

PLOS ONE

Comparación de la producción de leche de vacas vacunadas con una vacuna viva de doble deleción frente al BVDV y vacas no vacunadas que cohabitan en rebaños comerciales endémicamente infectados por el virus de la BVD



Ellen Schmitt-van de Leemput, Lucy V. A. Metcalfe, George Caldow, Paul H. Walz, Christian Guidarini



Cita: Schmitt – van de Leemput E, Metcalfe LVA, Caldwell G, Walz PH, Guidarini C (2020) Comparison of milk production of dairy cows vaccinated with a live double deleted BVDV vaccine and non-vaccinated dairy cows cohabitating in commercial herds endemically infected with BVD virus. PLoS ONE 15 (10): e0240113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240113>

Editor: Juan J. Loo, Universidad de Illinois, ESTADOS UNIDOS

Recibido: 5 de marzo de 2020; **Aceptado:** 18 de septiembre de 2020; **Publicado:** 1 de octubre de 2020

Copyright: © 2020 Schmitt – van de Leemput *et al.* Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de Creative Commons Attribution License, que permite el uso, la distribución y la reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que se acredite el autor original y la fuente.

Disponibilidad de datos: todos los datos relevantes están dentro del artículo original y sus archivos de información complementaria.

Financiamiento: este estudio fue financiado por Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH (<https://www.vetmedica.de/>). El financiador brindó apoyo en forma de salarios para los autores (Christian Guidarini y Lucy Metcalfe) y de patrocinio del estudio de campo (costes de supervisión, garantía de calidad, análisis de laboratorio, recopilación y gestión de datos y análisis estadístico), pero no tuvo ningún papel adicional en el diseño del estudio, la decisión de publicar o la preparación del artículo original. Las funciones específicas de estos autores se incluyen en la sección “Contribuciones de los autores”.

Conflicto de intereses: he leído la política de la revista y los autores de este artículo original y tienen los siguientes conflictos de intereses: Lucy Metcalfe y Christian Guidarini son ambos empleados de Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH. El financiador brindó apoyo en forma de salarios para 2 de los autores (CG y LM) y de patrocinio del estudio, pero esto no altera nuestro cumplimiento de las políticas de PLOS ONE sobre el intercambio de datos y materiales.

Comparación de la producción de leche de vacas vacunadas
con una vacuna viva de doble delección frente al BVDV
y vacas no vacunadas que cohabitan en rebaños comerciales
endémicamente infectados por el virus de la BVD

Ellen Schmitt-van de Leemput

Lucy V. A. Metcalfe

George Caldow

Paul H. Walz

Christian Guidarini

Comparación de la producción de leche de vacas vacunadas con una vacuna viva de doble delección frente al BVDV y vacas no vacunadas que cohabitan en rebaños comerciales endémicamente infectados por el virus de la BVD

Ellen Schmitt-van de Leemput, Lucy V. A. Metcalfe, George Caldow, Paul H. Walz, Christian Guidarini

Publicado: 1 de octubre de 2020 • <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240113>

Resumen

Se comparó la producción diaria de leche y el rendimiento reproductivo de las vacas vacunadas con una vacuna viva de doble delección frente al virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) con vacas no vacunadas, que cohabitan en explotaciones lecheras endémicas de BVDV. Todos los animales del grupo de tratamiento recibieron la vacuna el día 0 del estudio independientemente del momento de lactación o gestación, mientras que los animales de control no recibieron ningún tratamiento. Se inscribieron 1.463 animales en el estudio procedentes de cuatro granjas en tres países diferentes (Reino Unido, Italia y Francia). La presencia endémica del BVDV en los rebaños del estudio se demostró mediante la detección del virus en tanque de leche, y la seroconversión se evaluó al comienzo del estudio. Individualmente para cada animal se tomó el día del parto como el inicio de la lactación para el cálculo de días en leche (DEL). El periodo de lactación estandarizado de 305 días se dividió en tres periodos: lactación inicial (LI, del DEL 8 al DEL 102), lactación media (LM, de DEL 103 al DEL 204) y lactación tardía (LT, del DEL 205 al DEL 305). Para cada granja y cada periodo de lactación, se realizó un análisis estadístico de modelo mixto con la producción diaria de leche como respuesta, y el grupo, el día y la interacción entre esos dos factores como factores fijos. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado para comparar la tasa de abortos y la tasa de intervalo inter-estro prolongado entre los grupos de tratamiento y de control. Se observó un aumento significativo en la producción de leche en el grupo vacunado en las granjas 1 (1,023 l/día) y 3 (0,611 l/día) durante la LI ($p < 0,001$) y en la granja 2 (1,799 l/día) durante la LM ($p < 0,001$). Además, en la granja 2, las vacas vacunadas produjeron más leche que las no vacunadas a partir del DEL 80. No se encontraron diferencias entre los grupos en las tasas de aborto o en las tasas del intervalo inter-estro. Los datos demuestran que las vacas vacunadas con una vacuna viva de doble delección procedentes de rebaños con infección endémica por el BVDV producen más leche; la citada diferencia en la producción de leche ocurre durante el periodo de lactación inicial (LI).

Introducción

El virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*¹. El virus se describió por primera vez en Nueva York en 1946 y se ha identificado en la mayoría de los países productores de ganado bovino de todo el mundo^{2,3}. El BVDV puede hallarse en una amplia variedad de líquidos corporales, como secreciones nasales, orina, leche, semen, saliva, lágrimas y líquidos fetales⁴. La fuente más importante de infección por BVDV es el ganado bovino infectado de forma persistente (PI)⁵. Los animales con infección persistente son inmunotolerantes al virus persistente y excretan partículas víricas infectivas durante toda su vida. En las vacas no inmunes que no están preñadas, las infecciones agudas por el BVDV provocan viremia transitoria⁶. Las infecciones de las vacas preñadas dan al virus la oportunidad de atravesar la placenta y causar infección fetal. La aparición de una infección fetal depende de la edad del feto en el momento de la infección por el BVDV. El resultado puede ser la muerte embrionaria, efectos teratogénicos en el feto o el nacimiento de un ternero PI^{7,8}. Los terneros PI pueden ser pequeños, débiles y presentar problemas de crecimiento, aunque con mayor frecuencia tienen un aspecto sano y pueden pasar desapercibidos dentro del rebaño⁹.

Las consecuencias de la infección transitoria, en particular la disminución de la fertilidad y la inmunosupresión, pueden ser profundas¹⁰. Los efectos de la infección aguda por BVDV en vacas sobre el rendimiento reproductivo se han considerado como los más costosos e incluyen una tasa de concepción reducida, muerte embrionaria, abortos y defectos congénitos⁸. Los mecanismos subyacentes de la infertilidad y las enfermedades reproductivas inducidas por el BVDV son multifactoriales y pueden implicar impactos directos del virus en los tejidos reproductivos, incluido el feto en desarrollo, y efectos indirectos a través de la alteración del sistema inmunológico¹¹. El BVDV o antígenos específicos del virus pueden identificarse en tejidos del tracto reproductivo del ganado infectado, y se ha demostrado que la infección por BVDV altera las funciones endocrinas de los tejidos del sistema reproductivo¹¹. Indirectamente, la infección por BVDV de los bovinos sin tratamiento previo puede hacerlos más sensibles a infecciones secundarias a través de la inmunosupresión¹². El BVDV es linfotrópico, y el ganado con infección transitoria puede presentar una alteración en el sistema inmunitario debido a los efectos combinados de la reducción de la cantidad de las células inmunitarias y la disminución en la funcionalidad de las células inmunitarias restantes¹³.

Las células del sistema inmunitario de las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas, pueden verse afectadas durante la infección por BVDV. La eliminación de los leucocitos infectados por el BVDV (inmunodepleción) por parte del sistema inmunitario, la destrucción de las células inmunitarias por el BVDV y el aumento del tráfico de células inmunitarias hacia las localizaciones tisulares de replicación viral se combinan para producir leucopenia.

