios. Otro trabajo efectuado en la Costa Atlántica encontró una tasa de reactores de 5.7% en animales y 46.3 % en predios (Otte y cols., 1989). El trabajo más reciente describe por primera vez en el país un caso de Enfermedad de las Mucosas donde se aíslan e identifican ambos biotipos (Mogollón y cols., 1990).

La prueba serológica más empleada en investigación y diagnóstico es la neutralización viral teniendo como indicador de la reacción antígeno-anticuerpo células que deben ser libres de biotipo NCP, y suplementadas con SFB que cumpla esa misma condición,

siendo una prueba costosa, dispendiosa y exigente en la calidad de sus reactivos, aspectos que limitan su oferta como prueba de rutina para diagnóstico en el país. En esta prueba los anticuerpos circulantes se adhieren a los epítotos de GP-53 en la cubierta viral, impidiendo la multiplicación del virus dentro de las células (Corapi et. al., 1989).

Aunque en condiciones naturales el virus tiene un amplio espectro de variabilidad antigénica (Corapi et. al., 1990) no se han identificado serogrupos separados (Bolin et. al., 1991). Dependiendo de la cepa, ya sea de referencia o aislamiento de campo, empleada como antígeno en la prueba de neutralización, la respuesta con sueros policlonales o anticuerpos monoclonales puede presentar diferencias importantes (Bolin et. al., 1990; Bolin et. al., 1989), lo que trae consigo que la interpretación de los títulos sea relativa, así mismo un título alto o bajo parece no estar relacionado con el grado de patogenicidad o virulencia de la cepa inductora (Corapi et. al., 1990).

En condiciones experimentales los anticuerpos neutralizantes se desarrollan entre 14 y 30 días postinfección alcanzando su máximo título a los 60 días, cuando empiezan a declinar (Westenbrick et. al., 1989), en condiciones naturales la respuesta entre muestreos seriales para un mismo grupo de animales tiene amplia variación observando que entre el 40% y 60% de los animales exhiben títulos diferentes con intervalos de 90 días (Stauber et. al., 1986).

Pocos trabajos experimentales y de campo conducen la respuesta serológica hasta su título final, debido a los costos y objetivos de los ensayos, y emplean generalmente un límite a 1:1024, sin embargo los animales pueden llegar a desarrollar títulos superiores a 1:8192 (Kelling et. al., 1990; Paton et. al., 1990).

En condiciones naturales en poblaciones infectadas no se conocen informes de la literatura nacional e internacional sobre el comportamiento de la respuesta inmune a DVB en el tiempo, que permita conocer ocurrencia de procesos de reinfección favorecidos por disminución de niveles protectivos en una población o respuestas diferenciales por grupo etéreo y finca explicados por el manejo dentro de un sistema de producción como es el de producción de leche. En este

sentido este trabajo pretende discernir en condiciones de trópico frío en predios reactores, la dinámica serológica en el tiempo que indirectamente puede expresar dinámica viral dentro de predios infectados.

MATERIALES Y METODOS

Con el fin de hacer un monitoreo serológico a DVB se seleccionaron 4 predios de producción de leche con bovinos Holstein no vacunados contra DVB antes ni durante el seguimiento, escogiendo en cada finca una cohorte de 21 a 25 animales, independiente de la población en cada una de ellas, que representara en forma proporcional a los diferentes grupos etéreos. Cuando en las primeras 4 sangrías algún animal murió o fue descartado, se reemplazó por otro del mismo grupo, en las fincas donde la población de terneras era inestable esta categoría no se consideró (Finca 10). De acuerdo al orden consecutivo del banco de sueros del posgrado los predios se denominaron como 7, 8, 9 y 10. Los dos primeros estaban situados en el municipio de Mosquera y eran colindantes, el tercero en el municipio de Cajicá y el último en las estribaciones de la Cordillera Oriental en el municipio de Sibaté. El grupo inicial de seguimiento fue de 96 animales de los cuales el 13% fueron terneras, el 17% novillas y el 71% vacas. En la finca 7 se siguió el 78% de los animales (25/32), en la 9 el 16% (25/168), en la 10 el 20% (25/132) y en la 11 el 32% (21/66). Las vacas se escogieron al azar y en forma proporcional al número de partos independiente de si estaban lactando o secas, vacías o gestando. Se consideraron como terneras animales desde un día de edad hasta los 12 meses, novillas 12 meses hasta antes de parir y vacas animales que habían tenido uno o más partos.

En promedio cada 30 días se tomó a cada animal una muestra de sangre de la vena o arteria coccígea en tubos estériles y al vacío, que se transportaron el mismo día al laboratorio donde se centrifugaron a 700 xg por 20 minutos almacenándolos a -70°C hasta su empleo en la prueba de seroneutralización. El período de toma de muestras estuvo comprendido entre diciembre de 1989 y enero de 1991, todos los predios tuvieron 12 sangrías con excepción de la finca 11 que tuvo 11 tomas.

La prueba de seroneutralización se efectuó a 1048 sueros siguiendo el procedimiento descrito por Cortés E., (1988), empleando 100 DITC₅₀/0.1 ml con diluciones dobles de suero desde 1:4 hasta 1:256, los sueros reactivos a esta última dilución se corrieron nuevamente desde 1:128 hasta 1:8192.

Para cultivo, titulación viral por el método de Reed and Munch (Carnero, 1982) y seroneutralización se empleó cultivo primario de

Riñón Fetal Bovino (RFB) hasta el subcultivo 3 siguiendo las técnicas del posgrado de reproducción animal, Las células y SFB empleados fueron sometidos a Inmunofluorescencia indirecta, seroneutralización e interferencia para garantizar que no portaran biotipo NCP, carecieran de anticuerpos neutralizantes al virus de DVB y no existiera interferencia con el biotipo CP empleado como antígeno (Manual de técnicas de Laboratorio. PRA. UN. Sin publicar).

Cómo posibles antígenos se probaron las cepas citopáticas Oregon C24, Singer e ICA, empleando MDBK, RFB y titulación del sobrenadante (Virus liberado) y por disrupción celular de células sobrenadante por congelación y descongelación (Virus asociado) en diferentes tiempos postinoculación.

Se construyó una base de datos en el Programa PANACEA donde se efectuó estadística descriptiva, análisis de varianza de una

via, Regresión lineal simple y múltiple y algunos procedimientos no paramétricos como Chi-cuadrado, a su vez en el programa SAS se efectuó (para observaciones repetidas) una prueba de esfericidad de Mauchly's en base a chi cuadrado y una prueba de Wilky's Lambda de análisis multivariado (manova) y univariado para comparar perfiles entre y dentro de animales por finca. (Static Analytical Sistem., 1988). Los títulos a DVB fueron transformados por la ecuación:

Valor transformado: Logaritmo natural (Título + 1)

Las variables que no presentan distribución normal y/o no eran continuas fueron transformadas de acuerdo a su naturaleza siguiendo los procedimientos señalados por Steel y Torrie (1985).

Arbitrariamente los títulos se clasificaron como bajos entre 1:4 y 1:32, medios entre 1:64 y 1:512 y altos entre 1:1024 y 1:8192.

Se consideró como un proceso de seroconversión, el incremento en 3 o mas diluciones entre sangrías consecutivas, siendo necesario que en la sangría previa fuera reactor entre 1:4 y 1:1024 y tuviera

4 o mas muestreos consecutivos. la tasa de seroconversión (TSC) para cada cohorte y por mes se calcularon de la siguiente forma:

$$TSC: \frac{\text{Número de animales que se convirtieron en el monitoreo}}{\text{Número de animales en la cohorte con mas de 4 sangrías al final ò período}}$$

$$TSC(\text{mes Xi}): \frac{\text{Procesos de seroconversión en el mes Xi}}{\text{Total de procesos observados en el monitoreo}}$$

El índice de seroconversión (IS) por cohorte se calculó así:

$$IS: \frac{\text{Número de procesos de seroconversión}}{\text{Número de animales susceptibles de seroconvertir}}$$

Se calificó como incidencia serológica la reactividad 1:4, entre sangrías consecutivas, cuando en la primera de estas no era reactor a la prueba. Los animales con más de 3 sangrías y no reactivos a la prueba en cualquier punto del muestreo se consideraron sujetos susceptibles de incidencia serológica, las tasas de incidencia se calcularon de la misma forma a lo descrito para seroconversión.

RESULTADOS Y DISCUSION

La cepa Oregon C24 se cultivó en la línea celular Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) (ATCC, 1988) sin observarse crecimiento y lesión viral sobre la monocapa debido a contaminación celular con virus de DVB-NCP presentándose interferencia entre biotipos, efecto que no se detectó cuando se cultivó en RFB libre de virus adventicio (Tabla 1), este resultado fue contrario al observado por otros autores donde la cepa Oregon C24 no fue inhibida por aislamientos NCP de origen Estadounidense y Japonés (Sugi-

yama et. al., 1984). Los escasos estudios sobre interferencia indican que posiblemente la ocurrencia de este fenómeno depende de la similitud bioquímica de la cepa residente y desafiante (Moening, 1990), del tiempo de adaptación del biotipo NCP en el cultivo, ya que se ha observado que el efecto no se presenta cuando los biotipos son inoculados simultáneamente (Shirai et. al., 1984) y, de la cantidad de virus infectivo con el cual se inocula un cultivo contaminado (Sugiyama et. al., 1984). Existe poca claridad sobre el proceso de interferencia donde por la secuencia de pases el biotipo NCP está adaptado a líneas celulares de diverso origen animal (Levings et. al., 1990; Potts et. al., 1989; Vera y cols., 1992).

El aislamiento citopático ICA mejoró su capacidad infectiva a medida que se efectuaron pases en RFB, presentando al tercer pase un título similar al reportado en su aislamiento (Mogollón y cols., 1990). Tabla 1.

En general los títulos de las cosechas virales por congelación y descongelación de células-sobre-

nadante fueron superiores al del sobrenadante (Tabla 1). Se escogió como antígeno para la prueba

CEPA	CELULAS	METODO	TIEMPO	TITULO
Oregon	MDBK	1	72 hrs	Interferencia
Oregon	RFB	1	72 hrs	10 ^{4.2}
ICA	RFB	2	72 hrs	10 ^{3.5}
ICA	RFB	2	60 hrs	10 ^{3.4}
ICA	RFB	2	52 hrs	10 ^{4.5}
SINGER	RFB	1	72 hrs	10 ^{5.3}
SINGER	RFB	1	60 hrs	10 ^{7.0}
SINGER	RFB	2	28 hrs	10 ^{4.8}
SINGER	RFB	2	52 hrs	10 ^{4.3}

Los títulos de la cepa ICA corresponden a los pases 1, 2 y 3. Título expresado en DITC₅₀/0.1 ml calculado por el método de Reed and Muench. Método 1: Células-sobrenadante congelado y descongelado 3 veces. Método 2: Sobrenadante. MDBK: Línea celular Madin Darby Bovine Kidney.

