UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

Seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en ganado lechero de crianza intensiva del valle de Lima

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Renzo Edward Aguilar Salomón

Lima - Perú

2006

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

Facultad de Medicina Veterinaria

ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral:

N.° 055-EAPMV/FMV-2006.

PRESIDENTE : .....
ALFREDO DELGADO CASTRO

MIEMBROS : .....
HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO
Directora de la Tesis

: .....
JOSÉ CAMACHO SALCEDO

: .....
NÉSTOR FALCÓN PÉREZ

San Borja, 19 de Setiembre del 2006

V° B.

.....
DR. ARMANDO GONZÁLEZ ZARIQUIEY
Director de la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA)
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA ACADEMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **Martes 19 de Setiembre del 2006**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral **N.° 055-EAPMV/FMV-2006**, integrado por los siguientes profesores:

ALFREDO DELGADO CASTRO,	Presidente del Jurado.
HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO,	Directora de la Tesis
JOSÉ CAMACHO SALCEDO,	Miembro del Jurado
NÉSTOR FALCÓN PÉREZ,	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **Renzo Edward Aguilar Salomón**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

"SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA EN GANADO LECHERO DE CRIANZA INTENSIVA DEL VALLE DE LIMA"

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Directora de Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:00 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Alfredo Delgado Castro; Mg. Prof. Principal, T.P.

Hermelinda Rivera Gerónimo; M.V. Prof. Principal, D.E.

José Camacho Salcedo; MV. Prof. Asociado. T.C.

Néstor Falcón Pérez MV. Prof. Asociado, T.C.

Esta tesis está dedicada a mis padres Carmen y Moisés
por todo lo que representan y por su apoyo, consejos,
comprensión, amor y ayuda en todo momento.

A mis hermanos Aarón y Betsabe por el apoyo
Incondicional de toda la vida.

A la Dra. Hermelinda Rivera mi eterna gratitud,
este trabajo es fruto de sus enseñanzas, sabios
consejos e invalorable apoyo y además testimonio
de su paciencia infinita.

Mi sincero reconocimiento a la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por la calidad de profesionales que forma. Mi especial gratitud y estima personal para:
Dr. Francisco Suarez A.
Dr. José Camacho S.
Dr. Néstor Falcón P.
Dr. Alfredo Delgado C.

A mis amigos Erik Zacarías y Gabriela Sánchez por su colaboración.

Del mismo modo a mis amigos Viterbo Ayvar y Siever Morales
Por su total apoyo durante los años que pasamos juntos en nuestra formación profesional, por todas las vivencias y su amistad de toda la vida.

A Wilma, con todo mi amor. Por hacerme mejor persona.

CONTENIDO

Resumen vi
Abstract vii
Lista de Cuadros viii
I. INTRODUCCIÓN 1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 3
2.1 Características del virus 3
2.1.1 Morfología 3
2.1.2 Proteínas 4
2.1.3 Biotipos 5
2.1.4 Genotipos 6
2.1.5 Replicación viral 6
2.2 Epidemiología 7
2.2.1 Fuentes de Infección 8
2.2.2 Métodos de transmisión 9
2.2.3 Prevalencia de la Diarrea Viral Bovina 10
2.3 Patogénesis 11
2.3.1 Infección subclínica 12
2.3.2 Infección aguda 13
2.3.3 Enfermedad de las mucosas 14
2.3.4 Síndrome hemorrágico 14
2.3.5 Complejo respiratorio 15
2.4 Aspectos inmunológicos 15
2.5 Diagnóstico 16
2.5.1 Aislamiento viral 16
2.5.2 Detección de antígeno viral 17
2.5.2.1 Inmunoperoxidasa 17
2.5.2.2 Inmunofluorescencia 17
2.5.2.3 ELISA de captura de antígenos 17
2.5.3 Detección de anticuerpos 17
2.5.3.1 Virus neutralización 18

