UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Fundada en 1551
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
E.A.P DE MEDICINA VETERINARIA

Seroprevalencia del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina en bovinos criollos de crianza extensiva de la provincia de Parinacochas, Ayacucho

TESIS para optar el Título Profesional de: MÉDICO VETERINARIO

AUTOR:
ERIK ALBERTO ZACARÍAS RÍOS

LIMA-PERÚ 2002

DEDICATORIAS:

A Dios por haberme dado la dicha
de haber nacido en esta hermosa tierra.

A mis padres: Ricardo y Margarita,

por su AMOR y su APOYO INCONDICIONAL

a lo largo de estos años, los cuales

han permitido el desarrollo

de mi vida profesional.

A mis hermanos: Karina, Sheila y Marcos,

Gracias por todo lo que hemos compartido.

AGRADECIMIENTOS:

A la Facultad de Medicina Veterinaria
de la UNMSM: lugar de grandes
enseñanzas y maestros ilustres.

A mi Directora de Tesis:
Dra. Hermelinda Rivera,
por su paciencia y dedicación
en la realización de la presente
tesis. MUCHAS GRACIAS.

A los Señores Asesores, al Presidente
y Miembros del Jurado Calificador,
por sus aportes en la realización
de esta tesis.

Al Dr. Alfredo Benito, por sus
enseñanzas y su amistad durante
mi estadía en el Laboratorio de Virología

A mis amigos de la PROMOCION 95
por su amistad y el apoyo constante
en nuestra vida universitaria.

Mi sincero agradecimiento a Alexei
por su colaboración en la presente tesis.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen …… …… vii

Abstract ……..…... viii

Lista de cuadros …… ix

Lista de figuras …… x

I. INTRODUCCIÓN …… 1

II. REVISIÓN DE LITERATURA …….. 3

A. La rinotraqueitis infecciosa bovina ……... 3

1. Genotipos del VHB-1 …….. 4

2. Replicación viral …….. 4

B. Patogénesis …….. 4

1. Entrada y diseminación …….. 5

a. Infección restringida a áreas locales ……... 5

b. Difusión sistémica por viremia ……... 5

c. Difusión neuronal …… 6

C. Latencia …….. 6

D. Cuadro clínico …….. 6

1. Enfermedad respiratoria – aborto ……... 6

2. Enfermedad genital ……... 7

3. Enfermedad nerviosa …… 8

E. Aspectos inmunológicos ……... 8

F. Diagnóstico …….. 10

1. Aislamiento viral …….. 10

2. Detección de antígeno viral ……... 10

3. Detección de ácido nucleico viral …… 10

4. Detección de anticuerpos …… 11

a. Neutralización viral …… 11

b. Prueba de Inmunoabsorción Ligada a Enzima (ELISA) …… 11

G. Control y Erradicación …… 12

1. Manejo sanitario …… 12

2. Vacunación …… 12

a. Vacunas convencionales vivas y muertas 12
b. Vacunas marcadas vivas y muertas 13
III. MATERIALES Y MÉTODOS 14
A. Lugar de estudio 14
B. Material 14
1. Animales y muestras 14
2. Equipos y materiales 15
3. Reactivos 15
4. Cultivos celulares 15
5. Cepa del VHB-1 15
C. Métodos 16
1. Tamaño muestral 16
2. Detección de anticuerpos neutralizantes contra VHB-1 16
3. Análisis de datos 17
a. Prevalencia 17
IV. RESULTADOS 19
V. DISCUSIÓN 23
VI. CONCLUSIONES 26
VII. LITERATURA CITADA 27
Anexo 1 31

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue conocer la prevalencia del Virus Herpes Bovino 1 (VHB-1), agente causal de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB) en bovinos criollos de crianza extensiva de los distritos de Coracora, Chumpi, Puyusca y Pullo de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. Con esta finalidad se consideraron 469 muestras de sueros bovinos procedentes de 25 hatos para la detección de anticuerpos neutralizantes mediante la prueba de neutralización viral. El 67.59 ± 4.24% (317/469) de las muestras presentaron anticuerpos neutralizantes con títulos entre 1:2 a > a 1:256. El 100% de los hatos muestreados tuvieron animales seroreactores. La prevalencia del virus fue similar en los animales de los 4 distritos estudiados. Este estudio reporta la presencia del VHB-1 en bovinos criollos de la provincia de Parinacochas, con una prevalencia superior a lo descrito en bovinos de las principales cuencas lecheras del país.

Palabras claves: Bovinos, Infecciones herpesvirales, Virus herpes bovino tipo 1 (VHB-1), Rinotraqueitis infecciosa bovina, anticuerpos neutralizantes.

ABSTRACT

The seroprevalence of Bovine Herpes Virus-1, the causative agent of Infectious Bovine Rinotracheitis (IBR), in criollo bovines from districts of Coracora, Chumpi, Puyusca and Pullo of the Parinacochas Province, Ayacucho was carried out. Four hundred sixty nine serum samples from twenty five herds were tested by virus neutralisation test to detect neutralizing antibodies. The 67.59± 4.24% (317/469) of the samples had antibodies against BHV-1. The seroprevalence of the virus was similar in the animals from the 4 district studied. The antibodies titers ranged from 1:2 to > 1:256. All the sampled herds had seroreactive animals. This study report the presence of the BHV-1 in criollos bovines from Parinacochas Province, with a prevalence superior to described in dairy herds of the country.

Key words: Cattle, Herpesviridae Infections, Bovine herpes virus-1 (BHV-1), Infectious Bovine Rinotracheitis (IBR), neutralizing antibodies

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Seroprevalencia del VHB-1 en bovinos de 4 distritos de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. 2000. 19

Cuadro 2 . Seroprevalencia del VHB-1 en el distrito de Coracora de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. 2000. 20

Cuadro 3. Seroprevalencia del VHB-1 en el Distrito de Chumpi de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. 2000. 20

Cuadro 4. Seroprevalencia del VHB-1 en el Distrito de Puyusca de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. 2000. 21

Cuadro 5. Seroprevalencia del VHB-1 en el Distrito de Pullo de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. 2000. 21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de los títulos de anticuerpos neutralizantes contra el VHB-1, en bovinos de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. 2000. ….. 22

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú existen aproximadamente 4.5 millones de cabezas de ganado bovino, siendo tan solo el 14% (640 miles) ganado de raza y el 86% (3.8 millones) ganado criollo, el cual se encuentra distribuido mayormente en la sierra, en manos de pequeños y medianos criadores, con una crianza de tipo mixto y en forma extensiva, y en menor grado en forma semi-intensiva (INEI, 1995). A pesar de que el ganado criollo constituye la mayor población bovina explotada en todo el país, se tiene escasa información acerca de los factores que limitan su desarrollo, como lo son los problemas sanitarios, en el cual están involucrados las enfermedades infecciosas virales como la rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB), enfermedad asociada a problemas respiratorios y reproductivos.