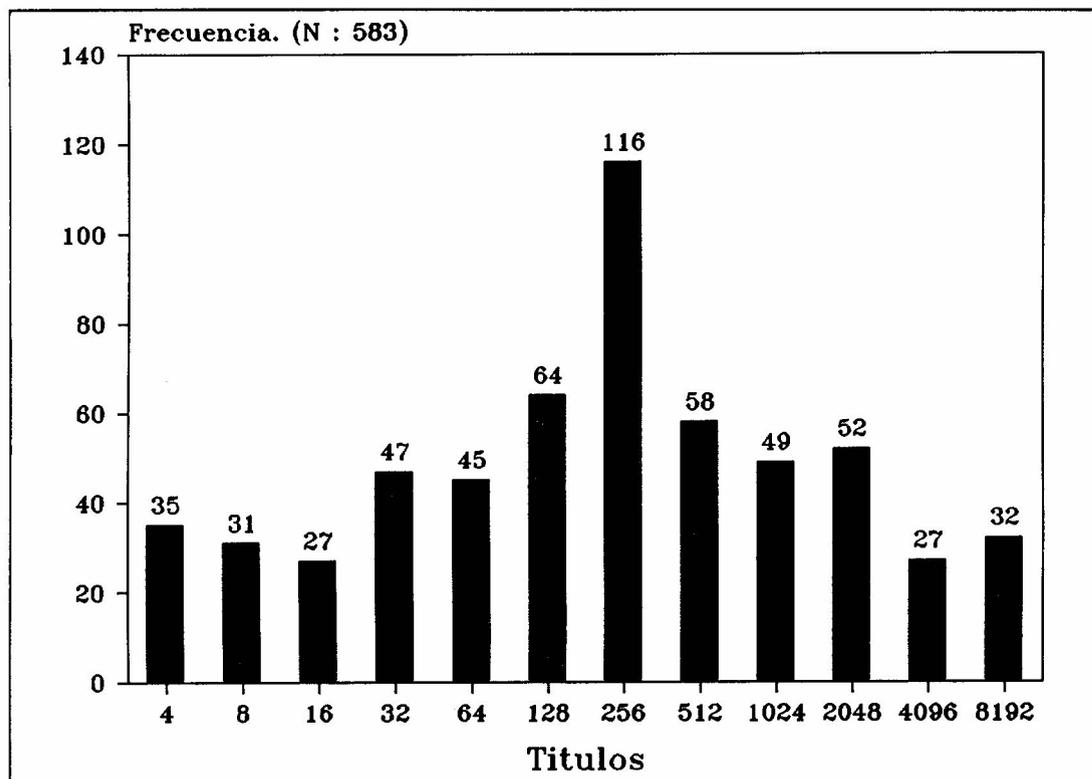


FIGURA 1. Histograma de títulos por SN de los sueros reactivos.

de seroneutralización el sobrenadante de la cepa Singer cultivada en RFB por 52 horas con un título de $10^{4.3}$ DITC₅₀/0.1 ml la cual a pesar de tener títulos más bajos posee una mejor integridad viral y menor contaminación con restos celulares, ya que el proceso de disrupción celular por cambios de temperatura trae consigo virus ensamblado, proteínas estructurales y no estructurales y antígenos de origen celular (Magar et al., 1987), además de mRNA viral que por su polaridad positiva es infectivo para las células (Dubovi, 1990).

De los 1048 sueros bovinos examinados el 56% (583) presentaron título 1:4. A su vez el 41% de los sueros (37/91) del grupo etéreo terneras presentaron anticuerpos neutralizantes, el 24% de los sueros de novillas (55/234) y el 68% de los sueros de las vacas (491/723). La tasa de sueros reactivos fue de 59%, 35% 75% y 54% para las fincas 7, 9, 10 y 11 respectivamente.

El histograma de frecuencias de los sueros reactivos mostró una distribución simétrica con apariencia normal (Figura 1) y una mediana con un título de 1:256 que se observó en el 20%, el 41% de las veces el título estuvo entre 1:256 y 1:512. Así mismo el 24% de los títulos fueron bajos, el 49% medianos y el 27% altos.

Al descomponer las frecuencias de reactividad por grupos etéreos, las terneras presentaron desplazamiento a la izquierda con una mediana de 1:64, similar condición se observó en las novillas con igual mediana, mientras las vacas desplazaron el histograma un poco a la derecha con una mediana de 1:256. Tabla 2.

La distribución de títulos encontrada en este trabajo con muestreo repetitivo sobre un mismo grupo de animales, concuerda con lo hallado por Loken et al., (1991) en un es-

tudio de prevalencia puntual en Dinamarca, donde el histograma y la mediana (1:128) fueron similares al de este estudio, sugiriendo que en poblaciones infectadas la distribución de frecuencias de los títulos tiene una tendencia normal.

Los títulos agrupados en clases presentaron diferente proporción para los grupos de edad, es así como en las terneras la mayor frecuencia correspondió a títulos bajos, en novillas a títulos bajos y medianos, mientras en vacas los títulos bajos fueron los de menor

TITULO	TERNERAS	%	NOVILLAS	%	VACAS	%
4	6	16	6	11	23	5
8	4	11	6	11	21	4
16	3	8	7	12	17	3
32	5	13	6	11	36	7
64	3	8	5	9	37	8
128	4	22	6	11	54	11
256	4	11	8	14	104	21
512	4	11	5	9	49	10
1024	3	9	2	4	44	9
2048	0	—	0	—	52	11
4096	0	—	2	4	25	5
8192	1	3	2	4	29	6
TOTAL	37		55		491	

presentación y los más frecuentes los medianos, así mismo este grupo tuvo la mayor proporción de títulos altos comparado con terneras y novillas, este hallazgo es comparable a lo encontrado por Kelling et al., (1990) en un estudio transversal en ganado de carne en los Estados Unidos. Figura 2.

Los coeficientes de variación de los títulos transformados de los sueros reactivos fueron: 0.40, 0.48, 0.30 y 0.36 para los predios 7, 9, 10 y 11 respectivamente, a su vez en los grupos de edad el coeficiente encontrado fue: 0.47 para terneras, 0.46 para novillas y 0.35 para vacas. Esto indica dispersión de los títulos y un comportamiento serológico variable. En la literatura internacional disponible no se hallaron referencias de estudios de campo similares para establecer comparaciones válidas con el presente estudio. Las vacas presentaron por tanto menor dispersión y una respuesta más homogénea en relación con las terneras y novillas, así como la cohorte de la finca 10 con respecto a los demás predios.

Cuando se consideraron sueros reactivos y no reactivos se obtuvo un título promedio de 1:4 para terneras, 1:4 para novillas y 1:32 para vacas y 1:16, 1:4, 1:64 y 1:16 para las cohortes de las fincas 7, 9, 10 y 11 respectivamente. Los mayores títulos promedio pertenecieron en todos los predios a las vacas, con excepción de la finca 9 donde terneras y vacas tuvieron un título medio similar, así mismo en los predios donde se evaluaron terneras el título medio en estas fue superior al de novillas (Figura 3). El análisis de varianza por predios para grupos etéreos no fue significativo en el predio 9 ($P \geq 0.62$) pero si en los demás ($P \geq 0.01$), donde el grupo vacas tuvo diferencias significativas en todos los casos con respecto a terneras y novillas. Tabla 3.

El análisis de frecuencias de reactivos y negativos a la prueba y grupos etéreos por finca, demostró asociación estadística entre estas variables, siendo su intensidad diferente entre predios, es así como la finca 7 mostró la más alta asociación seguida de los predios 9, 11 y 10. El análisis señala que en todas las fincas la respuesta serológica estuvo asociada a las categorías de edad. Tabla 4.

En la Figura 4, se observa el promedio del título transformado, en función de la edad de los anima-

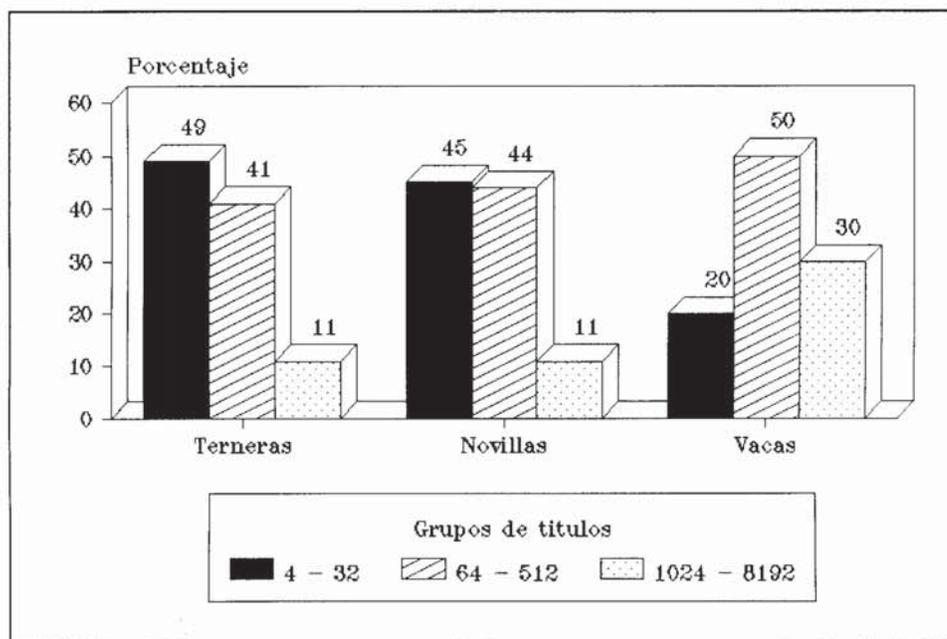


FIGURA 2. Reactividad serológica a DVB en grupos etáreos, según títulos agrupados.