La infección por BVDV es una enfermedad del ganado bovino económicamente importante; la estimación específica de sus costes es difícil¹⁴. Las revisiones económicas globales describen pérdidas que pueden oscilar entre 0 y 552 £ por vaca y año (2370 £ incluyendo los valores atípicos)¹⁵. Las pérdidas descritas como asociadas con el BVDV incluyen sacrificios voluntarios prematuros y un valor al sacrificio reducido, pérdidas por mortalidad, aborto y otras pérdidas reproductivas, gastos veterinarios y de tratamiento, coste de mano de obra adicional y reducción de la producción de leche¹⁶. La gran variación en las pérdidas relacionadas con el BVDV no solo depende de las características relacionadas con la cepa infectante, sino también de factores tanto a nivel del rebaño como individuales, como enfermedades concomitantes,

la gestión y la inmunidad del rebaño. Es de gran importancia el número de animales en riesgo, en una fase crítica de la reproducción, en el momento de la exposición al virus. Los costes descritos varían sustancialmente dependiendo de si la infección es epidémica, es decir, introducción del virus en animales seronegativos que constituyen poblaciones vulnerables, o endémicas, es decir, diseminación en todo el rebaño^{16,17}. Se han descrito graves pérdidas económicas en situaciones epidémicas, mientras que, en rebaños con BVDV endémico, la exposición previa de animales al virus ha dado lugar al desarrollo de cierto nivel de inmunidad natural que minimiza las pérdidas asociadas¹⁶.

La reducción de la producción de leche es un componente importante de las pérdidas económicas debidas al BVDV¹⁷. La magnitud del impacto del BVDV sobre la producción de leche también depende de la naturaleza de la infección. Los informes de brotes epidémicos de BVDV describen reducciones repentinas en la producción de leche, mientras que una comparación de los niveles de producción en las granjas antes y después de la erradicación del BVDV describe una tendencia general de aumento de la producción de leche^{18,19}. En condiciones endémicas, Moerman *et al.* encontraron una reducción significativa en la producción de leche en vacas con seroconversión frente al BVDV en comparación con los animales del rebaño sin seroconversión, y los valores altos de anticuerpos en leche de tanque se han correlacionado con una menor producción de leche^{20,21}. El BVDV tiene tanto efectos directos como indirectos sobre la producción de leche debido al aumento de los retornos a celo que provocan intervalos de parto prolongados y una mayor incidencia de enfermedades^{17,22}. Se ha postulado que la alteración del sistema inmunitario que conduce a un aumento de la tasa de mastitis clínica, el uso de energía procedente de la alimentación para la función inmunitaria, el aborto y la combinación de fiebre y disminución del apetito explican el impacto en la producción de leche²¹.

El objetivo de este estudio fue evaluar si la vacunación contra la infección por BVDV con una vacuna con virus de la BVD vivo con doble delección (Bovela®) puede prevenir la reducción de la producción de leche en rebaños infectados por el BVDV. Para ello, se realizó con éxito un ensayo clínico en granjas lecheras comerciales. En el mismo rebaño y en el mismo día, la mitad de los animales fueron vacunados con Bovela® y la otra mitad de los animales sirvió como control y no recibió tratamiento.

Materiales y métodos

Selección de las granjas y los animales

Desde enero de 2017 hasta diciembre de 2017, se incluyeron en el estudio cuatro granjas lecheras comerciales con más de 100 vacas en producción en tres países diferentes (granjas 1 y 2: Reino Unido, granja 3: Italia y granja 4: Francia). Los rebaños debían estar equipados con un sistema individual de registro de producción de leche diaria (medidores de leche en línea) y debían tener registros de enfermedad, tratamiento, inseminación y datos de movimiento de animales. Tres de las granjas utilizaron sistemas de ordeño convencionales (granjas 1 [Metatron p21, GEA, Alemania], 2 [Weighall, Dairymaster, Irlanda] y 3 [Afiflo 2000, Afimilk {Israel}]) y una cuarta granja usó unidades de ordeño automáticas (granja 4 [Ponderal, Lely, Países Bajos]). La raza de vacas presente en todas las granjas fue Holstein. Se excluyeron los rebaños que habían sido vacunados con una vacuna de virus vivo atenuado frente a la BVD (en los 5 años anteriores a la inclusión) o con una vacuna de virus de la BVD inactivado (en las 3 semanas anteriores al inicio del estudio). Estos criterios de exclusión se seleccionaron basándose

en el consenso general de que la protección obtenida por una vacuna viva es más amplia y de mayor duración²³. Por lo tanto, la exclusión de 3 semanas para una vacuna con virus inactivado fue para evitar una posible interferencia con la producción de leche, que puede verse afectada negativamente poco después de la administración de una vacuna adyuvantada, o la respuesta inmunitaria causada por la administración de dos vacunas de BVDV en estrecha proximidad temporal. Se eligió una exclusión mucho más prolongada, de 5 años, para las vacunas con virus vivo con el fin de evitar la inclusión de rebaños que aún podrían tener una amplia protección inducida por una vacuna previa de BVD con virus vivo.

La granja 3 informó de un uso único de una vacuna inactivada de BVD en las vacas en lactación del rebaño, que se había administrado siete meses antes del día 0 del estudio (DE 0). Las otras granjas no habían usado ninguna vacuna contra el BVDV antes del inicio del estudio. Todas las hembras (vacas lactantes, vacas secas y novillas) mayores de 10 meses presentes en la granja el día de la vacunación fueron aptas para su inclusión en el estudio. El día anterior a la vacunación (día del estudio menos 1 [DE -1]), se realizó una observación del estado de salud general y los animales con una situación anormal se sometieron a una exploración clínica, incluida la evaluación de cojera. Los animales no sanos, incluidos aquellos con cojera de grado 4 o 5 (cojera grave), fueron excluidos de la participación en el estudio; sin embargo, estos animales permanecieron en el rebaño²⁴. El DE 0 471, 316, 499 y 177 animales se incluyeron en el estudio en las granjas 1, 2, 3 y 4, respectivamente. El número total de vacas lactantes, vacas secas y novillas para los dos grupos de tratamiento se describe en la Tabla 1, así como el número de animales que se determinó que no eran aptos para la inclusión. La producción media de leche fue similar para las granjas 1, 2 y 4 (entre 30 y 32 l/día/vaca) y de entre 41 y 42 l/día/vaca para la granja 3.

Tabla 1. Distribución de los animales en los grupos de tratamiento según su estado fisiológico el día de la vacunación (DE 0).

	Todos los animales incluidos			Vacas en lactación		Vacas secas		Novillas no lactantes	
	Total (E SD-1) ^a	G1 ^b	G2 ^c	G1 ^b	G2 ^c	G1 ^b	G2 ^c	G1 ^b	G2 ^c
Granja 1	471 (2)	237	234	127	126	23	19	87	89
Granja 2	316 (11)	158	158	89	89	18	15	51	54
Granja 3	499 (0)	250	249	133	132	19	23	98	94
Granja 4	177 (4)	89	88	49	52	4	3	36	33

Algunos animales fueron excluidos del estudio debido a motivos de salud (EDE-1). Esos animales no fueron incluidos en ninguno de los grupos de tratamiento pero permanecieron presentes en la granja.

^aAnimales excluidos el DE -1 (por razones de salud) que permanecieron presentes en la granja.

^bGrupo de tratamiento 1: vacunación con 2 ml de Bovela® por vía intramuscular.

^cGrupo de tratamiento 2: no tratados.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240113.t001>

En última instancia, para la inclusión se requería una prueba de infección por BVDV dentro del rebaño durante los seis meses anteriores al inicio del estudio. Los animales se alojaron y alimentaron de acuerdo con los estándares habituales para cada granja. La duración del estudio fue de 365 días a partir del día de la vacunación (Día 0 del estudio [DE 0]), y el estudio se realizó de acuerdo con las directrices de buenas prácticas clínicas (CGP), que garantizan el mantenimiento de niveles aceptables de bienestar animal. El producto comercial fue administrado como parte de las medidas estándar de prevención de enfermedades, de acuerdo con las pautas indicadas en el documento de características del producto, por parte de veterinarios colegiados. Por estas razones,

y por la ausencia de procedimientos invasivos, no se requirió más aprobación del comité de ética de investigación con animales.

Prueba de infección endémica por BVDV

Se consideró que los rebaños estaban endémicamente infectados por BVDV si el virus se detectaba mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en leche de tanque dentro de los seis meses anteriores al DE 0. Las muestras se recogieron en tubos que contenían un agente conservante (bronopol) y se enviaron a temperatura ambiente al laboratorio en 24 horas. La presencia de BVDV en la leche y el suero se determinó mediante PCR utilizando un kit comercial (VetMAX Gold BVDV Detection kit, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Según el fabricante, este ensayo de panpestivirus es capaz de detectar otros pestivirus, como el virus de la enfermedad de la frontera. Este kit empleó un protocolo de RT-PCR en tiempo real de un solo paso. La PCR de transcriptasa inversa en tiempo real (RT-PCR) de un solo paso permite la transcripción inversa seguida de amplificación por PCR y unión fluorescente de sondas específicas de genotipo en un solo pocillo. Las muestras se consideraron positivas para el objetivo perseguido si el valor del umbral del ciclo (Ct) era ≤ 37 . Las muestras con valores de $Ct > 37$ se consideraron inconcluyentes y aquellas con valores de Ct indeterminados se consideraron negativas.