2.5.3.2 ELISA 18
2.5.4 Detección del ácido nucleico viral 18
2.6 Control y prevención 19
2.6.1 Vacunas 20
2.6.1.1 Vacunas a virus vivo modificado 20
2.6.1.2 Vacuna Inactivada 21
III. MATERIALES Y MÉTODOS
3.1 Lugar de estudio 22
3.2 Animales 22
3.3 Materiales 23
3.3.1 Equipos y materiales 23
3.3.2 Reactivos 24
3.3.3 Cultivos celulares 24
3.3.4 Cepa del VDVB 24
3.4 Tamaño de Muestra 24
3.5 Métodos 26
3.5.1 Obtención de muestras 26
3.5.2 Detección de anticuerpos neutralizantes contra el VDVB 26
3.6 Análisis de datos 27
IV. RESULTADOS 28
V. DISCUSIÓN 31
VI. CONCLUSIONES 34
VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA 35

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos productores de leche bajo crianza intensiva del valle de Lima. Se colectaron muestras de sangre de bovinos hembras mayores de 6 meses (n = 311) procedentes de 12 hatos sin antecedentes de vacunación contra la enfermedad de la diarrea viral bovina para la detección de anticuerpos mediante la prueba de neutralización viral. El 56.0 $\pm$ 5.5% (174/311) de las muestras presento anticuerpos contra el VDVB, con títulos entre 2 a >256. Cinco de los 12 hatos no tuvieron animales seroreactores. Los resultados indican que el VDVB está difundido en bovinos del valle de Lima, aunque se encontraron hatos libres o con una prevalencia viral baja.

Palabras Clave: virus de la diarrea viral bovina, bovinos lecheros, anticuerpos, prevalencia.

ABSTRACT

The prevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) was determined in 12 dairy herds without history of vaccination against bovine viral diarrhea disease of the Lima valley. Blood samples were taken in 311 female cattle older than 6 months of age for the detection of antibodies against BVDV by neutralization test. The prevalence of BVDV was 56.0 $\pm$ 5.5 % (174/311) and the titers of antibodies against BVDV ranged from 2 to >256. Five of the 12 herds did not have seropositive animals. The results indicate that BVDV is widely in dairy herds of Lima valley; although viral prevalence is low and some herds are free of the disease.

Key words: bovine viral diarrhea virus, bovine, dairy herd, prevalence, antibody.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Ubicación de los establos lecheros considerados en el estudio 2002…..……..……..……...23

Cuadro 2: Número de animales muestreados por establo en estudio 2002..……25

Cuadro 3: Seroprevalencia del VDVB en bovinos lecheros de 12 hatos del valle de Lima 2002……29

Cuadro 4: Seroprevalencia del VDVB según zona de procedencia de los animales muestreados 2002……..29

Cuadro 5: Seroprevalencia del VDVB según edad de los animales muestreados 2002……30

Cuadro 6: Distribución de los anticuerpos contra el VDVB en los animales muestreados según zona de ubicación 2002……..30

I. INTRODUCCIÓN

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es uno de los patógenos de mayor distribución mundial que afecta a los rumiantes domésticos y salvajes, causando pérdidas económicas debido a las infecciones transplacentarias y su asociación con otros patógenos del tracto respiratorio y digestivo (Houe, 2003). El VDVB es un pestivirus con singular característica epidemiológica y biológica (Houe, 1995; Peterhans *et al*, 2003).

La infección viral se presenta en forma aguda pero leve o de tipo subclínico con un corto periodo de replicación y eliminación de virus seguido de completa recuperación con desarrollo de una sólida inmunidad; si el animal esta preñado el virus atraviesa la placenta y puede ocasionar un conjunto de fetopatías que va desde una reabsorción embrionaria, aborto, malformación congénita ó el nacimiento de un ternero infectado en forma persistente como resultado de la infección fetal durante el primer tercio de la gestación. El ternero que nace infectado es inmunotolerante; es decir no es capaz de formar anticuerpos contra el VDVB que posee en su organismo, este animal es portador y principal diseminador del virus ya que un solo animal portador puede infectar al 90 % o más de los animales del hato (Houe, 1995; Schereiber *et al*, 1999).

Estudios de seroprevalencia realizados sobre el VDVB en bovinos y

otras especies como camélidos del país, muestran que el virus está ampliamente distribuido con prevalencias que varían de cero a mayores de 90%, también resultados de estudios previos en bovinos lecheros de la cuenca de Lima indican que VDVB es uno de los principales agentes causantes de aborto (Rivera *et al*, 2001), sin embargo a la fecha no se ha completado la información sobre su prevalencia en bovinos lecheros del valle de Lima y otras cuencas del país. Así mismo, se han detectado animales portadores del virus inclusive en hatos con programas de vacunación (Chacon *et al*, 2002). Generalmente el ganadero del valle de Lima no cuenta con un programa de control de la DVB y si a esta situación se suma la existencia de animales portadores y el transito irrestricto del ganado, podrían ser algunas de las razones de la amplia distribución del virus en el país.