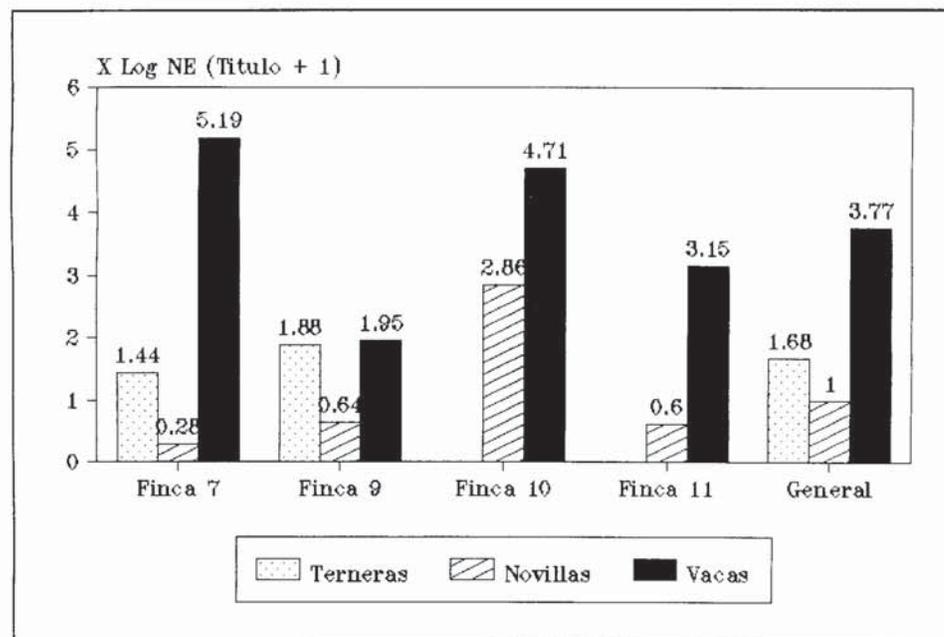


FIGURA 3. Medias de títulos a DVB transformados, de sueros colectados según grupo etáreo por fincas.

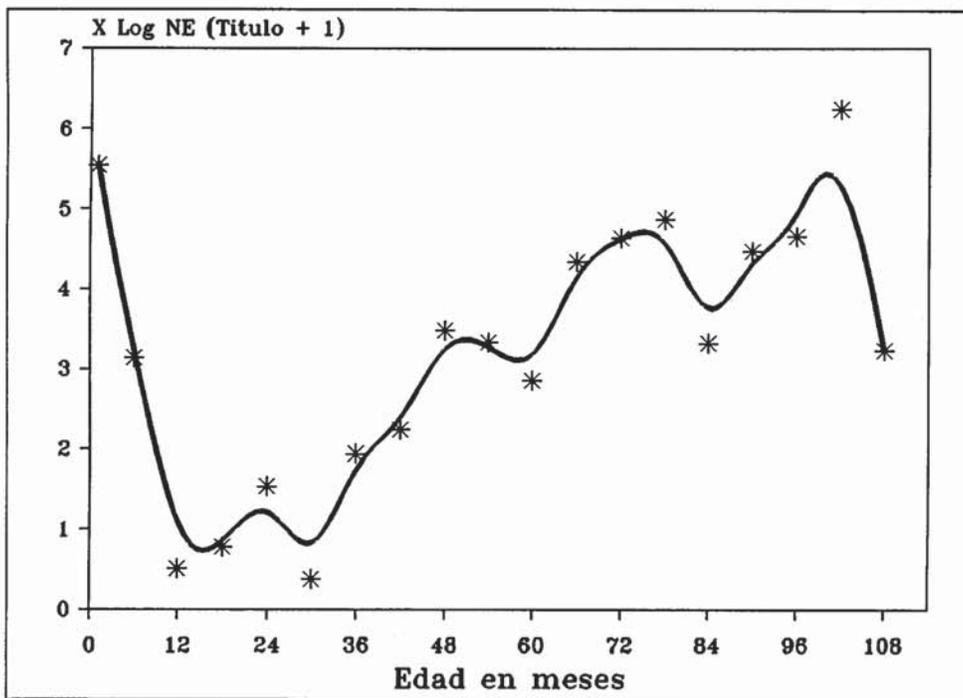


FIGURA 4. Curva del título promedio transformado a DVB durante el monitoreo según la edad.

les durante el seguimiento serológico. La curva presenta dos imágenes diferentes, la primera un descenso lineal en los títulos hasta los 12 meses de edad con pérdida de la inmunidad pasiva materna y la segunda un ascenso sostenido y ondulado desde los 13 hasta los 96 meses reflejo de inmunidad activa natural. En ninguno de los predios se vacunó antes o durante el estudio contra DVB.

Con el fin de no mezclar la respuesta serológica pasiva de la activa se desarrollaron los siguientes modelos:

$$Y: 4.913375 - 0.421465 (Xi)$$

donde Xi: edad entre 1 y 12 meses, siendo una respuesta lineal inversa significativa ($P \geq 0.001$, $r: -0.57^{**}$, $R^2: 0.32$) y la variación serológica de las terneras está explicada en un 32% por la edad, coeficiente de determinación que para una sola variable independiente es alto, e indica que a pesar de no tener información serológica de los terneros antes de consumir calostro, para verificar que en su mayoría carecían de anticuerpos contra DVB, la relación inversa se debe a degradación de inoglobulinas de origen materno. Con la anterior ecuación se calculó la edad a la cual las terneras tuvieron niveles de anticuerpos no de-

tectables (1:4), siendo de 7 meses aproximadamente.

El otro modelo se efectuó para animales mayores de 12 meses (Xi), es decir novillas y vacas, presentando una significativa respues-

ta lineal directa ($P \geq 0.001$, $r: 0.26$, $R^2: 0.06$) y su ecuación fue:

$$Y: 1.578891 + 0.228765 (Xi)$$

En este caso a diferencia de lo encontrado en terneras y pese a la significancia del modelo, la varia-

ción en la respuesta serológica solamente esta explicada en un 6% por la edad, presentándose títulos basales (1:4) hasta los 36-38 meses de edad, cuando se hacen detectables, coincidiendo con la mediana de la edad al primer parto encontrada para las fincas en el período de monitoreo.

El título promedio transformado según el número del parto, denotó un aumento gradual en los títulos del primero al cuarto parto donde las vacas alcanzaron el título promedio mas alto, para descender hasta el séptimo parto, de aquí en adelante las observaciones deben tomarse con cautela ya que el número de animales con 8 a 10 partos no permite hacer inferencias al respecto. Figura 5.

El 11% de los animales evaluados (11/101), no presentó reactividad a la prueba en ninguna de las sangrías, siendo 6 de ellos vacas, 2 terneras que se convirtieron en novillas y 3 novillas, la finca 9 presentó la mayor frecuencia, seguida por las fincas 7, 11 y 10 respectivamente. Así mismo el 22% (22/101) de los animales presentaron durante el muestreo reactividad serológica en dos ocasiones, porcentaje que corresponde al doble de los no reactivos y en donde la frecuencia de distribución por predio siguió la

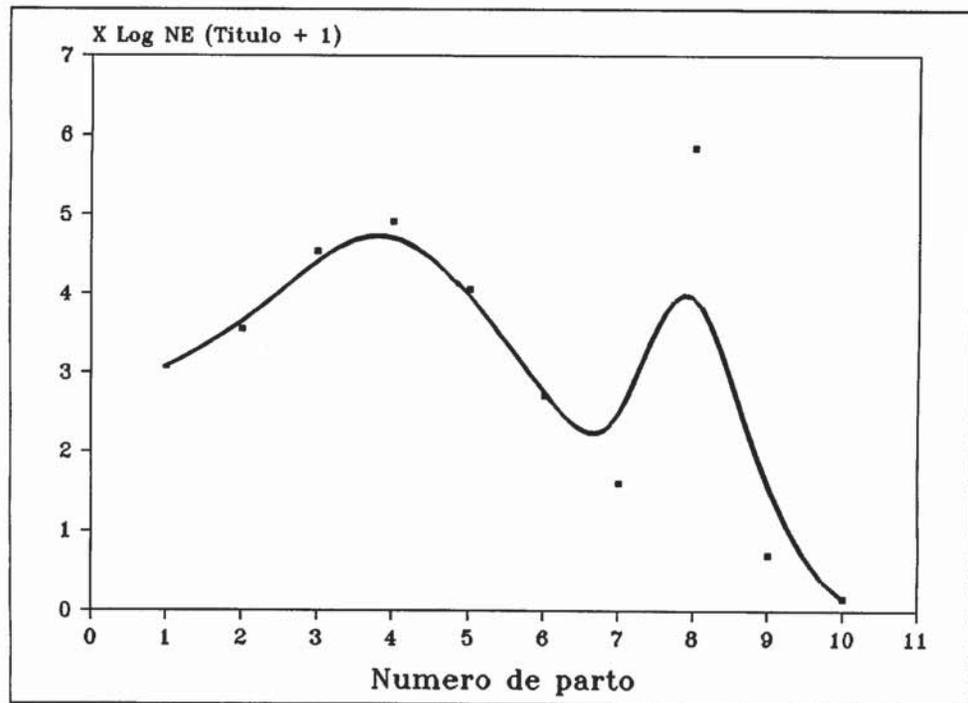


FIGURA 5. Curva del título promedio transformado a DVB, según el parto.

TABLA 3
ANALISIS DE VARIANZA ENTRE TITULOS TRANSFORMADOS (SERONEUTRALIZACION A DVB)
POR GRUPOS ETAREOS OBTENIDOS DURANTE EL MONITOREO
DE LAS DIFERENTES FINCAS ESTUDIADAS

FINCA	FUENTES DE VARIACION	CUADRADO MEDIO	GL	F	P	MEDIAS DE TRATAMIENTOS	PRUEBA DE TUKEY
Todas (1)	G. etéreos Error	66.2189 3.7666	2 580	17.57	0.0000 **	T: 4.1447 N: 4.3236 V: 5.5555	a a b
Finca 7	G. etéreos Error	36.7578 4.2072	2 154	8.73	0.0003 **	N: 3.3252 T: 3.8032 V: 5.5782	a a b
Finca 9	G. etéreos Error	2.7109 4.3563	2 100	0.62	0.6229 ns	N: 3.9151 T: 4.4049 V: 4.6064	a a a
Finca 10	G. etéreos Error	29.9346 2.8027	1 207	10.68	0.0014 *	N: 4.8899 V: 5.9547	a b
Finca 11	G. etéreos Error	23.4668 3.5782	1 112	6.55	0.0118 *	N: 3.0095 V: 5.4752	a b

(1): Prueba de Bartlett, Chi-cuadrado: 0.06 p: 0.97, varianzas homogéneas y títulos transformados de reactores se distribuyen normalmente.
 gl: Grados de libertad. p: probabilidad de aceptar Ho. **: altamente significativa. *: significativa. ns: no significativa. T: terneras. N: novillas. V: vacas.
 Prueba de Tukey: medias de tratamientos con diferentes letras no son iguales.