En el DE 0, se recogió una muestra de sangre para cribado de vacas lactantes ($n=10$ por grupo de tratamiento) en cada granja en tubos de muestra secos estériles para la detección de anticuerpos frente al BVDV. Los anticuerpos frente al BVDV en suero se detectaron usando un inmunoensayo ligado a enzimas indirecto (ELISA Indirecto. Prueba de anticuerpos totales frente al BVDV IDEXX). Las muestras se consideraron positivas para anticuerpos contra el BVDV cuando la densidad óptica (DO) de la muestra dividida entre la DO del control positivo menos la DO del control negativo fue mayor o igual a 0,30. Para los animales con resultado negativo en la prueba ELISA, se realizó una PCR del BVDV para detectar la posible presencia del virus. Durante el estudio, se controló la presencia de BVDV mediante análisis mensuales por PCR de BVDV en leche de tanque. El procedimiento y los análisis de muestreo de leche de tanque fueron idénticos a los descritos para las muestras recogidas durante los seis meses anteriores al DE 0.

Procedimiento de vacunación

En el DE 0, todos los animales sanos fueron inmovilizados para ser vacunados en los sistemas de retención adecuados. Los animales se asignaron al grupo de tratamiento (G1 vacunados, G2 sin tratamiento) según el orden de aparición en el área de inmovilización; se asignó el grupo del primer animal y posteriormente se vacunó o no de manera consecutiva y alternativa a los siguientes. Los animales del G1 fueron vacunados con una dosis de vacuna de BVDV monovalente de doble delección génica (Bovela®, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Alemania) por vía intramuscular en la región del cuello mediante material estéril de un solo uso. Los animales del G2 no recibieron ningún tratamiento, por lo que no hubo procedimiento de inyección. No se administró un placebo debido al requisito de que Bovela® se usara dentro de los términos de su autorización de comercialización, y no se realizaron procedimientos médicos injustificados en ningún animal de estudio, como se indicó anteriormente.

Bovela® es una vacuna viva modificada destinada a la inmunización activa de ganado contra el BVDV de tipo 1 y tipo 2 y solo debe administrarse a animales sanos.

Se ocultaron a los grupos de tratamiento para el personal de la granja y del laboratorio. No se ocultaron a los investigadores (veterinario de la explotación) ni a los monitores del estudio la asignación a los grupos de tratamiento, ya que los parámetros del estudio medidos eran objetivos.

Observación de los animales durante el estudio

El investigador fue responsable de todos los aspectos relacionados con la realización del estudio individualmente en cada explotación durante todo el tiempo que duró el estudio (365 días). Se animó a los ganaderos a ponerse en contacto con el investigador en cualquier momento en caso de sospechar de problemas de salud de los animales del estudio. A criterio del ganadero, los animales fueron examinados y tratados por él o por el investigador. Todas las incidencias de enfermedades se comunicaron al investigador al menos una vez al mes, y se realizaron más investigaciones cuando se consideró necesario. Se utilizaron los datos de tratamiento del registro oficial de la granja, bien en versión impresa (granja 2) o en versión electrónica (granjas 1, 3 y 4). Las necropsias de los animales que murieron durante el periodo de estudio, incluidos los abortos y mortinatos, se realizaron de acuerdo con el protocolo estándar de los laboratorios veterinarios regionales acreditados. En todos los casos, el requisito mínimo fue que se analizaran las muestras fetales y de sangre de la madre para detectar la presencia de antígenos y anticuerpos del BVDV. Otras enfermedades, como Neospora, Fiebre Q, Salmonelosis, Leptospirosis y Brucelosis, se analizaron según el criterio de los investigadores y ganaderos.

Recogida de datos

Se recopilaron datos sobre la producción diaria de leche, el rendimiento reproductivo y los movimientos de los animales (celo, inseminación, parto, secado, sacrificio) durante 365 días, comenzando el DE 0. La producción diaria de leche por vaca se midió mediante medidores de leche en línea. En cada granja, una organización local acreditada probó y calibró el equipo antes del inicio del estudio. El rendimiento reproductivo se midió mediante la tasa de abortos (número de abortos durante el estudio/número de vacas lactantes el DE 0 x 100) y la tasa de mortalidad embrionaria. Dado que la mortalidad embrionaria se asocia con una mayor duración del ciclo estral, la tasa de mortalidad embrionaria se estimó a partir del número de ciclos de más de 24 días, lo que se conoce como “intervalos interestrales prolongados”²⁵. La duración del intervalo se definió por el número de días entre dos inseminaciones o una observación del celo (no seguida de inseminación) y la inseminación en el celo posterior observado. Los intervalos regulares se representaron por la duración del ciclo de 18 a 24 días, y los intervalos interestrales prolongados por la duración del ciclo de 25 a 80 días. La tasa de intervalos interestrales prolongados se calculó como el número de intervalos interestrales prolongados/(intervalos estrales normales + número de intervalos interestrales prolongados) x 100. Los datos se exportaron mensualmente (quincenalmente para los datos de producción de leche) desde el software informático de gestión del rebaño o una base de datos nacional (Insemination and animal movement, Reino Unido) al investigador. Para cada lactación, se tuvo en cuenta para el análisis la producción de leche desde los 7 días después del parto (DEL) hasta el DEL 305. Si los animales experimentaron periodos de lactación inferiores a 305 días, el día anterior al secado se excluyó del conjunto de datos. Se excluyeron de los análisis las lactaciones con una duración inferior a 30 días. Además, los datos de producción de leche durante los periodos de tratamiento de la enfermedad y el tiempo de retirada de antibióticos, no se analizaron desde el día anterior al inicio del tratamiento, y hasta el día siguiente a la conclusión del tiempo de retirada. Las vacas en lactación que fueron vacunadas cerca

del secado experimentaron dos lactaciones durante el periodo de estudio (una antes del secado y otra después del secado), y ambas lactaciones se incluyeron en el análisis. El rango de lactación se refiere al número de lactación en el que se encuentra la vaca en el momento en que se registra la producción diaria de leche.

Análisis de los datos

Para los animales individuales, el día del parto se tomó como el inicio de la lactación (DEL 1). El periodo de lactación estándar de 305 días se dividió en tres periodos: lactación inicial (LI, del DEL 8 al DEL 102), lactación media (LM, del DEL 103 al DEL 204) y lactación tardía (LT, del DEL 205 al DEL 305). Para cada granja y cada periodo de lactación, se utilizó un modelo mixto para analizar la producción diaria de leche. El grupo y el día, así como la interacción entre esos dos factores, se consideraron factores fijos en el modelo. Se realizaron mediciones repetidas en cada vaca a lo largo de los días, y los días se modelaron como una variable categórica. Para capturar las correlaciones entre las observaciones del mismo sujeto, se utilizó la estructura de varianza y covarianza autorregresiva (AR (1)). Se utilizó la simetría compuesta (SC) si los modelos presentaban falta de convergencia. El rango de lactación se consideró una covariable en el modelo. Si la interacción entre el grupo y el día fue significativa, se compararon las vacas de G1 y G2 para cada día. Si la interacción grupo por día no era significativa, se eliminaba la interacción del modelo y se comparaban los grupos de vacas G1 vs. G2 con el factor de confusión “día” incluido en el modelo. La normalidad de los residuos se verificó mediante la visualización de la distribución de residuos de Pearson. Para cada granja (1, 2, 3 y 4) se realizó una prueba de Chi-cuadrado para comparar la tasa de abortos y la tasa de intervalos interestrales prolongados entre el G1 y el G2. Si los números teóricos observados eran inferiores a 5, se utilizó una prueba exacta de Fisher. Los análisis estadísticos se realizaron con un error de tipo I establecido en $\alpha=5\%$, con pruebas de dos colas, utilizando SAS BASE 9.4 SAS/STAT 13.1 (SAS Institute Inc., Carry, NC, EE. UU.).