La RIB, es una enfermedad causada por el Virus Herpes Bovino 1 (VHB-1), el cual se encuentra ampliamente distribuido en el mundo y es uno de agentes más importantes que afectan el tracto respiratorio y reproductivo del ganado bovino y es considerado uno de los principales componentes del complejo respiratorio bovino presente en centros de engorde y en terneros de establos lecheros (Rivera *et al*., 1993; 1994).

Estudios epidemiológicos y económicos realizados en bovinos de engorde en Estados Unidos y Canadá, indican que la enfermedad respiratoria bovina es causa de 75% de morbilidad y 65% de mortalidad, ocasionando grandes pérdidas económicas a los ganaderos (Zanabria, *et al*., 2000).

El VHB-1 también es conocido por sus efectos abortogénicos, donde las vacas abortan debido a una secuela del problema respiratorio, aunque también por efecto directo del virus, sobre todo en el ganado de carne en donde puede producir brotes hasta de 25% de abortos (Richey, 1994).

Estudios realizados en el valle de Lima demuestran que la infección por VHB-1 esta difundida en bovinos adultos (Rivera *et al*., 1993) y terneros de hatos lecheros con problemas respiratorios (Rivera *et al*., 1994). Rosadio *et al*. (1993), documentan la presencia de anticuerpos contra el VHB-1 en bovinos lecheros, camélidos sudamericanos, ovejas y cabras de comunidades rurales de algunas áreas del Perú.

A pesar de que el VHB-1, causante de la RIB, ha sido detectado en la población bovina y otras especies del país, no existen datos de su prevalencia en animales criollos, que pudieran servir de base para estudios tendientes a elucidar su responsabilidad en la presentación de problemas respiratorios que son frecuentes en el ganado criollo. Por lo que, el objetivo del presente estudio fue determinar la seroprevalencia del VHB-1 en bovinos criollos de crianza extensiva de la provincia de Parinacochas, contribuyendo a un mejor conocimiento de la epidemiología de la RIB en el país.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. LA RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA

La Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB) es causada por el Virus Herpes Bovino - 1 (VHB–1), el cual es un miembro de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvirinae*, género *Varicellovirus* (Babiuk *et al*., 1996).

El VHB – 1 tiene un diámetro de 150 a 200 nm, su material genético está conformado por una doble cadena lineal de ADN dentro de una nucleocápside icosaédrica compleja. El ADN viral codifica más de 69 diferentes proteínas, entre estructurales y no estructurales. Entre las proteínas estructurales por lo menos 9 son glicoproteínas presentes en la envoltura viral formando proyecciones y juegan un rol importante en las interacciones virus – célula, como adherencia, penetración, difusión célula – célula y salida. Las glicoproteínas además interactuan con el sistema inmune, como unión a componentes del complemento o inmunoglobulinas. Las glicoproteínas gB, gD y probablemente gH, gK y gL son esenciales en el proceso de replicación viral. Las glicoproteínas gC, gG, gI, y gE no son esenciales para la replicación viral, pero juegan un rol esencial en las interacciones virus – célula. (Kaashoek, 1995).

Babiuk *et al*., (1996) y Engels *et al*., (1996) mencionan que la gD induce anticuerpos neutralizantes, pero también es responsable de la penetración, adsorción viral y la fusión celular. Además mencionan que la gC participa en la unión inicial del virus a receptores similares a la heparina sobre la superficie de

las células permisivas y que la gB interferiría con proteínas celulares ocasionando los efectos citopáticos.

1. GENOTIPOS DEL VHB-1

Mediante el uso de electroforesis en geles de poliacrilamida, uso de paneles de anticuerpos monoclonales y el análisis de restricción de ADN viral, se ha clasificado el VHB-1 en tres genotipos: VHB-1.1, VHB-1.2 y VHB-1.3, los cuales se asocian con la RIB, Vulvovaginitis pustular infecciosa/Balanopostitis pustular infecciosa (VPI/BPI) y enfermedad neurológica (encefalitis) respectivamente. Este ultimo genotipo (VHB 1.3), ha sido reclasificado denominándose Virus herpes bovino tipo 5 (VHB-5), en base a estudios bioquímicos y genéticos. (Wentink, *et al*., 1993).

2. REPLICACIÓN VIRAL

La replicación del VHB-1, como en todos los virus herpes, es muy compleja. El VHB-1 se replica en células epiteliales del tracto respiratorio y reproductivo. El VHB-1 se adhiere a los receptores celulares, por medio de las glicoproteínas, la nucleocápside penetra en el citoplasma mediante la fusión de la envoltura con la membrana celular o a través de vacuolas fagocíticas. En ese momento, se libera de la nucleocápside un complejo ADN-proteína que pasa al núcleo. Aquí se realiza la transcripción en cascada de ARN mensajeros para la síntesis proteica y replicación del ADN vírico de la progenie viral (Fenner, 1995; Engels *et al*.,1996).

B. PATOGENESIS

El VHB-1 se transmite en forma directa por aerosoles o por contacto con animales infectados, a partir de secreciones respiratorias, oculares y del tracto reproductivo, o en forma indirecta a través de personas o equipos. El virus también puede ser transmitido por el semen durante la monta natural o

inseminación artificial (van Oirschot, 1995) e incluso durante la transferencia de embriones (Wentik *et al*., 1993; Engels *et al*., 1996; Pidone *et al*., 1999). Una vez en el organismo el virus se replica en células epiteliales en el sitio de entrada para luego diseminarse por vía sanguínea o vía nerviosa o por difusión entre célula a célula (Pidone *et al*., 1999).