TABLA 4
PRUEBA DE INDEPENDENCIA, CHI-CUADRADO, ENTRE GRUPOS ETAREOS Y RESPUESTA SEROLOGICA A DVB EN GENERAL Y POR FINCAS

VARIABLE	N	GRUPO ETAREO	CHI CUADRADO	GL	P	INDEPENDENCIA (I) ASOCIACION (A)
DVB +/-	1049	todos	150.28	2	0.0000 **	A
Clases de títulos DVB	583	todos	35.41	4	0.0000 **	A
DVB +/- Finca 7	268	Todos	162.43	2	0.0000 **	A
DVB +/- Finca 9	291	todos	17.01	2	0.0002 **	A
DVB +/- Finca 10	278	Novillas Vacas	8.70	1	0.0032 *	A
DVB +/- Finca 11	211	Novillas Vacas	8.84	1	0.0029 *	A

n: Número de observaciones. gl: grados de libertad. p: Probabilidad de aceptar Ho
 Clases de títulos: 3 clases 1:4 a 1:32; 1:64 a 1:512; 1:1024 a 1:8192.
 **: altamente significativa. *: significativa.
 Grupos etéreos: Terneras, novillas y vacas.

misma tendencia de los no reactivos. Tabla 5.

Los animales que no presentan reactividad serológica pueden clasificarse como inmunotolerantes o susceptibles. En todos los

novillos tiene mas posibilidad de ser inmunotolerante en relación a las novillas y vacas, que pueden ser susceptibles aún no infectadas.

La tasa de reactivos de cada cohorte según mes asignado por

TABLA 5
FRECUENCIA DE ANIMALES NO REACTORES Y REACTORES EN DOS SANGRIAS, SEGUN GRUPO ETAREO POR FINCAS DURANTE EL MONITOREO (N:101)

CATEGORIA	FINCA 7	FINCA 9	FINCA 10	FINCA 11	TOTAL
No reactivos					
Tenera/novilla*	1	1	—	—	2
Novilla	2	1	0	0	3
Vacas	0	3	1	2	6
Total	3	5	1	2	11
Reactores 2 veces					
Tenera/novilla	3	1	—	—	4
Novilla	4	3	0	2	9
Vacas	0	6	1	2	9
Total	7	10	1	4	22

* Terneras que se convirtieron en novillas.

predios las vacas presentaron la mayor tasa de reactividad y el título promedio más alto, siendo por tanto el grupo con el mayor riesgo de tener inmunotolerantes que difunden la infección a las demás vacas y en menor grado a terneras y novillas, en este sentido las vacas de las fincas 10 y 11 que están en contacto con animales seroreactivos y donde la respuesta promedio de las fincas es alta pueden clasificarse como posibles inmunotolerantes. En la finca 7 no se presentaron vacas seronegativas, pero si terneras que se convirtieron en novillas, existiendo la posibilidad de que se hayan infectado in utero y sean inmunotolerantes.

En la Finca 9 donde se encontró la mayor frecuencia de no reactivos, se observó en las vacas el título promedio mas bajo, comparable al de las terneras, lo que puede estar indicando un proceso lento de difusión dentro de las vacas, ya que cuando existen episodios de DVB comprobados y con inmunotolerantes identificados, los títulos de esos predios y grupos etáreos en promedio son altos (Loken et. al., 1991), a su vez las vacas seronegativas de este predio tenían una edad promedio de 9 años lo que sugiere aún más la posibilidad de que hay un proceso activo de infección en este predio, en este sentido el animal clasificado como ternera-

sangría, tuvo en todos los predios una imagen diferente, es así como en la Finca 7 la tendencia es de descenso (Figura 6), sin embargo al descomponer esta tasa como promedio mensual del título por grupos etáreos, se observó que el descenso se debió a la respuesta de las terneras, cuyos anticuerpos persistieron hasta los 9 meses de edad, y decremento de los títulos de las vacas entre diciembre y abril seguido por un ascenso y una respuesta relativamente homogénea hasta el fin del monitoreo. Las novillas presentaron bajos títulos basales con fluctuaciones bimestrales. Figura 7.

La tasa de reactivos de la Finca 9 inicia con un pronunciado descenso, continuando con un ascenso ondulante con crestas bimestrales (Figura 8), en este caso los títulos promedio inician con un descenso en todas las categorías de edad, resaltando el bajo promedio en terneras, novillas y vacas en relación al predio anterior, seguido por un ascenso del título promedio en todas ellas, el cual es mas pronunciado entre junio y noviembre (Figura 9). Estas imágenes están indicando un lento proceso de infección en todas las categorías de edad. De otro lado en este caso las terneras, que presentaron bajos niveles iniciales, se comportaron como centinelas serológicas.

En la Finca 10 la tasa de reactivos ofrece dos pronunciados descensos en enero y julio y una tasa similar en los demás meses (Figura 10), a su vez el título promedio en vacas es el más homogéneo en relación a los otros predios, con una significativa caída en julio. En las novillas se observa una pendiente negativa (Figura 11), que puede deberse a un descenso y degradación de anticuerpos después de una infección activa, ya que los anticuerpos maternos no persisten hasta esa edad, seguida por un proceso de reinfección que desencadena una respuesta inmune secundaria, situación que no se observó en los demás predios donde la respuesta de este grupo presentó títulos basales.

En la finca 11 la tasa de reactivos presentó un pico epidémico en el mes de junio (Figura 12), sin embargo el título promedio de las vacas (no se consideraron las novillas) en ese mismo mes indica una respuesta de casi todos los animales de la cohorte pero con un título promedio para el grupo, mas bajo que lo observado en los meses siguientes donde, la tasa de reactivos es menor pero el título promedio es mas alto. Figura 13.

En el presente estudio, donde los predios tuvieron desde el principio reactividad serológica a la prueba de neutralización, la tasa de reactivos indica contacto previo de la población con el virus pero presenta amplia variabilidad entre muestreos y predios. Situación que puede deberse a heterogeneidad del título serológico de los individuos entre muestreos como se en-

contró en este trabajo. Esta circunstancia hace que en predios con respuesta serológica, la tasa de reactivos obtenida en un solo muestreo sea incapaz de indicar el verdadero estado y forma de evolución de la enfermedad, infiriendo decisiones erróneas sobre la forma de abordar el control en una población. La determinación de la forma de presentación (epidémica o endémica) puede obtenerse efectuando dos o tres muestreos con intervalos mensuales o bimestrales que incluya los diferentes grupos de edad, siendo los terneros un grupo centinela importante tanto por la degradación de anticuerpos maternos en hatos endémicos, como por el bajo nivel o ascenso de su título en predios epidémicos con proceso de infección activo. La observación comparada del perfil promedio de los grupos y su variación es un excelente método para determinar dinámica de la infección en la población, mas no en los individuos donde la variabilidad del título fue del 57%, como lo demuestra la metodología empleada en el presente estudio.

Los coeficientes de correlación del título promedio entre meses, no presentaron en la finca 7, correlación entre las sangrias 1 y 2 así como la 5 y 6, siendo por tanto los perfiles entre esos meses diferentes e independientes. A su vez en los demás meses se encontró correlación con diferente significancia estadística, siendo la respuesta en esos meses asociada y correlacionada, en este caso a partir del muestreo 5 progresivamente el perfil se hace mas homogéneo. Tabla 6.

TABLA 6
COEFICIENTES DE CORRELACION PARCIAL DEL TITULO PROMEDIO TRANSFORMADO A DVB, ENTRE SANGRIAS CONSECUTIVAS PARA LAS COHORTES DE LOS PREDIOS 7, 9 Y 10(!)

MUESTREOS	FINCA 7	FINCA 9	FINCA 10
1-2	-0.2 ns	0.65 *	0.75 **
2-3	0.68 *	0.87 **	0.82 **
3-4	0.92 **	0.23 ns	0.81 **
4-5	0.62 *	0.30 ns	0.91
5-6	0.38 ns	0.40 ns	0.87 **
6-7	0.48 *	0.70 **	0.23 ns
7-8	0.54 *	0.57 *	0.43 ns
8-9	0.62 *	0.57 *	0.87 **
9-10	0.80 **	0.85 **	0.77 **
10-11	0.79 **	-0.14 ns	0.92 **
11-12	0.70 **	0.11 ns	0.88 **

ns: no significativa. *: p 0.05; ** p 0.01.

(!) La finca 11 se excluyó por tener 11 muestreos.

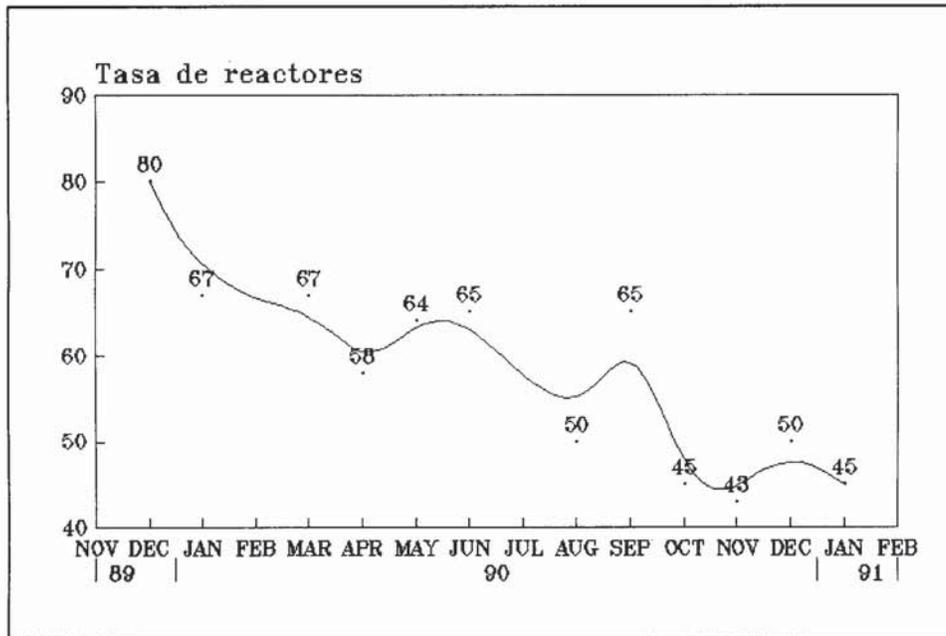


FIGURA 6. Tasa de reactores a la prueba de seroneutralización en el monitoreo de la cohorte de la finca 7.