Resultados

Prueba de infección endémica por BVDV

Se detectó BVDV en leche de tanque mediante PCR de todas las granjas en al menos una ocasión durante los seis meses anteriores a la vacunación. Todas las muestras de sangre (100%) el DE 0 (n=20 por granja) fueron positivas para anticuerpos contra el BVDV en las granjas 2, 3 y 4. En la granja 1, el 75% (15/20) de las muestras de suero fueron positivas para anticuerpos contra el BVDV. La seroconversión puede ser inducida por infección natural con el BVDV o por vacunación contra el BVDV. Las vacas ubicadas en la granja 3 habían sido vacunadas contra el BVDV antes de su inclusión en el estudio; por lo tanto, para este rebaño, la seroconversión no proporciona información adicional sobre la naturaleza de la exposición al BVDV. El BVDV no se detectó mediante PCR en ninguna de las muestras de suero que no tenían anticuerpos detectables. En las granjas 2, 3 y 4, el BVDV continuó identificándose en tanque de leche en las muestras recogidas cada mes (Tabla 2). En la granja 2, por razones específicas de la granja, los resultados no estuvieron disponibles en aproximadamente la mitad de las ocasiones mensuales de muestreo de tanque de leche.

Tabla 2. Resultados de los análisis mensuales del BVDV por PCR de tanque de leche.

	Previo al día DE 0	DE 0 ^b	M1 ^c	M2 ^c	M3 ^c	M4 ^c	M5 ^c	M6 ^c	M7 ^c	M8 ^c	M9 ^c	M10 ^c	M11 ^c	M12 ^c
Granja 1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Granja 2	+	Em ^d	-	Em ^d	-	+	+	Em ^d	Em ^d	+	+	Em ^d	Em ^d	+
Granja 3	+	-	+	-	-	Em ^d	-	-	-	-	-	-	-	Em ^d
Granja 4	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-

Las muestras fueron consideradas positivas para BVDV si el valor del umbral del ciclo (Ct) es ≤ 37 . Las muestras con valores de Ct > 37 se consideraron no concluyentes. Muestras con un valor Ct indeterminado se consideraron negativas.

^aMuestras de tanque de leche tomadas como máximo 6 meses antes del inicio del estudio (DE 0).

^bMuestras de tanque de leche tomadas el día de la vacunación.

^cMuestras de tanque de leche tomadas durante el primero, segundo, tercer, etc mes después de la vacunación.

^dResultado no disponible debido a fallos en la toma de muestras o en el envío. Error en la muestra.

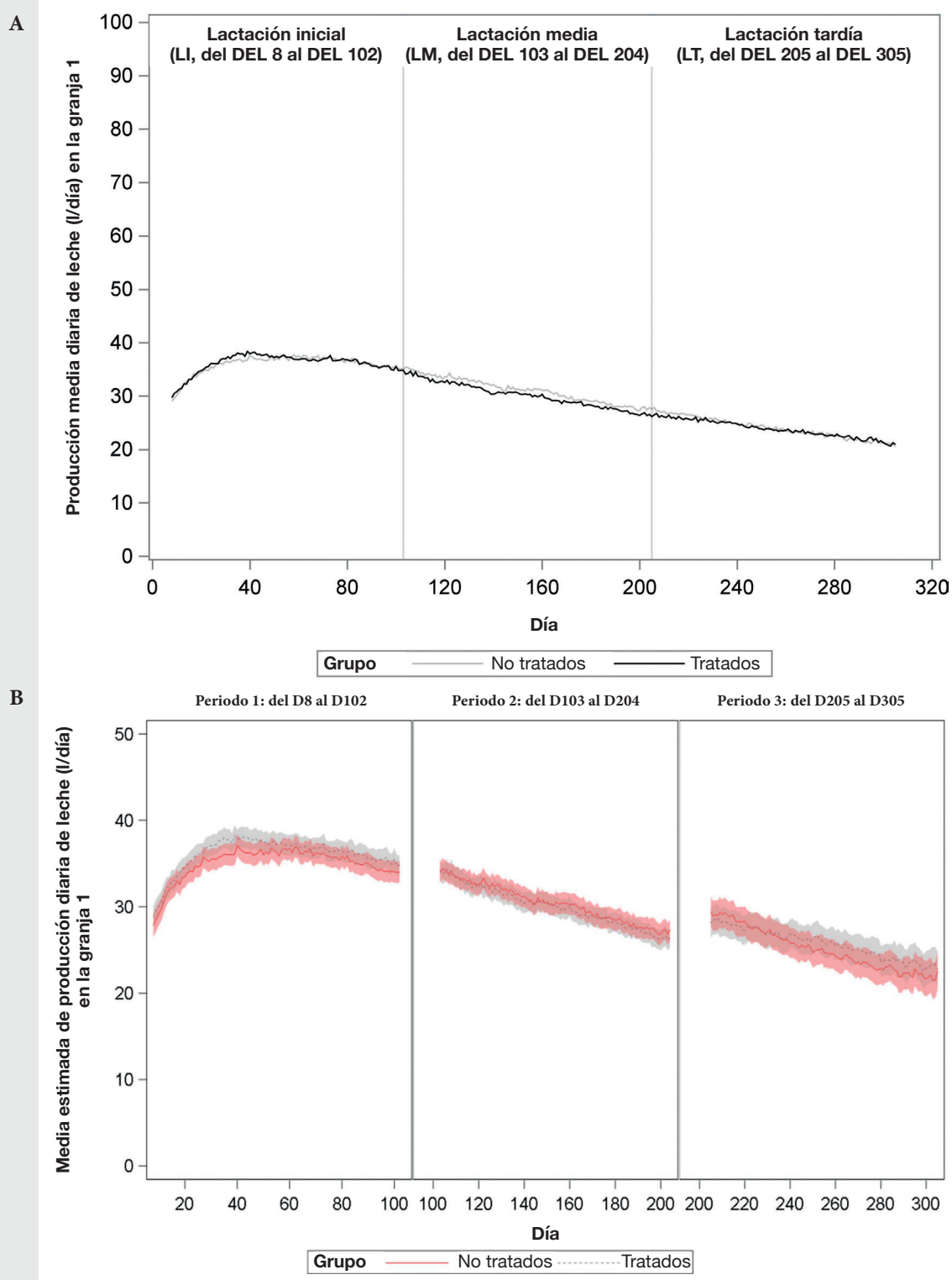
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240113.t002>

Vacunación

Se inscribieron un total de 1463 animales en el estudio procedentes de las 4 granjas, consistentes en 734 animales del G1 y 729 animales del G2 (Tabla 1) distribuidos en las etapas de lactación definidas (Tabla 2). Los acontecimientos adversos potencialmente relacionados con el procedimiento de vacunación se sometieron a un seguimiento estricto. 42 días después de la vacunación, un animal del G1 tenía una temperatura rectal elevada (41 °C) e inflamación purulenta en el lugar de la inyección. No se informó de pérdidas de gestación durante los 15 días posteriores al tratamiento en el G1 o el G2. Ningún acontecimiento adverso para la salud ocurrido durante el estudio estuvo relacionado con el uso de la vacuna Bovela®, según el criterio de los investigadores.

Análisis de los datos de producción de leche

Durante el periodo total de estudio de 365 días, los datos de la producción de leche de 1197 vacas fueron aptos para el análisis, y estas vacas representaron 1559 lactaciones. Los datos de 28 lactaciones (1,9%) no se pudieron utilizar debido a la corta duración de las mismas. Para estas vacas, la vacunación ocurrió menos de 30 días antes del secado, o bien el animal parió cerca del final del estudio, de modo que se recopilaron menos de 30 días de datos de producción de leche. La distribución de las lactaciones según el grupo de tratamiento, el rango de lactación y la etapa de lactación se expone en la Tabla 3. El cambio en el tiempo medio de la producción de leche diaria en las granjas 1-4 se muestra en las Figuras 1A-4A, y el de las estimaciones medias de la producción diaria de leche, después del ajuste por rango de lactación, en las Figuras 1B-4B, respectivamente. Se observó un aumento significativo en la producción de leche en las vacas del G1 en comparación con las vacas del G2 en las granjas 1 (1,023 l/día, $p=0,001$) y 3 (0,611 l/día, $p=0,011$) durante la LI y en la granja 2 (1,799 l/día, $p<0,001$) durante la LM. En la granja 2, las vacas del G1 produjeron más leche que las vacas del G2 a partir del DEL 80. No se encontraron otras diferencias significativas en la producción de leche.

**Figura 1.**

A. Evolución en el tiempo de la producción media diaria de leche (l/día) en la granja 1 para cada grupo de tratamiento. Los análisis se realizaron por periodo de lactación. Durante el primer periodo de lactación (lactación inicial, LI, 8-102 DEL) la producción de leche de las vacas vacunadas fue significativamente diferente de la producción de leche de los animales no vacunados (+1,023 l/día/vaca). Durante el segundo (lactación media, LM, 103-204 DEL) y el tercer periodo de lactación (lactación tardía, LT, 205-305 DEL) no se observaron diferencias en la producción de leche.

B. Evolución en el tiempo de la producción media de leche diaria estimada (l/día) en la granja 1 para cada grupo de tratamiento.