Los estudios de prevalencia de un agente infeccioso bacteriano o viral tiene mucha relevancia ya que sirve de base para otros estudios epidemiológicos y para efectuar medidas de control, por lo que el objetivo del presente estudio fue conocer la prevalencia de este agente viral en hatos de bovinos lecheros sin historia de vacunación ubicados en el valle de Lima.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

2. I. Características DEL VIRUS

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB), agente causal de la DVB, es clasificado como miembro del género Pestivirus, perteneciente a la familia. Flaviviridae. (Kobrak y Weber, 1997; Vanroose *et al*, 1998; Njaa *et al*, 2000).

El VDVB es relacionado antigénicamente con el virus del cólera porcino (VCP) y el virus de la enfermedad de la frontera (VEF) que afecta al porcino y al ovino respectivamente (Paton, 1995; Murphy *et al*, 1995; Vega *et al*, 2000). El VDVB es una de los principales causantes de las fallas reproductivas y un componente del complejo respiratorio bovino; siendo por tanto, responsable de grandes pérdidas económicas en la ganadería lechera mundial (Baker, 1987; Obando, 1999).

2. 1.1. Morfología

Morfológicamente, el VDVB es una partícula esférica de 48 - 60 nanómetros (nm) de diámetro, constituido por una nucleocápside icosahedral de 25 a 37 nm de diámetro de naturaleza proteica y una envoltura externa de naturaleza lipídica. (Kobrak: y Weber, 1997; San Juan *et al*, 1999).

En la envoltura se sitúan las tres glicoproteínas, mientras que en la nucleocápside se localiza el ARN y la proteína de la cápside p 14/C (San Juan *et al*, 1999).

2. 1.2. Proteínas.

La información genética del virus de la DVB, está contenida en una molécula de ARN de simple cadena de polaridad positiva, el genoma está constituido de 12.0 a 12.5 Kilobases (Paton, 1995; Potgieter, 1995; Neill y Ridpath, 2001). El primer evento de la biosíntesis del virus es la traducción del código genérico en una poliproteína que es cortada durante y post traducción de la misma para dar lugar a las diferentes proteínas estructurales y no estructurales del virus (Neill y Ridpath, 2001). Las proteínas estructurales son codificadas por el primer tercio cerca al 5´, y las proteínas no estructurales son codificadas por los dos tercios posteriores cerca del 3´, con excepción de la proteína P^{20}/N^{pro} , la cual es codificada por el primer tercio del genoma viral. (Neill y Ridpath, 2001; Potgieter, 1995).

La proteína P14/C es la más abundante y constituye la cápside viral y antígeno del grupo viral. Su función es empaquetar el ARN genómico y proporcionar las interacciones necesarias para la formación de la envoltura del virión.

La proteína P^{20}/N^{pro} es responsable de la proteólisis de la poliproteína producto de la traducción del genoma.

La EO/gp48 es una glicoproteína asociada a la envoltura viral, responsable en parte de la inducción de los anticuerpos neutralizantes (Paton, 1995), y cumple una función de una ARNasa y es secretada al espacio extracelular por exocitosis durante la replicación viral.

La E2/gp53 es la glicoproteína más importante del virión y antígeno del serotipo. Esta glicoproteína contiene los epítopos que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes luego de una infección o vacunación. Contiene una

región hipervariable y altamente mutable. Es el sitio donde ocurren las mutaciones y cambios antigénicos que dan lugar a la aparición de cepas variantes del VDVB (Paton, 1995; Donis, 1995; Van Oirschot *et al*, 1998; Bruschke *et al*, 1997).

La P125/NS23 es una proteína no estructural indispensable para la multiplicación del virus; es la más conservada en todos los pestivirus. Los animales infectados o vacunados con virus modificado desarrolla una fuerte respuesta humoral contra esta proteína responsable de las reacciones cruzadas con los VCP y VEF (Potgieter, 1995).