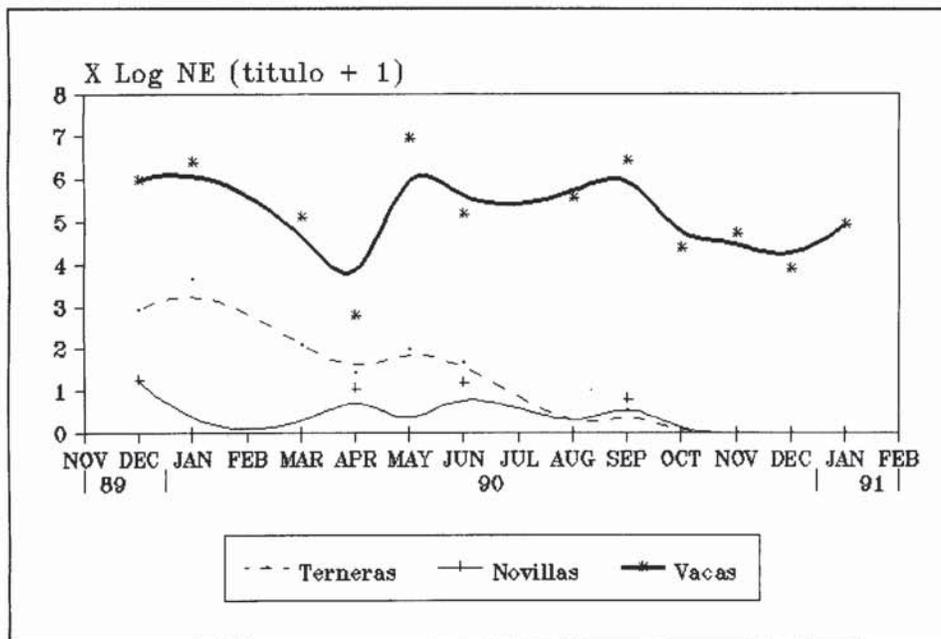


FIGURA 7. Media del Logaritmo del título a DVB por grupos etéreos. Finca 7.

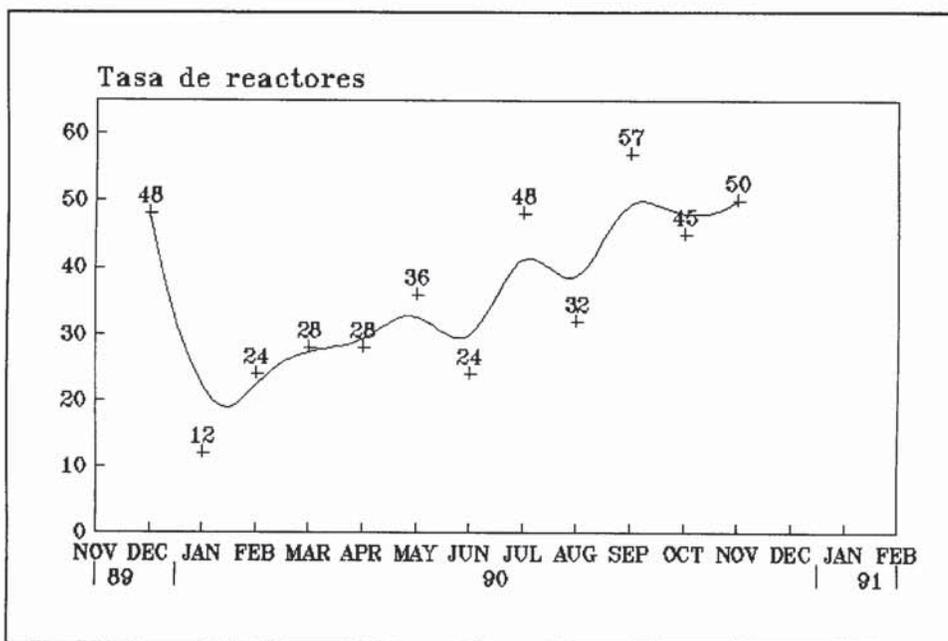


FIGURA 8. Tasa de reactivos a la prueba de seroneutralización en el monitoreo de la cohorte de la finca 9.

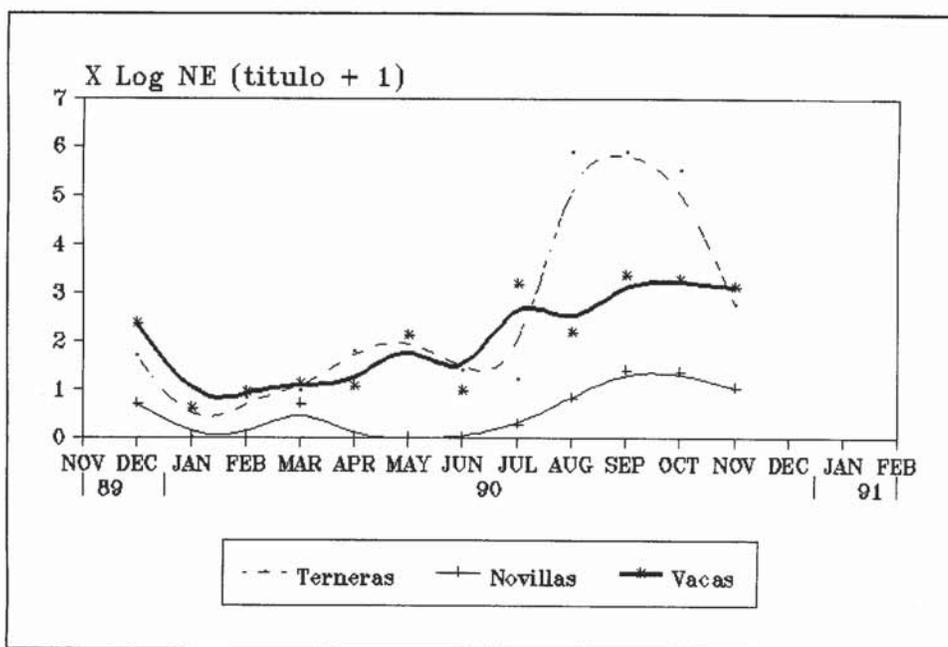


FIGURA 9. Media del Logaritmo del título a DVB por grupos etáreos. Finca 9.

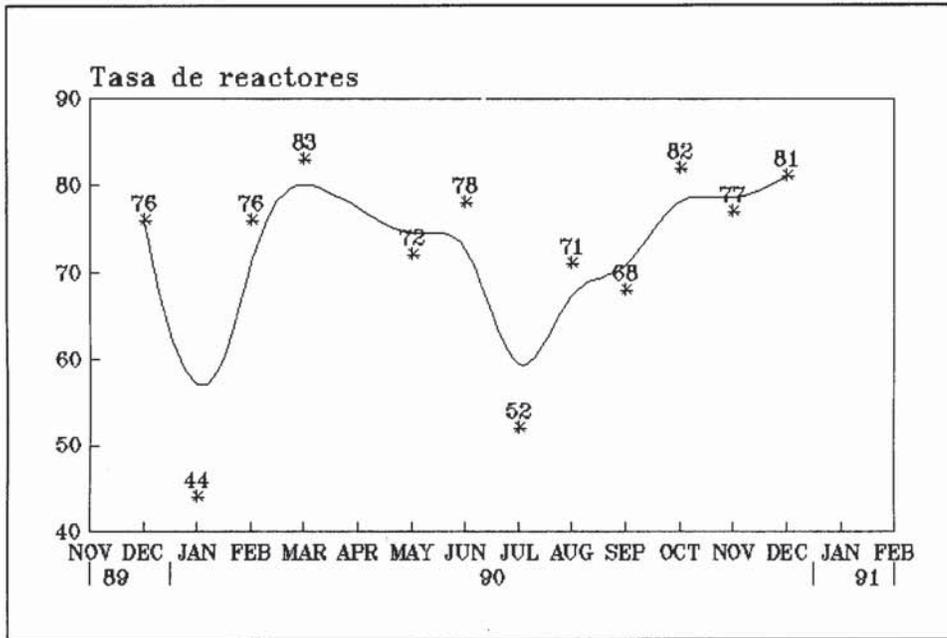


FIGURA 10. Tasa de reactivos a la prueba de seroneutralización en el monitoreo de la cohorte de la finca 10.

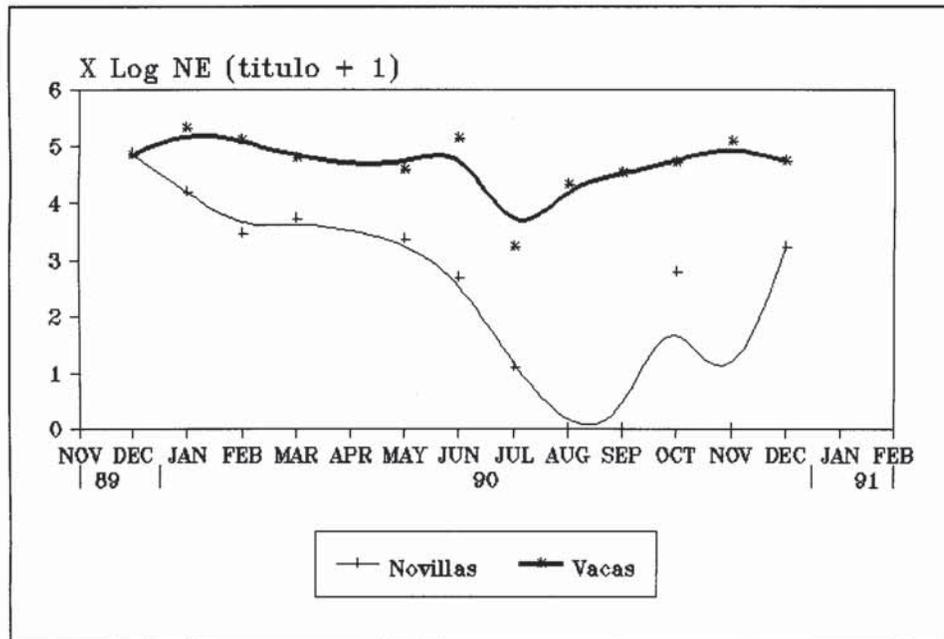


FIGURA 11. Media del Logaritmo del título a DVB por grupos etéreos. Finca 10.