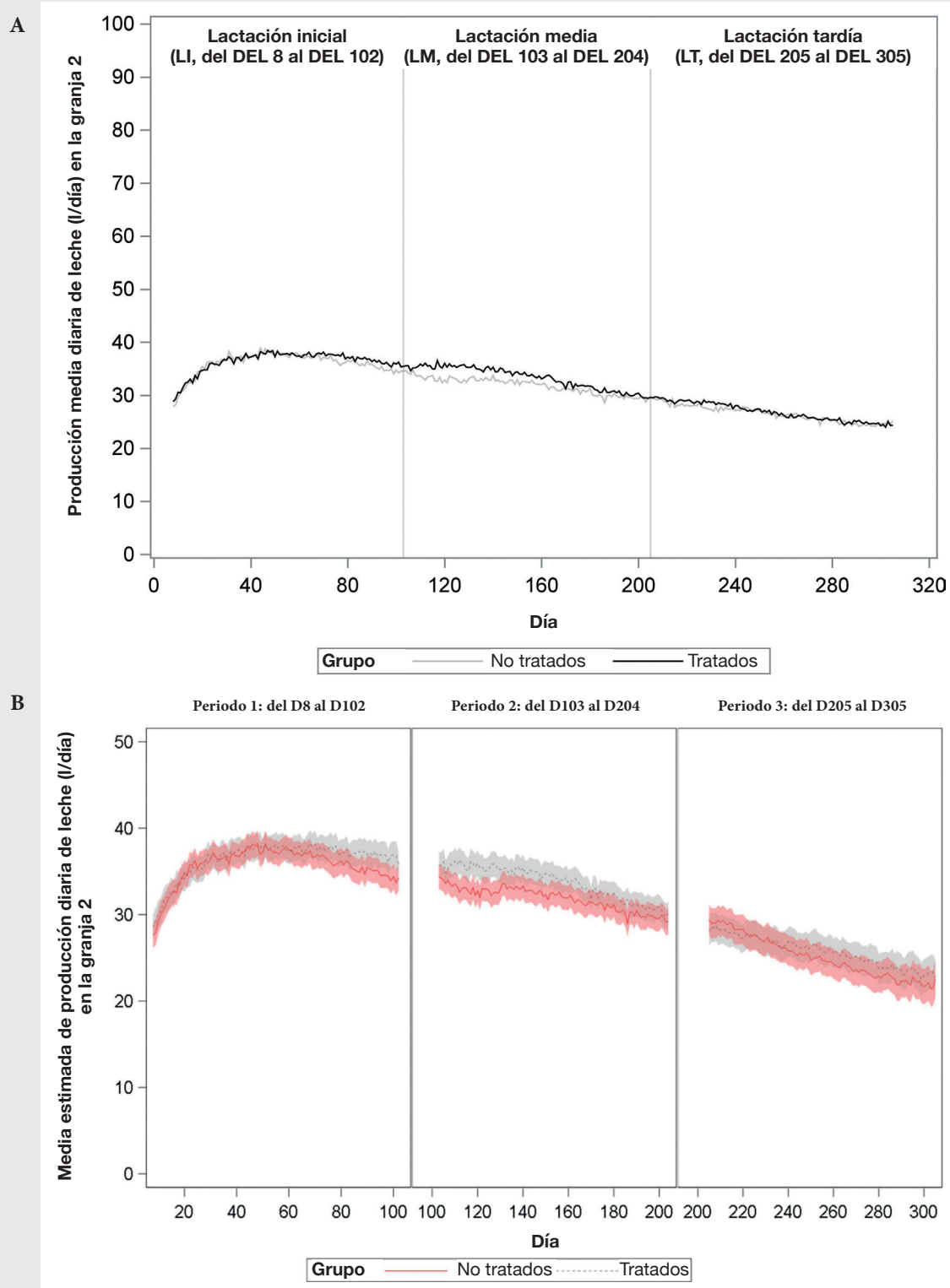
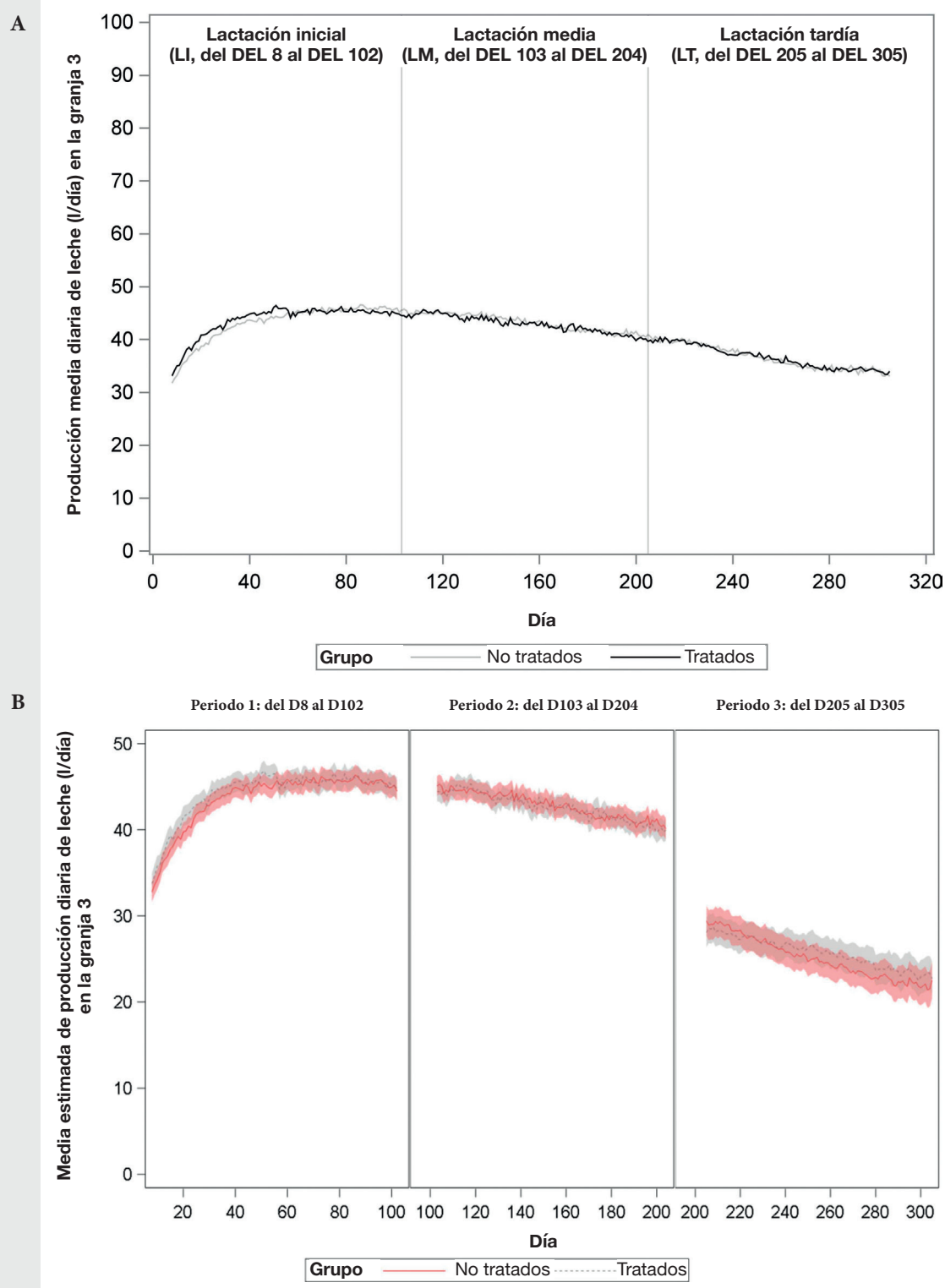


Figura 2.

A. Evolución en el tiempo de la producción media diaria de leche (l/día) en la granja 2 para cada grupo de tratamiento. Los análisis se realizaron por periodo de lactación. Durante el segundo periodo de lactación (lactación media, LM, 103-204 DEL), la producción de leche de los animales vacunados fue significativamente diferente de la producción de leche de los animales no vacunados (+1,8 l/día/vaca). Durante el primer periodo (lactación inicial, LI, 8–102 DEL) y el tercer periodo de lactación (lactación tardía, LT, 205–305 DEL) no se observaron diferencias en la producción de leche.

B. Evolución en el tiempo de la producción media de leche diaria estimada (l/día) en la granja 2 para cada grupo de tratamiento.