1. Entrada y diseminación

Las entradas potenciales para el ingreso del VHB-1 son la cavidad nasal, la orofaringe, ojos y tracto genital. Usualmente una primera replicación ocurre en las células epiteliales de la puerta de entrada y al menos tres formas de difusión del virus deben ser consideradas:

a. Infección restringida a áreas locales

Pueden ocurrir infecciones del tracto respiratorio superior o del tracto genital. Los síntomas de la enfermedad pueden ser principalmente atribuidos a la destrucción de las células epiteliales debido a la replicación viral con producción y excreción de altos títulos virales. Debido a que la respuesta inmune es eficiente, estas infecciones son usualmente autolimitantes y la recuperación del animal es dentro de 1 a 2 semanas. Las lesiones locales pueden facilitar las infecciones bacterianas secundarias, las cuales luego pueden causar severo daño (Engels *et al*., 1996).

b. Difusión sistémica por viremia

El VHB-1 puede infectar monocitos con moderada replicación viral y también puede infectar macrófagos y linfocitos los cuales pueden servirle de vehículo a diferentes tejidos del animal (Engels *et al*., 1996).

c. Difusión neuronal

Durante la replicación inicial en las células epiteliales, el virus puede ingresar por los axones celulares de las terminaciones nerviosas. Luego, vía axonal, pueden alcanzar los cuerpos neuronales del ganglio trigémino donde el virus se establece en latencia (Engels *et al*., 1996).

C. LATENCIA

Como otros miembros de la subfamilia de los alfaherpesvirinae, el VHB-1 establece infección latente en neuronas de ganglios sensorios, primariamente en el ganglio trigémino, tonsilas y ganglio sacro en caso de infecciones en los genitales. El ADN viral puede persistir en estado latente de por vida en un hospedero infectado, pero puede reactivarse periódicamente y diseminarse a animales susceptibles (Winkler *et al*., $2000_{a,b}$; Jones, 1999; Jones *et al*., 2000).

La reactivación del virus puede ocurrir o ser inducida por numerosos factores estresantes, como: transporte (Thiry, *et al*., 1987), tratamientos con corticoides (Kaashoek, *et al*., 1994, 1998; Mars, *et al*., $2000_{a,b}$), tratamiento con ciclofosfamida (Jones, 1999), superinfección con otros virus o microorganismos, irradiación ultravioleta, etc (Pidone et al 1999).

D. CUADRO CLÍNICO

1. Enfermedad respiratoria - Aborto

El periodo de incubación de la RIB es de 5 a 10 días, seguido por fiebre (40.5 a 42°C), descarga nasal serosa, conjuntivitis, salivación, tos, inapetencia, depresión y baja en la producción lechera de animales en producción y en pocos días la descarga nasal y ocular cambia a mucopurulenta. Las lesiones necróticas en la nariz pueden progresar a pústulas y úlceras cubiertas por una seudomembrana que obstruye las vías aéreas superiores, lo que conduce a una respiración bucal. (OIE, 2000; Chase *et al*., 1995).

Los animales se recuperan 5 a 10 días después del inicio de los síntomas. Sin embargo, el efecto inmunosupresor de VHB-1 sobre los mecanismos de defensa antibacteriales de los pulmones resultan en complicaciones debido a las infecciones bacterianas secundarias. La más común y severa complicación es el complejo respiratorio bovino, en la que otros agentes como la Parainfluenza 3, Virus respiratorio sincitial, Virus de la diarrea viral bovina, *Pasteurella haemolytica* o *multocida* usualmente están presentes en forma concomitante (Richey, 1994; Chase *et al*., 1995). El daño epitelial por los agentes virales y el exudado tisular producto de la severa inflamación pulmonar son los que favorecen la adherencia y crecimiento de microcolonias bacteriales. Las microcolonias establecidas resisten a la fagocitosis y efectos de anticuerpos y antibióticos, permitiendo el rápido descenso al tracto respiratorio inferior (Zanabria *et al*., 2000).

Una frecuente complicación de la forma respiratoria es el aborto que puede ocurrir entre la 3ra y 6ta semana posterior a la infección principalmente en vacas de 5 a 8 meses pudiendo abortar hasta un 25% de las vacas preñadas (Richey, 1994; Chase *et al*., 1995).

2. Enfermedad genital

La VPI/BPI ocurren 1 a 3 días después de la monta y resulta en una severa reacción inflamatoria de la mucosa genital, que incluye edema, hiperemia, pequeñas pústulas y descarga mucopurulenta, la enfermedad frecuentemente resulta en infecciones bacterianas secundarias. La fase aguda de la enfermedad dura de 2 a 4 días y la recuperación es de 10 a 14 días posteriores al inicio de los signos (Chase *et al*., 1995).

3. Enfermedad nerviosa

La meningoencefalitis ocurre como resultado de una infección por VHB-1 en animales jóvenes y ha sido reportada mundialmente. Los signos de esta enfermedad neurológica son incoordinación, temblor muscular, recumbencia,

ataxia y ceguera que invariablemente conduce a muerte. Este neurogénico VHB-1 esta genéticamente y antigénicamente relacionado a VHB-1. Sin embargo, debido a diferencias genéticas y clínicas, se le ha denominado Virus herpes bovino 5 (Chase *et al*., 1995).

E. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS

La cinética de la replicación del VHB-1 es muy rápida después de la adherencia y entrada a la célula. La expresión del antígeno sobre la superficie celular ocurre 3 a 4 horas post infección (p.i.), el ensamblaje viral 6 a 7 horas p.i., y la salida de la progenie media o una hora post ensamblaje (Babiuk *et al*., 1996).

Una vez establecida la infección primaria, las primeras respuestas son del tipo no específico, como la aparición de citokinas producidas por los macrófagos y el interferón α/β, que es inducido rápidamente, alcanzando niveles altos en la secreción nasal y sangre 36 a 72 horas p.i. y permanece elevado hasta el cese de la replicación (Babiuk *et al*., 1996).

El interferón, más otros cambios celulares, inducirían la modificación del tráfico de leucocitos y reclutamiento de varias células efectoras como macrófagos, polimorfonucleares (PMN) y células asesinas naturales al sitio de infección. Estas células inducen una onda de tempranas citokinas las cuales son instrumento para el inicio de la respuesta inflamatoria. Dentro de 24 a 48 horas p.i. la infiltración masiva de PMN en los pulmones ocurre como resultado de la generación de citokinas pro inflamatorias por el macrófago alveolar y células epiteliales con incremento de la permeabilidad vascular y adhesión, las células migran al sitio de infección y liberan especies de oxígeno reactivo, metabolitos del ácido araquidónico y enzimas y estas equilibran la eliminación del virus y células infectadas en concertación con otras defensas específicas e inespecíficas (Babiuk *et al*., 1996).