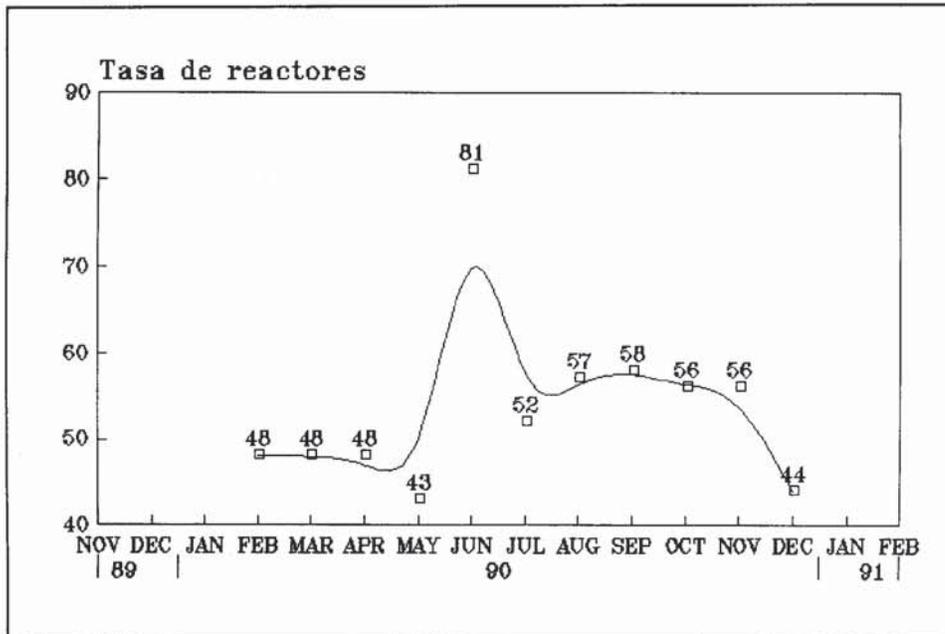


FIGURA 12. Tasa de reactivos a la prueba de seroneutralización en el monitoreo de la cohorte de la finca 11.

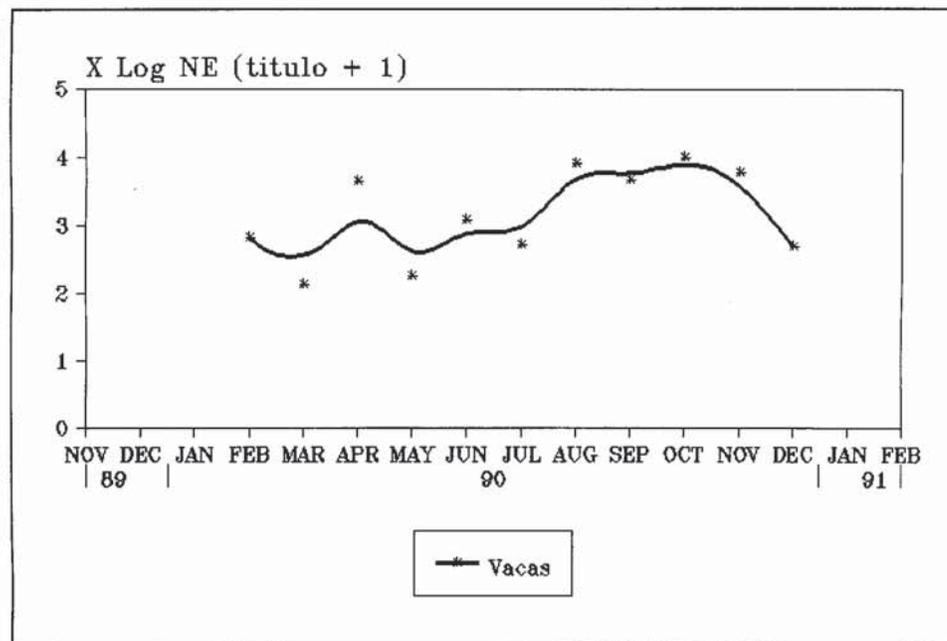


FIGURA 13. Media del Logaritmo del título a DVB por grupo etáreo. Finca 11.

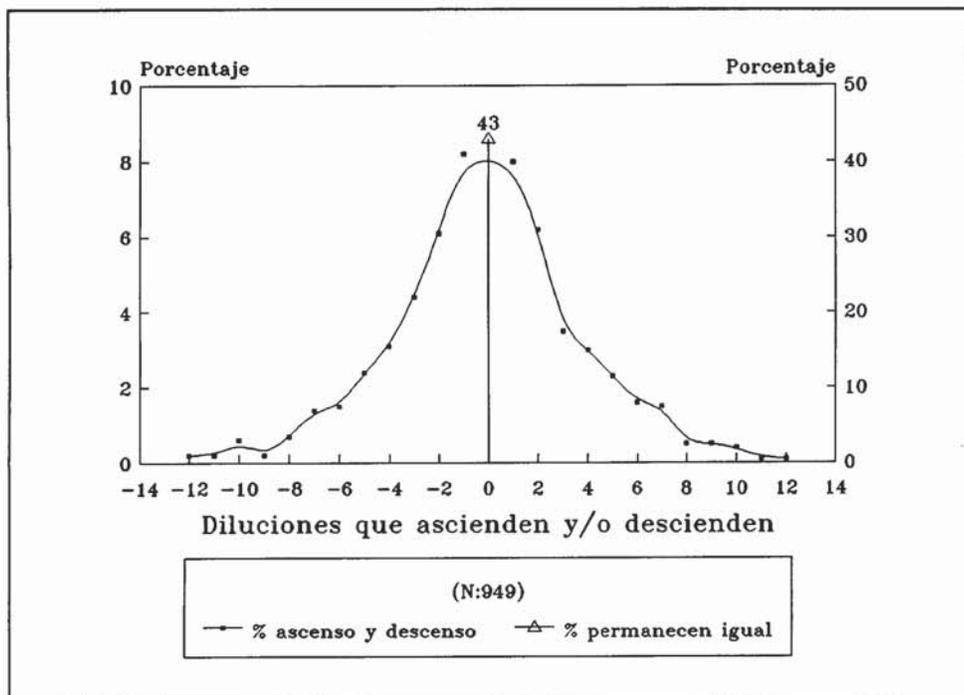


FIGURA 14. Porcentaje de la variación de los títulos a DVB entre sangrías.

Para la finca 9 entre las sangrías 3 a 6 no se encontró correlación consecutiva, a su vez en este predio se observó la menor proporción de significancia entre muestreos, indicando que la independencia del perfil en esos meses se debe a la respuesta del grupo, y no a una influencia del perfil previo. Esto sitúa aún más a este predio como en proceso activo de infección con presentación epidémica. Tabla 6.

En la finca 10, se halló una alta correlación entre muestreos, indicando homogeneidad y asociación de la respuesta durante el año, interrumpida abruptamente entre las sangrías 6 a 8, donde se observó un descenso en el perfil del título en vacas y novillas. Esto podría estar indicando cierta susceptibilidad inmunológica de ese predio en ese período, favoreciendo una posible reinfección que origina una nueva nivelación del perfil de la cohorte en los meses siguientes. Tabla 6.

El coeficiente de correlación indica que tan similares o disímiles son los perfiles entre sí, pero no señala la magnitud del título entre meses.

Las fechas de muestreo entre sí para los predios 7 ($P \geq 0.0001$) y 9 ($P \geq 0.0001$) estuvieron asociadas, encontrando efecto del mes de muestreo sobre los títulos para la

primera de ellas ($P \geq 0.0897$) pero no para la segunda ($P \geq 0.1192$). Así mismo el perfil serológico en el tiempo, entre los grupos de animales que no parieron (terneras-novillas) y las vacas demostró para el predio 7 diferencias estadísticas ($P \geq 0.0761$) entre ellos pero no para la Finca 9 ($P \geq 0.8155$). Las fincas 10 y 11 no fueron consideradas en este tipo de análisis.

En el análisis de varianza para la hipótesis de variación del perfil entre animales, se encontró que fue diferente para los animales de la finca 7 ($P \geq 0.0001$), pero no para los predios 9 ($P \geq 0.2385$) y 10 ($P \geq 0.1727$). Así mismo la variación del perfil dentro de individuos fue significativamente diferente para los predios 7 ($P \geq 0.004$) y 9 (0.0098) pero no para los animales de la finca 10 ($P \geq 0.2679$). De otro lado no se encontró interacción entre el perfil de terneras-novillas y el de vacas en ninguno de los predios ($P \geq 0.57$). La finca 11 no se consideró dentro de este análisis.

La variabilidad de la respuesta serológica entre muestreos evidenciada por los relativamente "altos" coeficientes de variación en fincas y grupos etáreos, se confirmó cuando se encontró que el 43% de las veces los animales presentaron un título igual entre sangrías consecutivas, siendo lo más noto-

rio que la probabilidad de ascender o descender en forma consecutiva desde 1 hasta 12 diluciones fue igual en ambos casos (Figura 14). Los datos presentan extremos de baja proporción como el descenso o ascenso en 6 o más diluciones, que pueden deberse a una respuesta errática de un segmento de la población que puede considerarse normal, errores humanos en la técnica o error experimental de la prueba y de la variación que puede existir entre uno y otro cultivo de RFB o lote de suero empleado en la prueba, ya que en este caso el virus no fue fuente de variación debido a que se empleó una sola cosecha en la titulación de los sueros. Sin embargo observando la distribución de apariencia normal, casi simétrica la primera opción es la más probable explicación a este comportamiento serológico.

Las tasas de seroconversión e incidencia serológica encontradas por predio fueron: Finca 7: 70% y 76%, Finca 9: 56% y 70%, Finca 10: 88% y 85% y Finca 11: 86% y 94%, en todos los predios ambas tasas presentaron la mayor frecuencia en el grupo vacas seguido por las novillas y terneras, indicando actividad viral con reinfecciones permanentes pese a ser en todos los predios el grupo vacas el del mayor título promedio, situación que puede darse por la presencia

de inmunotolerantes ya que este grupo presentó el mayor número de animales que no seroconvirtieron durante el estudio. La alta densidad relativa con que se manejan los animales de ordeño en los sistemas de producción de leche, favorecen el estrecho contacto entre animales y la continua circulación del virus dentro de estos, dependiendo del estado inmune de la población.