P80/NS3, esta proteína surge a partir de la p125 determina el fenotipo del VDVB, tiene actividad de ligasa en el extremo de carbono terminal y de proteasa en el extremo amino terminal. Está presente únicamente en el biotipo cito patogénico del virus (Paton, 1995).

2.1.3. Biotipos.

Un aspecto importante de este agente viral es la presencia de dos biotipos en función a su conducta de desarrollo in Vitro (cultivo celular) y a nivel molecular: biotipo citopatogénico (CP) y biotipo no citopatogénico (NCP) (Vanroose *et al* 1998; Paton. 1995), el biotipo citopatogénico, causa vacuolización y muerte celular in Vitro. Ambos biotipos producen la misma enfermedad con toda la gama del síndrome de la DVB (Vanroose *et al*, 1998).

El biotipo citopatogénico surge a partir del biotipo no citopatogénico del VDVB, esta diferenciación se da por el procesamiento de la proteína NS23 o p125 presente en el biotipo NCP; el biotipo CP posee además de la proteína p125, la proteína P80, la cual le confiere el fenotipo citopatogénico al virus. Análisis de secuenciamiento del genoma muestran que el biotipo CP, puede ser generado por una división proteolítica de un alterado NS23 (Collet *et al*, 1988), duplicación genética de NS3 (Meyers *et al*, 1992;Tautz *et al*, 1994), o simple punto de mutación (Kurmmerer y Meyers, 2000; Vilcek *et al*, 2000).

El origen del virus CP, a partir del virus NCP del VDVB, explica el gran nivel de similitud antigénica encontrado entre estos dos biotipos del VDVB (CP/NCP); además del origen espontáneo de la enfermedad de las mucosas ante la presencia de ambos biotipos en el mismo animal (Paton, 1995). El biotipo NCP del VDVB es aislado comúnmente de animales con infección aguda y están presentes invariablemente en animales persistentemente infectados (Paton, 1995).

2.1.4. Genotipos

Mediante estudios genéticos se han diferenciado dos genotipos dentro del VDVB, los cuales se han denominado genotipo I y II (Pellerin *et al*, 1994; Ridpath *et al*, 2000). Las diferencias entre el genoma de ambos genotipos se encuentran en tres zonas hipervariables; dos de las cuales se encuentran en la gp53/E2 (Kobrak y Weber, 1997). En últimos estudios realizados, analizando la región 5 del genoma por RT -PCR, dentro del genotipo I se han diferenciado tres subgenotipos distintos denominados Ia, Ib e Ic (San Juan *et al*, 1993).

El genotipo I incluye las cepas de laboratorio y las vacunales: NADL, SINGER, NY-I, C virus, TGAN y Osloss. El genotipo II esta compuesta por las nuevas cepas asociadas con una alta mortalidad, trombocitopenía y hemorragias en USA y Canadá; cepas aisladas de animales con infección persistente nacidas de vacas vacunadas y cepas aisladas de suero fetal como: NY-93, 890, AZSPLN, MS-I; SY-89 y V/FLL (Ridpath *et al*, 2000)

2.1.5 Replicación viral.

El virus de la DVB, se replica óptimamente en células mitóticamente activas como: linfocitos, fagocitos mononucleares y células epiteliales (Njaa *et al*, 2000; Potgieter, 1995).

La replicación comienza con la adhesión, mediante la gp E2, y penetración en la célula hospedadora, al parecer el receptor especifico del VDVB es una proteína de superficie de 56 kD que es una actina unida a una glicoproteína celular (Schelp *et al*, 2000) luego que el virus ingresa al citoplasma mediante endocitosis mediada libera su genoma en el citosol. El ARN viral es traducido en el ribosoma en una poliproteína la misma que es cortada por enzimas de origen viral en polipéptidos que constituyen las proteínas estructurales y no estructurales, y el ensamblaje tiene lugar tanto en el aparato de golgi como en el retículo endoplásmico donde los viriones adquieren su envoltura lipídica.