El interferón α influye en el trafico de linfocitos con selectivo agotamiento de células CD8+ de la sangre y el flujo de estas células a los pulmones donde ellas puedan estar involucradas en la producción de citokinas tardías, las cuales desencadenan que los macrófagos eliminen a las células infectadas con VHB-1 y en la citotoxicidad de células infectadas por parte de células CD8+ (Babiuk *et al*., 1996).

Se postula que el microambiente local durante el contacto inicial del antígeno del VHB-1 con citokinas producidas por células no especificas inflamatorias responde a la balanceada o primaria respuesta de Th 1 o Th 2. La observación que el CMH tipo II expresa antígenos del VHB-1, sobre los macrófagos pulmonares, se incrementa durante la infección viral. Una vez activado el macrófago produce otras citokinas las cuales actúan como desencadenantes de la respuesta de células T e indirectamente de la respuesta de células B. Sin embargo, es claro que, una vez desencadenado, el Th 1 responde produciendo un repertorio de citokinas tardías (IL-2, IL-12, interferón γ) las cuales conducen una respuesta inmune mediada por células (Babiuk *et al*., 1996).

La respuesta de anticuerpos a VHB-1 se considera más importante en prevenir una infección que en la recuperación, debido a que los anticuerpos no previenen la difusión célula – célula (el virus se disemina por puentes intercelulares aun en presencia de anticuerpos) y la respuesta de anticuerpos es detectable cuando la recuperación de la infección ya esta en curso. Los anticuerpos son críticos en neutralizar el virus extracelular previniendo la difusión de la infección. Es así que en animales con altos niveles de anticuerpos en pasajes nasales, aunque el virus este reactivado, los anticuerpos neutralizan al virus y previenen la diseminación a otros animales (Babiuk *et al*., 1996).

F. DIAGNOSTICO

Se puede sospechar de RIB en base a los signos clínicos, patológicos y epidemiológicos, pero para realizar un diagnostico definitivo se requiere de las pruebas de laboratorio, entre las principales:

1. Aislamiento viral:

Esta prueba se realiza en cultivos celulares inoculados con muestras de exudados nasales, oculares, genitales, ó suspensiones de membranas mucosas del tracto respiratorio, tonsilas, pulmón, nódulos linfáticos bronquiales. El aislamiento viral es muy sensible y especifico pero demora varios días o semanas. La identificación del agente es mediante pruebas inmunohistoquímicas como son inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa empleando anticuerpos monoclonales o policlonales (OIE, 2000; Rivera, 1993).

2. Detección de antígeno viral:

La técnica es rápida y puede estar disponible en muchos laboratorios. Esta técnica consiste en la detección del antígeno viral en tejidos frescos, muestras de fluidos nasales, oculares ó genitales a través del uso de anticuerpos policlonales o monoclonales, mediante la técnica de inmunofluorescencia (IF), ó inmunoperóxidasa (IP) (OIE, 2000).

3. Detección de ácido nucleico viral:

Consiste en la demostración del ADN del VHB-1 en muestras clínicas, estos incluyen hibridación de ADN y la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) (OIE, 2000).

4. Detección de anticuerpos:

La detección de anticuerpos es otra de las formas diagnósticas más empleadas. Las de mayor uso son la neutralización viral y ELISA.

a. Neutralización Viral:

Esta es una prueba altamente específica pero menos sensible en comparación a ELISA. Se basa en la capacidad que tiene el anticuerpo para neutralizar la citopatogenicidad ó la capacidad del virus de infectar a las células *in vitro* (OIE, 2000). La desventaja de la prueba es que requiere de un laboratorio que posea el sistema de cultivos celulares, de personal entrenado, es muy costosa y laboriosa. Esta prueba esta prescrita con propósitos para el comercio internacional y es utilizada como técnica de referencia en los programas de erradicación para confirmar los sueros dudosos. Como título neutralizante de suero se define la recíproca dilución de suero, expresado en Log 10, que protege una monocapa celular como consecuencia de la neutralización de por lo menos 100 DI_{50} de virus (Rivera, 1993).

b. Prueba de Inmunoabsorcion Ligada a Enzima (ELISA):

El fundamento de la prueba de ELISA indirecta es la determinación de anticuerpos contra el virus en el suero, leche u otro fluido mediante el uso de una anti-inmunoglobulina G dirigida contra la Ig G bovina marcada con una enzima como la peroxidasa que se une al complejo antígeno-anticuerpo. Recientemente, gE-ELISA están siendo usados en asociación a vacunas marcadas para detectar animales infectados en poblaciones vacunadas, en países donde la RIB esta en proceso de erradicación (Wellenberg, *et al*., $1998_{a,b}$; Van Oirschot, *et al*., 1999; Mars, *et al*., 2000_{b}).

G. CONTROL Y ERRADICACIÓN

Una de las principales características del VHB-1, que debe tenerse en cuenta para su control es su capacidad de persitir en el animal de por vida, ya que el VHB-1 permanece integrado por un periodo indefinido en células preferenciales. Es necesario definir la decisión de controlar la enfermedad clínica o eliminar la infección (Pidone, *et al*., 1999).

1. Manejo sanitario

Un buen manejo sanitario debería evitar el ingreso del virus en el hato, entre las medidas de control se recomienda supervisar el movimiento de ganado evitando el ingreso de nuevos animales sin conocer su estado sanitario, realizar cuarentena y análisis serológicos anuales para evaluar el estado de la enfermedad en el hato con eliminación de animales seropositivos (Pidone, *et al*., 1999).