**Figura 3.**

A. Evolución en el tiempo de la producción media diaria de leche (l/día) en la granja 3 para cada grupo de tratamiento. Los análisis se realizaron por periodo de lactación. Durante el primer periodo de lactación (lactación inicial, LI, 8-102 DEL) la producción de leche de los animales vacunados fue significativamente diferente de la producción de leche de los animales no vacunados (+0,6 l/día/vaca). Durante el segundo (lactación media, LM, 103–204 DEL) y el tercer periodo de lactación (lactación tardía, LT, 205–305 DEL) no se observaron diferencias en la producción de leche.

B. Evolución en el tiempo de la producción media de leche diaria estimada (l/día) en la granja 3 para cada grupo de tratamiento.

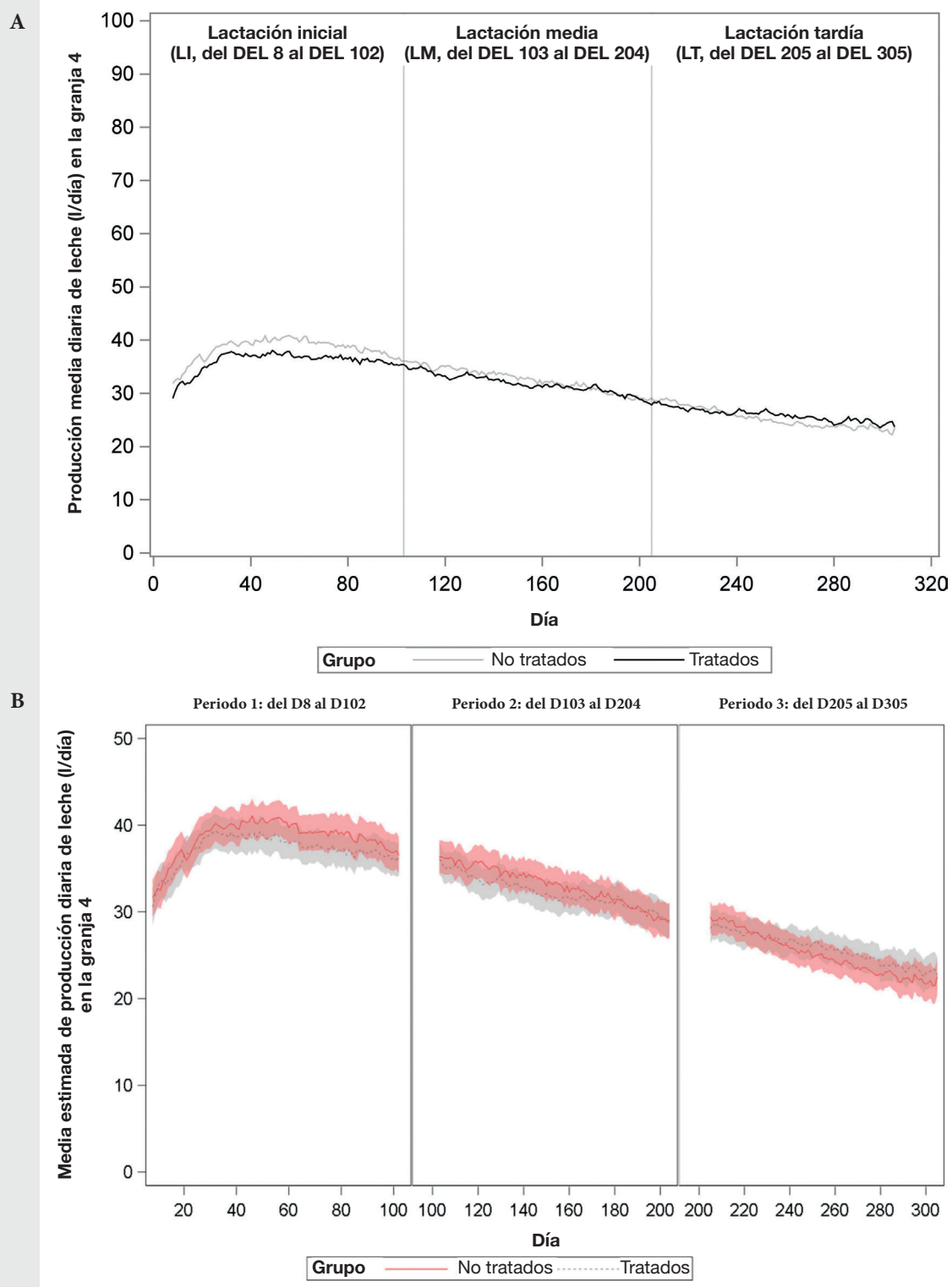


Figura 4.

A. Evolución en el tiempo de la producción media diaria de leche (l/día) en la granja 4 para cada grupo de tratamiento. Los análisis se realizaron por periodo de lactación. Durante el primer periodo de lactación (lactación inicial, LI, 8-102 DEL), el segundo (lactación media, LM, 103-204 DEL) y el tercer periodo de lactación (lactación tardía, LT, 205-305 DEL) no se observaron diferencias en la producción de leche.

B. Evolución en el tiempo de la producción media de leche diaria estimada (l/día) en la granja 4 para cada grupo de tratamiento.

Tabla 3. Distribución de lactaciones aptas para análisis (n = 1559, producidas por 1197 animales) según grupo de tratamiento, rango de lactación y etapa de lactación.

Periodo de lactación	Rango de lactación	Granja 1			Granja 2			Granja 3			Granja 4		
		G1 ^b	G2 ^c	Total	G1 ^b	G2 ^c	Total	G1 ^b	G2 ^c	Total	G1 ^b	G2 ^c	Total
LI ^a	1	56	42	98	46	42	88	83	92	175	31	24	55
	2	35	54	89	37	45	82	48	51	99	14	16	30
	3 y más	93	78	171	34	41	75	73	79	152	27	33	60
	Total	184	174	358	117	128	245	204	222	426	72	73	145
LM ^a	1	61	47	108	51	42	93	65	67	132	29	24	53
	2	36	52	88	30	44	74	56	58	114	14	11	25
	3 y más	78	70	148	34	45	79	71	80	151	28	32	60
	Total	175	169	344	115	131	246	192	205	397	71	67	138
LT ^a	1	52	39	91	46	39	85	53	58	111	31	24	55
	2	36	42	78	29	37	66	55	51	106	18	18	36
	3 y más	63	54	117	29	29	58	62	73	135	27	27	54
	Total	151	135	286	104	105	209	170	182	352	76	69	145

^aLI: lactación inicial. 8 a 102 días en leche (DEL), LM: lactación media. 103 a 204 DEL, LT: lactación tardía. 205 a 305 DEL.

^bGrupo de tratamiento 1: vacunados con 2 ml de Bovela[®] por vía intramuscular.

^cGrupo de tratamiento 2: animales no tratados.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240113.t003>

Análisis del rendimiento reproductivo

Las tasas de aborto y las tasas de intervalo interestral prolongado en las granjas 1 a 4 variaron entre 2,0 y 6,4% y 45,7 y 73,0%, respectivamente. No se encontraron diferencias entre los grupos. *Leptospira hardjo*, *Neospora caninum* y el Herpesvirus bovino-1 fueron los patógenos que con más frecuencia se sospechó que eran las causas de aborto según los informes de laboratorio. En ningún caso se detectó antígeno de BVD en una muestra de aborto.

Discusión

El objetivo de este estudio fue medir el efecto de la vacunación con una nueva vacuna de BVDV monovalente con doble delección génica disponible comercialmente (Bovela[®]) sobre la producción de leche en rebaños lecheros comerciales con evidencia de exposición del rebaño al BVDV. Dado que la producción de leche está influenciada de manera importante por factores relacionados con la granja, como la nutrición, el alojamiento y el manejo, buscamos la colaboración con granjas en las que un gran número de animales vacunados y animales de control (>100 vacas lecheras lactantes) pudieran cohabitar en condiciones de explotación idénticas²⁶. Numerosas granjas en diferentes países europeos se sometieron a selección para detectar la infección por el BVDV, y aunque muchas granjas dieron positivo para el BVDV, fueron muy pocas las aptas o las que optaron por su inclusión. En Europa, la concienciación sobre los riesgos que implica la BVD es alta y la mayoría de los países europeos animan activamente a los ganaderos a participar en las estrategias de control y prevención^{27,28}. Muchas granjas candidatas potenciales ya utilizaban una vacuna de virus vivo contra el BVDV, lo que impidió su inclusión en el estudio. Además, una vez que se confirmó la infección por el BVDV en un rebaño, el investigador visitó al propietario de la granja para explicar el protocolo del estudio. Los objetivos de los investigadores fueron explicar la enfermedad, las opciones de control y finalmente la posibilidad de participar en el estudio. Una parte de los propietarios de granjas optó por la vacunación inmediata del rebaño. Esta decisión fue apoyada por el investigador por razones éticas obvias.