Con excepción de la finca 9 donde la tasa de seroconversión fue sensiblemente inferior a la de incidencia, esta última fue superior en todos predios. Así mismo en este predio la tasa de incidencia fue superior a medida que el grupo etéreo tuvo más edad, siendo de 11% en terneras, 31% en novillas y 58% en vacas. Resultados que refuerzan el concepto de infección de lenta difusión dentro del predio con una presentación epidémica.

La distribución porcentual de los procesos de seroconversión e incidencia en el tiempo presentaron una imagen congruente en todos los predios, siendo importante resaltar que aunque algunos individuos presentaron más de un proceso de seroconversión y/o incidencia, no podían presentar ambas situaciones durante muestreos consecutivos, siendo la ocurrencia de los eventos de diferentes animales en cada punto.

En la finca 7 ambas curvas indican un proceso de infección localizado en el primer semestre del año (abril, mayo), proceso que se hace menos intenso el resto del año principalmente en Septiembre, posiblemente por un mejor estatus inmunológico de la población que le permite ir controlando en el tiempo la infección. Figura 15.

La finca 9 presenta 5 picos de infección con cierta ciclicidad, localizados en febrero, mayo, julio, septiembre y diciembre. Ambas curvas indican infección y reinfección en continuo ascenso, que la población aún no puede controlar debido al bajo estatus inmunológico encontrado en todos los grupos etáreos. Figura 15.

En la Finca 10 ambas curvas son similares, coincidiendo en casi todos los puntos de elevación el proceso de infección con el de reinfección, dichos procesos están localizados en marzo, junio, agosto y octubre, siendo el más intenso en agosto. Figura 15.

En la finca 11 se encontraron 3 procesos importantes de infección en marzo, junio y septiembre, sugestivamente igualmente espaciados, siendo el más pronunciado el observado en junio. En este caso y para todos los predios los procesos de seroconversión que suceden a los de incidencia serológica son

una continuación de la expresión serológica de infección. Figura 15.

Las fincas 7 y 9 presentaron los más bajos índices de seroconversión (1.15 y 1.00) en comparación con las fincas 10 y 11 donde fue similar (1.52 y 1.54), indicando que los animales de la cohorte de la finca 9 presentaron en promedio una

seroconversión por animal, distante de lo encontrado en la finca 10 de 3 seroconversiones por cada dos animales. En otras palabras los animales de las fincas 10 y 11 que tienen el título promedio más alto presentan más procesos acordes con reinfecciones, en relación con la finca 9 que está en un proceso

activo de infección y cuya población tiene el título promedio más bajo en todos los grupos etáreos.

CONCLUSIONES

El comportamiento serológico longitudinal en condiciones naturales tuvo amplia variabilidad entre y

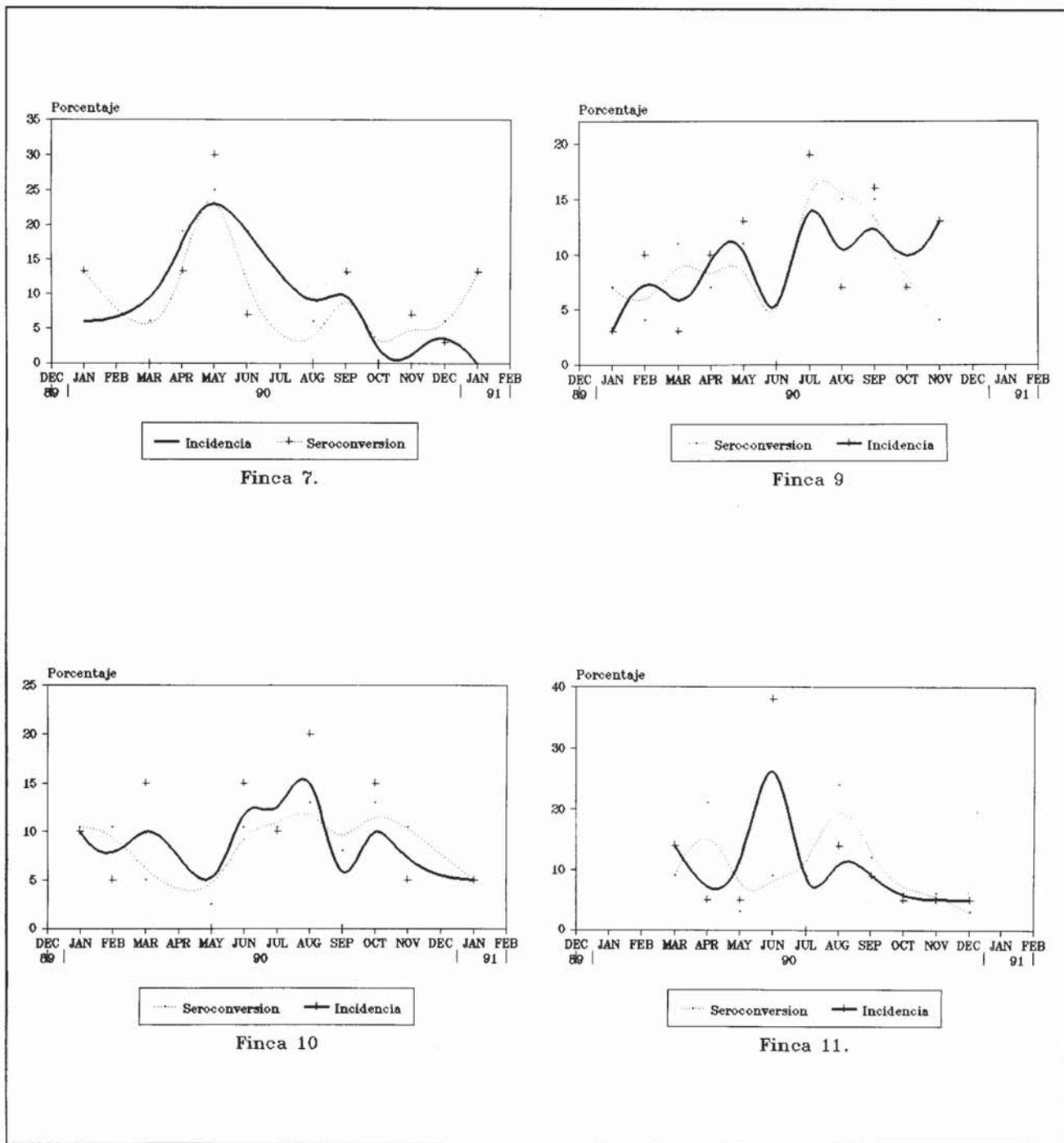


FIGURA 15. Curva de distribución porcentual de incidencia y serológica y seroconversión a DVB.

dentro de fincas, grupos etéreos e individuos, siendo la variable finca la más explícita respecto a la dinámica serológica. Ello plantea la dificultad de hacer inferencias sobre evolución o forma de presentación de la enfermedad en un predio o una población heterogénea con una evaluación serológica, siendo necesario 2-3 muestreos donde se incluyan diferentes grupos de edad. Aún así la sola evaluación por prueba de seroneutralización u otras pruebas serológicas no es suficiente y debe acompañarse de una excelente historia productiva-reproductiva para relacionarla con la respuesta serológica.

Las terneras, dependiendo del manejo característico de cada predio y de su contacto con animales

de mayor edad, son en predios infectados o en proceso de difusión de la infección un excelente grupo centinela que puede colaborar en la interpretación de los títulos en un predio, ya que el manejo individual de los títulos es irrelevante debido a la variabilidad normal que estos presentan.

Los títulos presentaron un histograma con apariencia normal donde los extremos de la curva aunque pueden ser infrecuentes son propios del tipo de distribución.

El comportamiento serológico observado sugiere una compleja interacción de variables dependientes del agente, la población, el medio ambiente y la intervención humana en las prácticas de mane-

jo, situación no evidenciada en experimentos controlados, es así como la dinámica en los predios denotó un ciclo de: actividad viral, respuesta inmune, control de la infección, descenso de la inmunidad de la población y nuevamente reactivación viral. Ciclo posiblemente favorecido por la presencia de inmunotolerantes, especialmente en predios endémicos.

A medida que el título promedio por finca fue mayor en las vacas, la variación mensual dentro de ellas fue menor existiendo correlación en la respuesta entre meses y respondiendo a un comportamiento endémico, donde los no reactivos sugieren con fuerza ser inmunotolerantes, en contraste en el predio donde el título medio de las vacas fue igual o similar al de terneras y

novillas la variabilidad fue mayor y el grado de reactividad se incrementa en todos los grupos etéreos, así mismo la correlación serológica entre sangrías fue menor indicando independencia entre ellas posiblemente por un proceso lento de infección, donde los no reactivos pueden ser en su mayoría susceptibles con respecto a los inmunotolerantes.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia, A la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, al Posgrado en Reproducción Animal y a Colciencias por su financiación, así como a los colegas que facilitaron el trabajo en las fincas.