2. Vacunación

a. Vacunas convencionales vivas y muertas

Estas vacunas usualmente previenen los signos clínicos desarrollados después de una infección con VHB-1. Aunque la mayoría de estas vacunas convencionales reduce la cantidad de virus eliminado después de la infección, su uso no ha resultado para restringir la difusión de la enfermedad en hatos o regiones. Una desventaja de estas vacunas convencionales es su interferencia con los diagnósticos serológicos de rutina y estudios seroepidemiológicos (van Oirschot *et al*., 1996).

b. Vacunas marcadas vivas y muertas

Estas vacunas recientemente desarrolladas permiten no solo prevenir los signos clínicos después de una infección, además previenen la replicación y posterior excreción del virus y pueden ser usadas en presencia de brotes de RIB, disminuyendo la incidencia y transmisión del VHB-1. También permiten diferenciar animales vacunados de infectados. Consecuentemente el uso de vacunas marcadas ofrece buenas perspectivas para implementar programas de erradicación (van Oirschot *et al*., 1996; Mars *et al*., 2001).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Lugar de estudio

La provincia de Parinacochas del departamento de Ayacucho, es una zona cuya principal actividad económica es la ganadería bovina de crianza extensiva, con una altitud que abarca desde los 2800 hasta los 3500 m.s.n.m. Los campesinos y pequeños productores poseen en promedio de 1 a 9 animales, constituyendo el 81% de la población, el cual es ganado criollo, los medianos y grandes productores poseen de 10 a 19 y más de 20 animales respectivamente, siendo este el 18% de la población, el cual es ganado criollo mejorado y de raza Brown Swiss, Holstein y Shorton (INEI, 1995). En los últimos años la población bovina ha disminuido en 12.4%, a una tasa anual de –0.6%, pues en el año 1970 existían 36,502 cabezas de ganado, frente a los 32,796 del año 1994 (Anexo1; INEI, 1995). Sin embargo, en el futuro la crianza de ganado lechero podría ser desarrollada en los valles interandinos.

B. Material

1. Animales y muestras

Se utilizaron 469 muestras de suero de bovinos de crianza extensiva de la Provincia de Parinacochas existentes en el banco de sueros del Laboratorio de Virología de la FMV, UNMSM obtenidas a fines del año 2000 para el estudio de seroprevalencia de la brucelosis bovina. Las muestras fueron obtenidas de

vacas y vaquillonas de 25 hatos distribuidos en: Coracora, Chumpi, Puyusca y Pullo, distritos de la provincia de Parinacochas, Ayacucho .

2. Equipos y materiales

Congeladora de – 20°C, cabina de flujo laminar Tipo II (Steril gardhood, USA), Vortex mixer (Stuart scientific, USA), estufa a 37º C de CO2 (Memmert, Alemania), microscopio invertido (Leitz wetzlar, Alemania), micropipetas simples y multicanales, frascos de cultivo descartables de 75 cm^2 y 25 cm^2, pipetas serológicas, portapipetas, , tips o puntas, frascos de 100 , 250 y 500 ml, beakers, placas petri y probetas, recipientes para descarte.

3. Reactivos

Se utilizaron: medio de cultivo Eagle Minimal Esencial Medium (MEM) y Leibovitz (L-15), Caldo triptosa al 2.95 %, antibioticos, antimicóticos (penicilina, estreptomicina, fungizona) y suero fetal bovino (SIGMA, USA), Tripsina Versene, agua tridestilada, suero fisiológico, sueros positivo y negativo de referencia.

4. Cultivos celulares

Se utilizó cultivo secundario de células de cornete nasal de feto bovino (CNB) libres de VDVB como sistema indicador de la prueba de neutralización viral.

5. Cepa del VHB-1

La Cepa Cooper del Virus Herpes Bovino – 1 (Ames – USA), con titulo de 10^{-5} DI_{50} CC/50 µl, fue utilizada como antígeno.

C. Métodos

1. Tamaño muestral

La selección de la muestra se realizó mediante el método de muestreo al azar simple, tomándose como referencia para el cálculo una prevalencia de 30% (Comunicación personal H. Rivera), un nivel de confianza de 95% y un error de 5%, mediante la siguiente fórmula (Thrusfield, 1990):

$$n = \frac{Z^2pq}{e^2}$$

En donde:

n : Tamaño mínimo de muestra.
Z : Nivel de confianza (95%).
p : Proporción de animales afectados.
q : Proporción de animales no afectados.
e : Precisión (5%).

2. Detección de anticuerpos neutralizantes contra el VHB-1

Las muestras se encontraban a –20°C, hasta la fecha de su utilización. La detección de los anticuerpos se realizó mediante la prueba serológica de Neutralización viral, según el protocolo disponible en el Laboratorio de Virología y ampliamente conocido, brevemente este consistió:

Antes de efectuar la prueba, los sueros fueron inactivados a 56°C por 30 minutos en baño maria.

1. Se colocó 50µl de diluyente (MEM + antibiotico) en una microplaca de 96 hoyos para cultivo celular.

2. Se añadió 50µl de suero en la primera hilera de la microplaca (12 sueros diferentes).
3. Con una micropipeta multicanal se realizó diluciones dobles, empezando por 1:2 hasta 1:256, eliminándose de esta ultima hilera 50µl de la mezcla suero-diluyente.
4. Se añadió a toda la microplaca 50µl de VHB-1 conteniendo 100 DI_{50} CC/50µl.
5. En otra placa se realizó los controles de 100, 10 y 1 dosis infectivas del virus y de las células CNB utilizadas.
6. Se incubo, incluyendo la placa control, en estufa a 37°C por una hora.
7. Cumplido este tiempo se añadió a toda la microplaca incluido los controles, 100µl de una suspensión de células de CNB ($3x10^3$/hoyo) y se incubó en estufa a 37°C y 5% de CO_2 por 4 días luego del cual se hizo la lectura.

Interpretación

El titulo del suero fue la dilución mas alta capaz de neutralizar 75 a 100 DI_{50} CC/50µl del virus, evidenciado por la ausencia de efecto citopático en las células indicadoras.

Títulos del suero iguales o mayores a 1:2 fueron considerados positivo a anticuerpos contra el VHB-1.

3. Análisis de datos:

a. Prevalencia

La seroprevalencia se determinó por la siguiente fórmula (Thrusfield, 1990):

Prevalencia :

$$P = \frac{\text{Número de muestras positivas}}{\text{Total de muestras}} \times 100$$

y la prevalencia es expresada con intervalos de confianza (IC) de 95% según la siguiente fórmula:

$$p \pm Z\sqrt{p.q/n}$$

En donde:

p = prevalencia
Z = 95% del nivel de confianza
q = 1- p
n = tamaño muestral

IV. RESULTADOS

El 67.59 ± 4.24% (317/469) de las muestras de suero tuvieron anticuerpos contra el VHB-1. Los porcentajes de animales seroreactores de los 4 distritos fueron similares (Cuadro 1).