Desafortunadamente, estos factores contribuyeron a evitar que el estudio llegara a más de 3000 animales por grupo, el número objetivo.

Para investigar la eficacia de Bovela® en la prevención de pérdidas de producción de leche en rebaños comerciales con BVDV endémico, la primera necesidad fue establecer la presencia o ausencia de infección por el BVDV durante la duración del estudio. El cribado serológico de vacas en lactación informó de que entre el 75% y el 100% de las muestras dieron positivo en anticuerpos contra el BVDV, lo que indica que los rebaños contenían un animal con infección persistente²⁹. Además, en 3 de las 4 granjas, las muestras positivas de PCR de tanque de leche proporcionaron evidencia de la presencia de al menos un animal con infección persistente existente dentro del grupo de animales en lactación, lo que confirma la presencia continua del BVDV. Una vez que se detectan PI en el grupo de ordeño, muchos animales habrán estado expuestos y habrán desarrollado algún nivel de inmunidad natural. Los resultados del cribado serológico respaldaron esta suposición y sugirieron que los rebaños del estudio habían estado infectados por el BVDV durante un periodo de tiempo considerable. Por lo tanto, es importante considerar el impacto de la inmunidad colectiva en los resultados del estudio. Si bien se requiere una inmunidad de grupo del 100% para controlar el BVDV, indudablemente habrá un impacto en la epidemiología de la BVD por vacunar a la mitad de un rebaño³⁰. La vacunación protege indirectamente a los animales no vacunados al reducir las oportunidades de transmisión de infecciones³¹. Por consiguiente, cabía suponer que el número de animales susceptibles en el grupo no vacunado probablemente habría sido tan bajo que, aparte de este potencial de transmisión reducido, no se observaría ningún efecto sobre la producción de leche de la vacunación contra el BVDV. Curiosamente, en ninguna de las granjas todas las muestras de leche de tanque a granel fueron positivas durante todo el periodo de estudio y no se detectó BVDV en las muestras de PCR de tanque de leche de la granja 1 después de la muestra positiva inicial tomada antes del día 0 del estudio. Un resultado negativo de la PCR del BVDV no necesariamente equivale a la ausencia de infección por el BVDV en el rebaño, sino solamente que el individuo infectado no contribuyó al tanque de leche en ese momento²⁹. Los animales con infección persistente pueden abandonar el grupo de ordeño temporalmente cuando se secan o de forma permanente si se sacrifican; se puede suspender el ordeño a los animales con infección persistente que están enfermos o en tratamiento. También se pueden agregar nuevos animales PI al rebaño de una cohorte de edad nueva o mediante adquisición. Además, no hay información publicada sobre la tasa de detección de infección transitoria por BVDV mediante análisis de PCR de leche de tanque. Los estudios que comparan la diseminación de BVDV de animales individuales, medida mediante muestras individuales de leche o sangre, y la presencia de BVDV en leche de tanque, pueden proporcionar información para mejorar la detección del BVDV en rebaños lecheros. Las pruebas de seguimiento destinadas a erradicar el BVDV de la granja 1, una vez completado el periodo de estudio, confirmaron la presencia de BVDV durante todo el estudio. En esta granja, la prueba ELISA de antígenos de las muestras tomadas de la muesca de la oreja indicó que cuatro de los 212 animales jóvenes analizados dieron positivo en la prueba inicial y tuvieron un positivo repetido o habían muerto tras la repetición de la prueba 3 semanas después. Estos animales nacieron antes del inicio del estudio o durante la fase inicial del estudio.

El estudio fue diseñado para evaluar la eficacia de Bovela® en la protección de los animales lecheros contra el impacto negativo del BVDV en la producción de leche durante los 12 meses posteriores a la vacunación. Con el objetivo de imitar las condiciones de campo, todos los animales (vacas en lactación, vacas secas y novillas) del grupo de tratamiento (G1), fueron vacunados el mismo día (DE 0), independientemente

de su edad o estado reproductivo. No se observó caída en la producción de leche en el periodo inmediatamente posterior a la vacunación en comparación con los animales de control. Se trata de un hallazgo importante si se considera que el grupo de control no recibió ningún placebo, es decir, no se sometió a un procedimiento de inyección.

Las vacas vacunadas con Bovela® produjeron más leche que las vacas no vacunadas en las granjas 1, 2 y 3 durante los primeros 100 días de lactación, y significativamente más durante la lactación inicial en las granjas 1 y 3, así como desde el día 80 hasta el día 200 en la granja 2. No se encontró ninguna mejora en la producción de leche después de la vacunación con Bovela® en la granja 4 (Fig. 4). La granja 4 utilizó un sistema de ordeño automático (robotizado). Los datos basados en la excreción fecal de un metabolito de glucocorticoides sugieren que el ordeño automático es menos estresante que el ordeño convencional³². Puede ser que las vacas expuestas a condiciones de manejo menos estresantes sean más capaces de hacer frente al impacto de la BVD sobre la función inmunológica durante la lactación inicial.

Aunque la reducción de la producción de leche debido al BVDV tanto epidémico como endémico se ha descrito anteriormente, la observación de que los animales vacunados producen más leche que los compañeros del rebaño no vacunados cohabitantes en rebaños con BVDV endémico es nueva^{18,19}. Además, es importante la demostración de una diferencia significativa en la producción de leche entre los animales vacunados y no vacunados a pesar del bajo número esperado de animales susceptibles en el grupo no vacunado y de la imposibilidad de alcanzar el número de inclusión objetivo. Se ha especulado que las pérdidas indirectas de leche en rebaños infectados por el BVDV se deben a una mayor incidencia de la enfermedad como consecuencia de la alteración del sistema inmunológico y al aumento de las tasas de aborto²¹. Sin embargo, las tasas de aborto no fueron diferentes entre los animales vacunados y no vacunados en este estudio, y no se encontraron diferencias en la incidencia de enfermedad, lo cual no fue sorprendente, ya que en ningún caso se sospechó que la infección por BVDV fuera la causa del aborto y todas las muestras dieron negativo para el antígeno del BVDV (datos no mostrados). Cabe destacar que las diferencias en la producción de leche en nuestro estudio se observaron durante la lactación inicial.

Debido al diseño del estudio, la lactación inicial no coincide con el primer periodo posterior a la vacunación. El DE 0, animales de diferentes etapas del ciclo de lactación entraron en el estudio al mismo tiempo: animales lactantes, vacas secas, novillas preñadas y novillas que experimentarían futuras gestaciones. En consecuencia, los datos de producción de leche no se analizaron en relación con el inicio del estudio, sino en relación con el DEL de vacas individuales, de acuerdo con las tres etapas de lactación (LI, LM y LT). Por lo tanto, no es probable que los cambios resultantes en la epidemiología de la infección por el BVDV debidos a la vacunación del 50% del rebaño hayan sido responsables de la diferencia observada en la producción de leche.

La lactación inicial es una fase crítica del ciclo de lactación. Las vacas lecheras modernas experimentan un déficit de energía durante la lactación inicial y este periodo está asociado con una alteración de la función inmunitaria. Recientemente, Contreras *et al.* sugirieron que la remodelación inadecuada del tejido adiposo que acompaña a la transición y la lactación inicial comprometen la función inmunitaria³³. Existe la posibilidad de que la diferencia observada en la producción de leche entre los animales vacunados y no vacunados que cohabitan en el mismo rebaño se deba al efecto directo del BVDV sobre la absorción y utilización de energía en el grupo no vacunado. La infección por el BVDV causa inmunodepresión; la estimulación de la función inmunitaria y la producción de anticuerpos consumen mucha energía. Los autores

creen que el aumento de la producción de leche en las vacas vacunadas con Bovela® puede deberse a la prevención de los efectos inmunodepresores del BVDV, es decir:

- > El estrés adicional en el sistema inmunológico causado por el BVDV, sumado a la función inmunológica ya deteriorada durante la lactación inicial, compite con los recursos corporales que se utilizarían de otro modo para la producción de leche.
- > Las infecciones secundarias encontradas durante ese periodo tienen un impacto negativo en la ingesta y producción de alimento.