BIBLIOGRAFIA

- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Catalogue of cell lines & hybridomas. 6 ed., p.16. 1988.
- BAKER, J. C. Bovine viral diarrhoea virus: A review. *JAVMA*, 190, (11): 1449-1458, Jun. 1, 1987.
- BARBER, D. M. L.; NETTLETON, P. F.; and HERRING, J. A. Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Record*, (117): 459-464, Oct. 6, 1985.
- BOLIN, S. R.; MATTHEWS, P. J.; and RIDPATH, J. F. Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, (3): 199-203, 1991.
- _____, LITLEDIKE, T. E.; and RIDPATH, J. F. Serological detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhoea viruses in a vaccinated herd. *Am. J. Vet. Res.* 52 (7): 1033-1037, July, 1991.
- _____, and RIDPATH, J. F. Range of viral neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Am. J. Vet. Res.*, 51 (5): 703-707, May., 1990.
- _____. Viral and viral protein specificity of antibodies induced in cows persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus after vaccination with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.*, 49 (7): 1040-1044, July, 1988.
- _____, SACKS, J. M.; and CROWDER, S. V. Frequency of association of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus with mononuclear leukocytes from persistently infected cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 48 (10): 1441-1445, Oct., 1987.
- BORDA, A. R. Diarrea Viral Bovina en terneros y terneras procedentes de Holanda. "Tesis". Méd Vet. Universidad Nacional de Colombia, (Bogotá), Sep., 1975.
- BROWNLIE, J.; CLARKE, M. C.; and HOWARD, C. J. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Research in Veterinary Science*, (46): 307-311, 1989.
- _____, CLARKE, M. C.; and HOWARD, C. J. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Veterinary Record*, (114): 535-536, June 2, 1984.
- CARNERO, R. Fiebre Porcina Africana. Serie: Salud Animal. Publicación Científica No. 3. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA. San José, Costa Rica, pp. 176-185, 1982.
- COLLETT, M. S.; LARSON, R.; BELZER, S. K.; and RETZEL, E. Proteins encoded by Bovine Viral Diarrhoea Virus: The Genomic Organization of a Pestivirus. *Virology*, (165): 200-208, 1988.
- CORAPI, W. V.; DONIS, R. O.; and DUBOVI, E. J. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.*, 51 (9): Sept., 1990.
- _____, FRENCH, T. W.; and DUBOVI, E. J. Severe Thrombocytopenia in Young Calves Experimentally Infected with Noncytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Journal of Virology*, 63 (9): 3934-3943, 1989.
- _____, DONIS, R. O.; and DUBOVI, E. J. Monoclonal Antibody Analyses of Cytopathic and Noncytopathic Viruses from Fatal Bovine Viral Diarrhoea Virus Infections. *Journal of Virology*, 622 (8): 2823-2827, 1988.
- CORTES, E. C. Seroneutralización para Diarrea Viral Bovina. In: Curso Latinoamericano teórico-práctico de actualización en Inmunología Veterinaria. Organización Panamericana de la Salud, OPS, Instituto Nacional de Investigaciones, forestales y Agropecuarias de México, Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Bogotá (Colombia), agosto 1/12, 1988.
- DE GALVIS HERNANDEZ, A. Caracterización de las proteínas antigénicas del virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) y su aplicación en inmunoensayos. Tesis MSc. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Santafé de Bogotá, 1991.
- DONE, T. J.; TERLECKI, S.; RICHARDSON, C.; HARKNES, W. J.; SANDS, J. J.; PATTERSON, P. D. S.; SWEASEY, D.; SHAW, G. I.; WINKLER, E. C.; and DUFFELL, J. S. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: Pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Veterinary Record*, (106): 473-479, June 7, 1980.
- DONIS, R. O.; and DUBOVI, E. J. Differences in Virus-Induced Polypeptides in Cells Infected by Cytopathic and Noncytopathic Biotypes of Bovine Virus Diarrhoea-Mucosal Disease Virus. *Virology*, (158): 168-173, 1987.
- DUBOVI, E. J. Molecular biology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 9, (1): 105-114, 1990.
- _____, CORAPI, W.; and DONIS, R. O. Probing the anti-

- genic diversity of cytopathic and noncytopathic BVD virus with monoclonal antibodies. *Amer. Assn. Veterinary Laboratory Diagnostician*, 29 Th annual proceedings. 259-270, 1986.
- DUFFELL, E.; and HARKNESS, W. J. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Veterinary Record*, (117): 240-245, Sept. 7, 1985.
- ERNST, B. P.; BAIRD, D. J.; and BUTLER, G. D. Bovine Viral Diarrhea: An Update. The Compendium on Continuing Education, 5 (11): Article 7, Nov., 1983.
- GALLEGO, M. I.; CORTES, E. C.; DE GALVIS, A. L. H. y DE AGUDELO, D. L. Diarrea Viral Bovina en Colombia. *Revista ANALAC*, (70): 10-13, 1987.
- GRAHN, T. C.; FAHNING, M. L.; and ZEMJAMIS, R. Nature of early reproductive failure caused by bovine viral diarrhoea virus. *JAVMA*, 185 (4): 429-432, Aug., 1984.
- GRIFFITHS, I. B.; GALLEGO, M. I. M.; y VILLAMIL, L. C. Factores de infertilidad y pérdidas económicas en ganado de leche en Colombia. *Instituto Colombiano Agropecuario-ANALAC*, Bogotá (Colombia), p. 154, 1982.
- HOOF, B. J. L.; WAMEL, J. L. B.; GENNIP, H. G. P.; and MOORMANN, R. J. M. Application of the polymerase chain reaction to the detection of bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary Microbiology*, (30): 21-34, 1992.
- HEWICKER, M.; WOHRMANN, T.; FERNANDEZ, A.; TRAUTWEIN, G.; LIESS, B. and MOENING, B. Immunohistological detection of bovine viral diarrhoea virus antigen in the central nervous system of persistently infected cattle using monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology*, 23: 203-210, 1990.
- JUSTEWICZ, D. M.; MAGAR, R.; MARSOLAIS, G., and LECOMTE, J. Bovine viral diarrhoea virus-infected MDBK monolayers as antigen in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of antibodies in bovine sera. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, (14): 377-384, 1987.
- KELLING, C. L.; STINE, L. C.; RUMP, K. K.; PARKER, R. E.; KENNEDY, J. E.; STONE, R. T.; and ROSS, G. S. Investigation of bovine viral diarrhoea virus infections in a range beef cattle herd. *JAVMA*, 197, (5): 589-593, 1990.
- KIRKLAND, P. D.; RICHARDS, S. G.; ROTHWELL, J. T.; and STANLEY, D. F. Replications of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Veterinary Record*, (128): 587-590, 1991.
- LEVINGS, R. L.; and WESSMAN, S. J. Bovine viral diarrhoea virus contamination of nutrient serum, cell culture and viral vaccines. *Develop. Biol. Standar.* (75): 177-181, 1990.
- LOKEN, T.; KROGSRUD, J.; and LARSEN, I. L. Pestivirus infections in Norway. Serological Investigation in Cattle, Sheep and Pigs. *Acta. Vet. Scand.* 32: 27-34, 1991.
- MAGAR, R.; and LECOMTE, J. Comparison of methods for concentration and purification of bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Virology Methods*, (16): 271-279, 1987.
- MEYERS, G.; TAUTZ, N.; DUBOVI, E.; and THIEL, H. J. Viral Cytopathogenicity Correlated with Integration of Ubiquitin-Coding Sequences. *Virology*, (180): 602-616, 1991.
- MOENING, V. Pestivirus: a review. *Veterinary Microbiology*, 23, 35-54, 1990.
- MOGOLLON, J. D. G.; GONZALEZ, H. E. Ch.; CORTES, E. C.; DE GALVIS, A. L. H.; DE AGUDELO, D. L.; y NEIRA, R. Descripción de un caso de Diarrea Viral Bovina (DVB) en la Sabana de Bogotá. *Revista ICA*, 25 (1): 26-33, enero/marzo, 1990.
- NAGELE, M. J. Outbreak of mucosal disease among apparently immunotolerant heifers. *Veterinary Record*, (115): 496-499, Nov. 10, 1984.
- NEATON, H. J. "Which BVD vaccine should I use?". *Veterinary Medicine*, 876-881, Sept., 1986.
- OHMANN, B. H. BVD virus Antigens in Tissues of Persistently Viremic, Clinically Normal Cattle: Implications for the Pathogenesis of Clinically Fatal Disease. *Acta. Vet. Scand.*, (29): 77-84, 1988.
- OTTE, E.; OTTE, J.; NAVARRETE, M.; ORJUELA, J. La Leptospirosis bovina en el departamento de Córdoba, Colombia 1982-1984. *Instituto Colombiano Agropecuario, ICA/ Deutsche Gesellschaft fuer Technische Zusammenarbeit, GTZ. Informe Técnico 9. Bogotá (Colombia)*, p. 53, 1991.
- _____; MORRISON, R. B.; NAVARRETE, M.; ORJUELA, J.; BETANCOURT, A.; y THREBILCOCK, E. P. Resultados de una encuesta sobre producción y salud animal en Córdoba, Colombia 1982-1984. *Instituto Colombiano Agropecuario, ICA/Deutsche Gesellschaft fuer Technische Zusammenarbeit, GTZ. Informe Técnico 4. Bogotá (Colombia)*, p. 47, 1989.
- PATON, D. J.; BROCKMAN, S.; and WOOD, L. Insemination of susceptible and preimmunized cattle with bovine viral diarrhoea virus infected semen. *Br. Vet. J.*, 146 (2): 171-174, 1990.
- POTTS, B. J.; SAWYER, M.; SHEKARCHI, I. C.; WISMER, T.; and HUDDLESTON, D. Peroxidase-labeled primary antibody method for detection of pestivirus contamination in cell culture. *Journal of Virological Methods*, (26): 119-124, 1989.
- PRITCHARD, G. C.; BORLAND, E. D.; and PRITCHARD, D. G. Severe disease in a dairy herd associated with acute infection with bovine virus diarrhoea virus, *Leptospira hardjo* and *Coxiella burnetii*. *Veterinary Record*, (124): 625-629, June 17, 1989.
- PURCHIO, A. F.; LARSON, R.; and COLLETT, M. S. Characterization of Bovine Viral Diarrhoea Virus Proteins. *Journal of Virology*, 50 (2): 666-669, May., 1984.
- SHIRAI, J.; TANAKA, Y.; and HORIUCHI, T. Interference Patterns between Strains of Bovine Viral Diarrhoea-Mucosa! Disease (BVD-MD) Virus. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 46 (6): 901-904, 1984.
- STAUBER, E. H.; ABINANTI, F. R.; and WHITBECK, G. D. Seroepizootiology of Types 3 and 7 adenovirus and bovine viral diarrhoea virus infections of beef cattle from birth to first parturition. *Am. J. Vet. Res.*, 47 (4): 774-776, April, 1986.
- STEEL, R. G. D.; y TORRIE, J. H. *Bioestadística: Principios y procedimientos. Traducción: Martínez R. B. Mc Graw-Hill, Ed. 2, p. 621, Bogotá (Colombia)*, 1985.
- SUGIYAMA, M.; ITOH, O.; and SASAKI, H. Difference in ability to cause interference of homologous strains of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. *Ann. Rep. Natl. Vet. Assay Lab.*, 21: 11-17, 1984.
- VERA, V. A.; PARRA, A. J.; RAMIREZ, N. G.; y VILLAMIL, J. C. El virus de la D.V.B. como agente contaminante en el cultivo de tejidos animales. *Biomédica* 12, (1): 10-14, 1992.
- VIRAKUL, P.; FAHNING, M. L.; JOO, H. S.; and ZEMJAMIS, R. Fertility of cows challenged with a cytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus during an outbreak of spontaneous infection with a noncytopathic strain. *Theriogenology*, 29 (2): 441-449, Feb., 1988.
- WHITMORE, H. L.; ZEMJAMIS, R.; and OLSON, J. Effect of Bovine Viral Diarrhoea Virus on Conception in Cattle. *JAVMA*, 178 (10): 1065-1067, May 15, 1981.
- WILHELMSEN, C. L.; BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F.; CHEVILLE, N. F.; and KLUGE, J. P. 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 (2): 269-274, Feb., 1991.