Todos los hatos evaluados tuvieron animales seroreactores al virus, en rangos de 25 y 90.9% (Cuadros 2, 3, 4 y 5). Los títulos de anticuerpos variaron entre 2 a > a 256 (Fig 1).

Cuadro 1. Seroprevalencia del VHB-1 en bovinos de 4 distritos de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. 2000.

Distritos	No. animales muestreados	No. De Hatos	Animales con anticuerpos contra el VHB-1	
			No.	%
CORACORA	132	8	82	62.12 ± 8.28
CHUMPI	95	4	72	75.79 ± 8.61
PUYUSCA	141	7	93	65.96 ± 7.82
PULLO	101	6	70	69.31 ± 8.99
TOTAL	**469**	**25**	**317**	**67.59 ± 4.24**

Cuadro 2 . Seroprevalencia del VHB-1 en el distrito de Coracora de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. 2000.

HATO N°	N° DE ANIMALES MUESTREADOS	Animales con anticuerpos contra el VHB-1	
		N°	%
C1	24	18	75
C2	8	4	50
C3	22	14	63.64
C4	9	7	77.78
C5	12	3	25
C6	15	8	53.3
C7	29	19	65.52
C8	13	9	69.23
TOTAL	132	82	62.12

Cuadro 3. Seroprevalencia del VHB-1 en el distrito de Chumpi de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. 2000.

HATO N°	N° DE ANIMALES MUESTREADOS	Animales con anticuerpos contra el VHB-1	
		N°	%
Ch1	33	25	75.76
Ch2	22	17	77.27
Ch3	29	20	68.97
Ch4	11	10	90.91
TOTAL	95	72	75.79

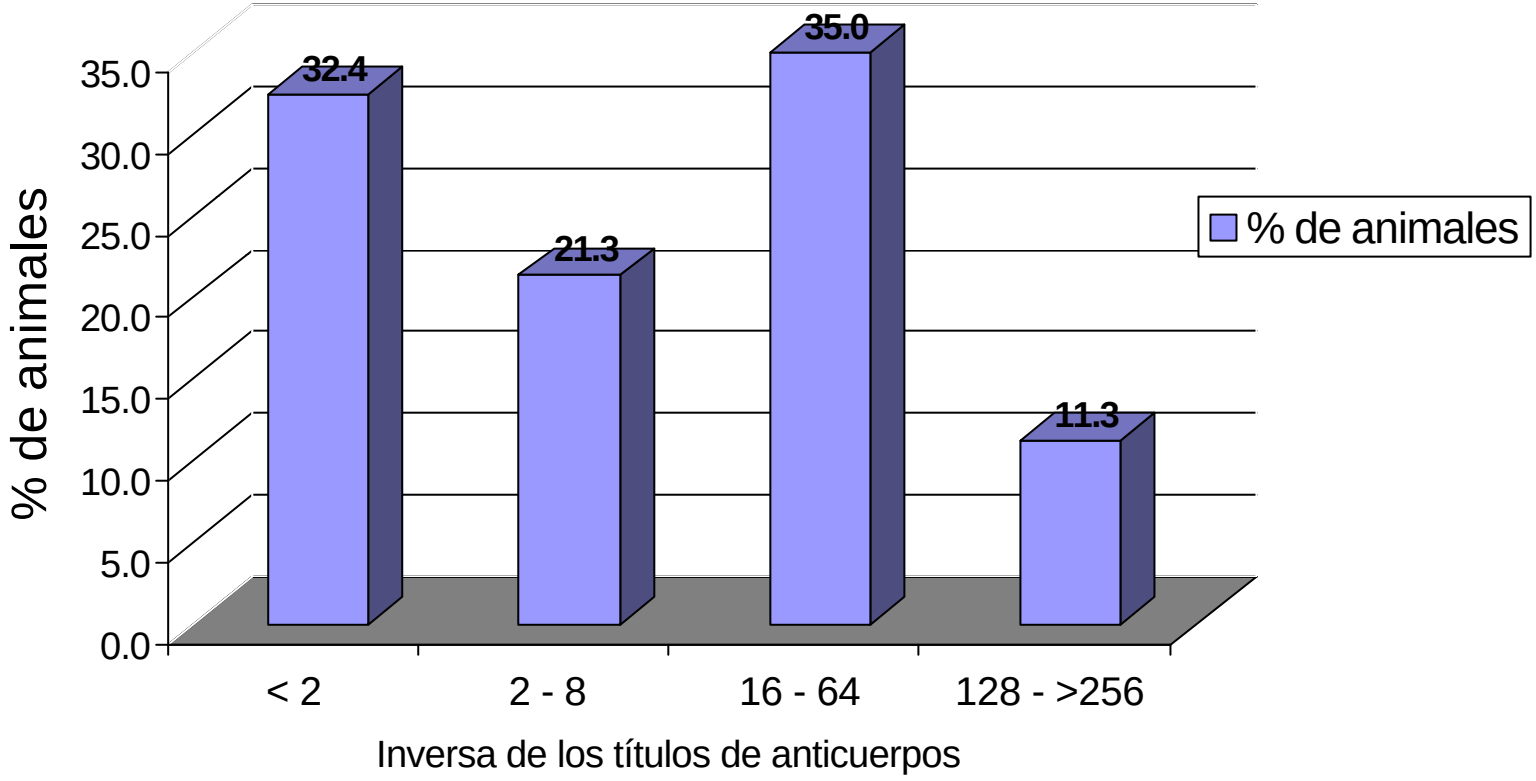
Cuadro 4. Seroprevalencia del VHB-1 en el distrito de Puyusca de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. 2000.

HATO N°	N° DE ANIMALES MUESTREADOS	Animales con anticuerpos contra el VHB-1	
		N°	%
I1	11	7	63.64
I2	41	24	58.54
I3	12	8	66.67
I4	29	19	65.52
I5	6	4	66.67
I6	15	13	86.67
I7	27	18	66.67
TOTAL	141	93	65.95

Cuadro 5. Seroprevalencia del VHB-1 en el Distrito de Pullo de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. 2000.

HATO N°	N° DE ANIMALES MUESTREADOS	Animales con anticuerpos contra el VHB-1	
		N°	%
P1	33	26	78.79
P2	13	9	69.23
P3	14	5	35.71
P4	8	6	75
P5	18	13	72.2
P6	15	11	73.3
TOTAL	101	70	69.31

Figura 1. Distribución de los títulos de anticuerpos neutralizantes contra el VHB-1, en bovinos de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. 2000.