Los datos de este estudio demuestran que, incluso en condiciones de infección endémica por el BVDV, en tres de cada cuatro rebaños comerciales con animales vacunados con Bovela® y no vacunados que cohabitan, las vacas vacunadas tuvieron una producción superior a la de las vacas no vacunadas de 0,61 a 1,8 l/día durante la lactación inicial. Estos resultados, para periodos de 94 a 101 días respectivamente (LI, 8-102 DEL y LM 103-204 DEL), dan una cantidad compuesta de ganancia en leche producida de 57,43 l a 181,69 l. Es difícil cuantificar con precisión la ganancia económica asociada a este aumento de producción debido a la variación del precio de la leche en diferentes países, pero si tomamos en consideración el precio promedio de la leche en el Espacio Económico Europeo (EEE) durante el primer trimestre de 2020, la ganancia económica oscilaría entre 20 y 63 € por vaca y por lactación³⁴. Dado que el estudio se realizó con una sola vacuna, se desconoce cómo funcionarían otras vacunas vivas en las condiciones del estudio.

Los hallazgos de este estudio son consideraciones adicionales para los análisis de rentabilidad de los programas de control del BVDV. Además, las observaciones proporcionan una motivación adicional para que los ganaderos se adhieran a los programas de control del BVDV, especialmente cuando este hallazgo se combina con la observación de que en ninguno de los rebaños se encontraron diferencias en los parámetros reproductivos importantes y la incidencia de enfermedades, es decir, que los datos de la granja no demostraron los problemas que generalmente implica la infección por BVDV. Por lo tanto, la infección por BVDV puede afectar negativamente a la producción de leche sin afectar al rendimiento reproductivo de un rebaño; las pérdidas de producción de leche pueden estar ocultas.

En resumen, las vacas de rebaños endémicamente infectados por BVDV y vacunadas con Bovela® producen más leche que las vacas no vacunadas de los mismos rebaños. La diferencia en la producción de leche ocurre durante la lactación inicial.

Información complementaria

Conjunto de datos S1. Conjunto completo de datos de la granja 1 auditado.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240113.s001> (XLSX)

Conjunto de datos S2. Conjunto completo de datos de la granja 2 auditado.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240113.s002> (XLSX)

Conjunto de datos S3. Conjunto completo de datos de la granja 3 auditado.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240113.s003> (XLSX)

Conjunto de datos S4. Conjunto completo de datos de la granja 4 auditado.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240113.s004> (XLSX)

Archivo S1.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240113.s005> (DOCX)

Archivo S2. Valores finales de BVD del EC de la prueba PCR de la leche del tanque a granel.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240113.s006> (XLSX)

Agradecimientos

Damos las gracias al monitor del estudio, Francis Pothier, a Phatophy y especialmente a los investigadores (Mike Blake, Mark Stott, Massimo Baiguera, Arnaud Delambre, Arturo Ruggeri y Javier Heras Sánchez) y a los ganaderos, sin los cuales este ensayo de campo no habría sido posible.

Referencias bibliográficas

1. Becher P, Thiel HJ Springer Index of Viruses. 2nd ed. Springer Verlag, Heidelberg, Germany; 2011.
2. Olafson P, Rickard CG. Further observations on the virus diarrhea (new transmissible disease) of cattle. *Cornell Vet.* 1947;37: 104–6. pmid:20243965
3. Moennig V, Houe H, Lindberg A. BVD control in Europe: current status and perspectives. *Anim Health Res Rev.* 2005;6: 63–74. pmid:16164009
4. Meyling A, Houe H, Jensen AM. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev Sci Tech.* 1990;9: 75–93. pmid:2132155
5. Brownlie J. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. *Vet Micro.* 1990;23: 371–382.
6. Howard CJ. Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev Sci Tech.* 1990;9: 95–103. pmid:1966728
7. Grahn TC, Fahning ML, Zemjanis R. Nature of early reproductive failure caused by bovine viral diarrhea virus. *J Am Vet Med Assoc.* 1984;185: 429–32. pmid:6088456
8. McGowan MR, Kirkland PD, Richards SG, Littlejohns IR. Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Vet. Rec.* 1993;133: 39–43. pmid:8212473
9. Khodakaram-Tafti A, Farjanikish GH. Persistent bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle herds. *Iran J Vet Res.* 2017;18: 154–163. pmid:29163643
10. Lindberg A, Houe H. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev Vet Med.* 2005;1: 55–73.
11. Oguejiofor CF, Thomas C, Cheng Z, Wathes DC. Mechanisms linking bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection with infertility on cattle. *Anim Health Res Rev.* 2019;20: 72–85. pmid:31895016
12. Fulton RW, Purdy CW, Confer AW, Saliki JT, Loan RW, Briggs RE, et al. Bovine viral diarrhea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res.* 2000;64: 151–159. pmid:10935880
13. Chase CCL, Thakur N, Darweesh MF, Morarie-Kane SE, Rajput MK. Immune response to bovine viral diarrhea virus-looking at newly defined targets. *Anim Health Res Rev.* 2015;16: 4–14. pmid:26050567
14. Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 1999;64: 89–107. pmid:10028165
15. Yarnall MJ, Thrusfield MV. Engaging veterinarians and farmers in eradicating bovine viral diarrhoea: a systemic review of economic impact. *Vet Rec.* 2017;181: 347–355 pmid:28851755
16. Chi J, Van Leeuwen JA, Weersink A, Keefe GP. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies, and *Neospora caninum*. *Prev Vet Med.* 2002;55: 137–153. pmid:12350317
17. Fourichon C, Beaudeau F, Bareille N, Seegers H. Quantification of economic losses consecutive to infection of a dairy herd with bovine viral diarrhoea virus. *Prev Vet Med.* 2005;72: 177–181. pmid:16162364

18. Barber DM, Nettleton PF, Herring JA. Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec.* 1985;117: 459–464. pmid:3000058
19. Larsson B, Niskanen R, Alenius S. Natural infection with bovine virus diarrhoea virus in a dairy herd: A spectrum of symptoms including early reproductive failure and retained placenta. *Anim Reprod Sci.* 1994;36: 37–48.
20. Moerman A, Straver PJ, de Jong MC, Quak J, Baanvinger T, van Oirschot JT. Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: a longitudinal study. *Vet Q.* 1994;16: 115–119. pmid:7985352
21. Heuer C, Healy A, Zerbin C. Economic effects of exposure to bovine viral diarrhoea virus on dairy herds in New Zealand. *J Dairy Sci.* 2007;90: 5428–5438. pmid:18024733
22. Fray MD, Mann GE, Clarke MC, Charleston B. Bovine viral diarrhoea virus: its effects on ovarian function in the cow. *Vet Microbiol.* 2007;77: 185–194.
23. Ridpath JF. Immunology of BVDV vaccines. *Biol.* 2013;41: 14–19.
24. Sprecher DJ, Hostetler DE, Kaneene JB. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology* 1997;47: 1179–1187. pmid:16728067
25. Kummerfeld HL, Oltenacu EA, Foote RH. Embryonic mortality in dairy cows estimated by nonreturns to service, estrus, and cyclic milk progesterone patterns. *J Dairy Sci.* 1978;61: 1773–1777. pmid:744811
26. McLaren CJ, Lissemore KD, Duffield TF, Leslie KE, Kelton DF, Grexton B. The association of herd milk production and management with a return-over-feed index in Ontario dairy herds. *J Dairy Sci.* 2005;88: 419–425. pmid:15591408
27. Givens MD, Newcomer BW. Perspective on BVDV control programs. *Anim Health Res Rev.* 2015;16: 78–82. pmid:26050576
28. Metcalfe L. An update on the status of BVD control and eradication in Europe. *J Veter Sci Med.* 2019;7: 1–4.
29. Lanyon SR, Hill FI, Reichel MP, Brownlie J. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *The Vet J.* 2014;199: 201–209. pmid:24053990
30. Moennig V, Becher P. Control of Bovine Viral Diarrhea. *Pathogens.* 2018;7: 29.
31. Woolhouse MEJ, Haydon DT, Bundy DAP. The design of veterinary vaccination programmes. *The Vet J.* 1997;153: 41–47. pmid:9125355
32. Jurkovich V, Kézér FL, Ruff F, Bakony M, Kulcsár M, Kovács L. Heart rate, heart rate variability, faecal glucocorticoid metabolites and avoidance response of dairy cows before and after changeover to an automatic milking system. *Acta Vet Hung.* 2017;65: 301–313. pmid:28605960
33. Contreras GA, Strieder-Barboza C, Raphael W. AdPiose tissue lysis and remodeling during the transition period of dairy cows. *J Animal Sci Biotechnol.* 2017;8: 41.
34. Reglamento (UE) n.º 2017/1185, Artículo 12 (a) - Anexo II.4 (a) (precios de la leche cruda con contenido real de grasas y proteínas pagados a los productores de leche) Datos completos hasta abril de 2020