V. DISCUSIÓN

Según las normas vigentes, para el transito interno de animales, dispuestas por el SENASA, Ministerio de Agricultura, estos pueden ser movilizados de un lugar a otro siempre que cuenten con certificado sanitario de negatividad a brucelosis, tuberculosis y fiebre aftosa, mientras que el resto de enfermedades infecciosas como leucosis, rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB), etc., pueden ser introducidas a zonas o valles interandinos a través del movimiento de animales, generalmente con fines de mejoramiento del ganado criollo, procedentes de áreas donde estas enfermedades son prevalentes ya que no constituyen barreras sanitarias. Los agentes causales de estas enfermedades pueden difundirse rápidamente al encontrar una población de animales susceptibles y ante la falta de medidas de control como lo indica, al parecer, el resultado del presente estudio.

El 67.6% (317/469) de los bovinos criollos de la provincia de Parinacochas, Ayacucho presentaron anticuerpos neutralizantes contra el VHB-1, agente causal de la RIB, significando que estos animales fueron expuestos al virus en algún momento de sus vidas; informaciones proporcionadas por los ganaderos indican que no utilizan la vacunación contra la RIB por lo que los anticuerpos detectados fueron inducidos por el virus de campo (Cuadro 1). Los porcentajes de animales seroreactores al VHB-1 fueron similares en los 4 distritos de la provincia en estudio y el 100% de los hatos tuvieron animales seroreactores con variaciones entre 25 a 90.9% (Cuadros 2, 3, 4 y 5) indicando

que la RIB tiene amplia distribución en los bovinos de la provincia de Parinacochas.

Esta alta prevalencia del VHB-1 en animales criollos con un tipo de crianza mayormente extensiva contrasta con el 22.6% reportado en bovinos lecheros de crianza intensiva y 36.5% en bovinos de centros de engorde de Lima (Rosadio *et al*., 1993), así mismo, un reciente estudio de prevalencia del VHB-1 realizado en bovinos lecheros de crianza intensiva y sin historia de vacunación del valle de Lima reporta que el 35% de los animales muestreados tuvieron anticuerpos contra el virus (Sanchez, G., por publicarse). Esta diferencia con lo reportado en bovinos de la costa podría deberse a que el virus es mas frecuentemente reactivado en animales de crianza extensiva por el severo estrés a que están sometidos o que el virus haya sido recientemente introducido al área a través de animales infectados.

El 21.3% de los animales presentaron anticuerpos contra VHB-1 en un rango entre 2 a 8, el 35% de 16 a 64 y el 11.3% de 128 a > a 256 (Fig.1). Estos títulos indican que el virus estuvo activo en los animales del hato durante el muestreo, posiblemente como infecciones primarias o recurrentes tras reactivaciones del estado de latencia (Smith, 1997) induciendo una fuerte respuesta humoral. Los anticuerpos neutralizantes principalmente de tipo IgM seguido por las IgG pueden ser detectadas 10 días post infección (Engels y Ackermann, 1996). El 11.3% de animales con altos títulos de anticuerpos sugieren desafíos recientes posiblemente con consecuencias clínicas de RIB, pues títulos altos de anticuerpos han sido detectados durante brotes de complejo respiratorio con el VHB-1 como agente primario (Rivera *et al*., 1994) y también durante un brote de abortos en yeguas debido al virus herpes equino tipo 1 (Rivera *et al*., 1997), aunque también las infecciones producto de reactivaciones pueden ser de tipo subclínico pero con seroconversión (Van Oirschot, 1995).

Desafortunadamente no se dispone de informaciones del estado sanitario de los animales, pero la presencia del virus en los animales de todos

los hatos muestreados podría estar afectando el tracto respiratorio y estar siendo confundido con neumonías parasitarias, sobre todo en animales jóvenes ya que en el animal adulto la infección por el VHB-1 suele ser subclínica sirviendo de fuente del virus para los animales jóvenes (Rivera *et al*., 1994). Los efectos de mayor relevancia de los virus herpes es a nivel del tracto respiratorio ocasionado rinotraqueitis propiamente dicho o como complejo respiratorio conjuntamente con otros virus, como la Parainfluenza 3, que es un virus común en el ganado bovino y otras especies, diarrea viral bovina; bacterias como la *Pasteurella haemolytica*, y larvas de parásitos. En el tracto genital puede ocasionar la vulvovaginitis y balanopostitis causando abortos aunque este último es más una secuela del problema respiratorio. Miller *et al*., (1991) reportan que hay cepas con cierto potencial abortogénico que pueden ocasionar brotes de abortos.

La provincia de Parinacochas con aproximadamente 32,790 cabezas de bovinos (INEI, 1995) representa un gran potencial para el desarrollo de la ganadería lechera; previos estudios realizados en los bovinos de los distritos de Coracora, Chumpi, Puyusca y Pullo que poseen la mayor población de bovinos indican estar libres de brucelosis (por publicarse) y tuberculosis (Sanchez D., 2002) y nuestros resultados podrían servir de base para determinar el rol de este virus en estos animales y contribuir a mejorar el estado sanitario de esta importante población de ganado criollo del país.

VI. CONCLUSIONES

El Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (VHB-1) está presente en bovinos criollos de los distritos de Coracora, Chumpi, Puyusca y Pullo de la Provincia de Parinacochas con una prevalencia superior a lo reportado en bovinos de crianza intensiva del país.

VII. LITERATURA CITADA

1. Babiuk, L., van Drunen Littel-van den Hurk, S. y Tikoo, S. 1996. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. Vet Microbiol. 53: 31-42.
2. Chase, C., Braun, L., Jessen, J. y Hurley, D. 1995. Studying virus cell interactions: finding new ways to prevent infectious bovine rhinotracheitis in cattle. Departments of Veterinary Science and Biology/Microbiology.
3. Engels, M. y Ackermann, M. 1996. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. Vet Microbiol. 53: 3-15.
4. Fenner, B. 1995. Herpesvirus. En: Virología Veterinaria. Ed Acribia. Zaragoza.
5. INEI. Instituto Nacional de Estadistica e Informática. 1995. III Censo Nacional Agropecuario: Resultados Definitivos, Departamento de Ayacucho. Tomo II. P.152-203. Lima. Perú.
6. Jones, C. 1999. Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survial of the virus in nature. Adv Virus Res. 51: 81-133.
7. Jones, C., Newby, T., Holt, T., Doster, A., Stone, M., Ciacci-Zanella, J., Webster, C. Y Jackwood, M. 2000. Analysis of latency in cattle after inoculation with a temperature sensitive mutant of bovine herpesvirus 1 (RLB106). Vaccine. 18: 3185-3195.
8. Kaashoek, M., Moerman, A., Madic, J., Rijsewijk, F., Quak, J., Gielkens, A. y van Oirschot, J. 1994. A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. Vaccine. 12: 439-444.

9. Kaashoek, M. 1995. Marker vaccines against bovine herpesvirus 1 infections. Thesis Universiteit Utrecht. Netherlands.
10. Kaashoek, M., Rijsewijk, F., Ruuls, R., Keil, G., Thiry, E., Pastoret, P. y van Oirschot, J. 1998. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus mutants with a deletion in the gC, gG, gI or gE gene. Vaccine. 16: 802-809.
11. Mars, M., de Jong, M., y van Oirschot, J. 2000a. A gE-negative bovine herpesvirus 1 vaccine strain is not re-excreted nor transmitted in an experimental cattle population after corticosteroid treatments. Vaccine. 18: 1975 – 81.
12. Mars, M., Rijsewijk, F., Maris, M., Hage, J. y van Oirschot, J. 2000b. The existence of cattle, that are seropositive to glycoprotein B, but not to glycoprotein E of bovine herpesvirus 1, without apparent exposure to the virus. En: Vaccinology and epidemiology of bovine herpesvirus 1 infections. Cap 6. p. 71-81. Thesis Universiteit Utrecht. Netherlands.
13. Mars, M., de Jong, M., y van Oirschot, J. 2001. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the fiel. Vaccine. 19: 1924-30.
14. Miller, J., Whetstone, C. y Van der Maaten, M. 1991. Abortifacient potential of bovine herpesvirus tipo 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. Am J Vet Res. 52: 458-461.
15. OIE; 2000. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. En: Manual of standards diagnostic tests and vaccines.
16. Pidone, C., Galosi, M. y Etcheverrigaray, M. 1999. Herpesvirus Bovinos 1 y 5. Analecta Veterinaria (Argentina). 19: 40-50.
17. Richey, E. 1994. IBR in beef cattle (Infectious bovine rhinotracheitis/red nose). VM-55. University of Florida, Institute of Food And Agricultural Sciences.
18. Rivera, H. 1993. El virus de la diarrea viral bovina (BVD). Rev Inv Pec IVITA (Peru). 6: 1-7.

19. Rivera, H., Manchego, A., Sandoval, N., Vargas, A., Araujo, A., Gonzáles, A. y Rosadio, R. 1993. Aborto infeccioso en bovinos de leche del valle de Lima. Rev Inv Pec IVITA (Perú). 6: 31-37.
20. Rivera, H., Manchego, A., Sandoval, N., Morales, C., Flores, E.; 1994; Complejo respiratorio bovino en terneros del valle de Lima. Rev Inv Pec IVITA (Perú). 7: 35-38.
21. Rivera, H., Alvitres, R., Manchego, A., Sandoval, N. y Rosadio, R. 1997. Aborto por virus herpes equino. Rev Inv Pec IVITA (Perú). 8:49-55.
22. Rosadio, R., Rivera, H. y Manchego, A. 1993. Prevalence of neutralising antibodies to bovine herpesvirus - 1 in Peruvian livestock. Vet Rec. 132: 611 - 612.
23. Sanchez, D. 2002. Prevalencia de la tuberculosis bovina en la provincia de Parinacochas, Ayacucho. Tesis bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima, 42p.
24. Smith, K. 1997. Herpesviral abortion in domestic animals. Vet J. 153:253-268.
25. Thrusfield, M. 1990. Epidemiología Veterinaria. p. 42. Editorial Acribia. España.
26. Thiry, E., Saliki, J., Bublot, M. y Pastoret, P. 1987. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 10: 59-63.
27. Van Oirschot, J. 1995. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. Veterinary Quartely. 17: 29-33.
28. Van Oirschot, J., Rijsewijk, F. y Kaashoek, M. 1996. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. Vet Microbiol. 53:43-54.
29. Van Oirschot, J., Kaashoek, M., Maris-Veldhuis, M. y Rijsewijk, F. 1999. Strains of bovine herpesvirus 1 that do not express an epitope on glyciprotein E in cell culture still induce antibodies that can be detected in a gE-blocking ELISA. Vet Microbiol. 65: 103-113.
30. Wellenberg, G., Verstraten, E., Mars, M. y van Oirschot. 1998a. ELISA detection of antibodies to glycoprotein E of bovine herpesvirus 1 in bulk milk samples. Vet Rec. 142: 219-220.

31. Wellenberg, G., Verstraten, E., Mars, M. y van Oirschot. 1998b. Detection of bovine herpesvirus 1 glycoprotein E antibodies in individual milk samples by enzyme-linked immunosorbent assays. J Clin Microbiol. 36: 409-413.
32. Wentink, G., van Oirschot, J. y Verhoeff, J. 1993. Risk of infection with bovine herpes virus 1 (BHV-1): a review. Veterinary Quartely. 15: 30-33.
33. Winkler, M., Doster, A. y Jones, C. 2000a. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infectes calves. J Virol. 74: 5337-46.
34. Winkler, M., Schang, L., Doster, A., Holt, T. y Jones, C. 2000b. Analysis of cyclins in trigeminal ganglia of calves infected with bovine herpesvirus-1. Journal of General Virology. 81: 2993-2998.
35. Zanabria, V., Rivera, H. Y Rosadio, R. 2000; Etiología del síndrome neumónico agudo en vacunos de engorde en Lima. Rev Inv Vet Perú. 11:67-85.

Anexo 1. Población bovina por distrito en la provincia de Parinacochas, Ayacucho.

DISTRITOS	N° de Unidades Agropecuarias	N° de bovinos	%
Coracora	1224	7635	23.3
Chumpi	624	4195	12.8
Coronel Castañeda	168	1577	4.8
Pacapausa	160	1546	4.7
Pullo	537	6008	18,3
Puyusca	719	7664	23.4
San Francisco de Ravacayco	163	1278	3.9
Upahuacho	410	2893	8.8
Prov. Parinacochas	4005	32796	100.0

Fuente: INEI, 1995