Cada célula infectada libera de 100 a 1000 viriones que alcanzan el medio extracelular mediante exocitosis. (San Juan *et al.* 1999) y al cabo de 3 horas postinfección pueden detectarse polipéptidos víricos en las células infectadas alcanzando un máximo a las 12 a 14 horas postinfección (Brownlie *et al*, 1997).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

El VDVB tiene una distribución mundial y responsable de un síndrome que va desde muy benignos a severos, e incluyen la potenciación de otras infecciones, fallas reproductivas, defectos congénitos, animales con infección persistente, infecciones agudas, y una generalmente fatal enfermedad de las mucosas (Njaa *et al*, 2000; Paton, 1995; Baker 1987). Las primeras enfermedades producidas por pestivirus, fueron identificadas como enfermedad de las mucosas y diarrea viral bovina (DVB), ambas causadas por el VDVB; el cual también puede causar enfermedad en otros rumiantes y en cerdos.

Los pestivirus son considerados como uno de los agentes virales mas exitosos de la naturaleza por su habilidad de difundirse, causar enfermedad y aun persistir dentro de una población sin ser descubierto (Sandvick, 1999). En este sentido el virus es mantenido en la naturaleza principalmente á través de animales PI, es decir, un animal que fue infectado en algún momento antes de los 120 - 125 días de su desarrollo fetal, cuando su sistema inmune no es capaz de reconocer al virus como invasor convirtiéndose en inmunotolerante al

virus infectante y PI por toda su vida (Brownlie *et al*, 1998).

La inmunotolerancia es a la cepa viral específica, es decir, estos animales no desarrollan anticuerpos neutralizantes contra el VDVB presente en el animal, sin embargo, son inmunocompetentes a otras cepas diferentes del VDVB u otros agentes infecciosos. En estos animales el virus persiste en todos los tejidos, especialmente en las células del sistema inmune y tejidos inmunológicamente privilegiados como el sistema nervioso central (Sándwich, 1999).

El animal PI es considerado el reservorio o portador más importante del VDVB ya que elimina continuamente grandes cantidades del virus en sus secreciones y excreciones y son incapaces de responder formando anticuerpos o inmunidad mediada por células, por ser animales inmunotolerantes y probablemente también por el continuo daño funcional de las células del sistema inmune. Los animales Inmunocompetentes infectados agudamente, también eliminan el virus por varios días o semanas, pero la cantidad de virus que eliminan es menor y finalmente el virus puede ser removido eficientemente del animal por los anticuerpos neutralizantes con la subsiguiente recuperación del animal (Haue, 1999).

2.2.1. Fuente de la infección

La principal fuente de infección del VDVB son los animales PI, cuya eficacia en la transmisión del virus es tal que, en tan solo tres a cuatro meses son capaces de infectar al 90% de los animales con los que conviven (Houe, 1999; Njaa *et al*, 2000). Los animales PI eliminan grandes cantidades de virus durante toda su vida a través de secreciones y excreciones tales como descarga nasal, saliva, semen, orina, heces, lágrimas y leche (Brock *et al*, 1991; Houe, 1995; Sandvik, 1999); siendo la prevalencia de las animales PI de 0.5 - 2.00% (Houe, 1995)

Los animales con infección aguda representan también una fuente

importante de diseminación viral durante la infección, el virus es usualmente excretado a partir del día 4 al día 10; aunque el virus puede ser excretado durante un periodo mayor (Brownlie *et al*, 1991). Si bien, los animales con infección aguda también diseminan el virus por secreciones y excreciones, la cantidad del virus es mucho menor en relación a los animales PI. (Houe, 1995; Kirkland *et al*, 1992).

El virus también ha sido aislado de otros rumiantes incluyendo ovinos, caprinos, y algunos de vida silvestre y en cautiverio; siendo estas especies, consideradas fuente potencial de transmisión del virus (Houe, 1995).

2.2.2. Métodos de transmisión.

Los métodos de transmisión pueden ser verticales y horizontales siendo la transmisión vertical la que se da de una generación a la siguiente, pudiéndose esta aplicarse para los animales PI. Sin embargo en muchos casos, la transmisión vertical es precedida por una transmisión horizontal a la madre, y durante esta infección aguda de la madre atraviesa la placenta e infecta al feto (Houe, 1995).

La transmisión vertical ocurre de una generación a otra. Se incluye la transmisión al feto a través del semen infectado de toros con infección aguda o persistentemente infectados (PI). Las hembras seronegativas pueden ser inseminadas con semen infectado pudiendo infectarse, sin embargo, la producción de fetos PI raramente ocurre por esta ruta; en caso de ocurrir la producción de una cría PI, entonces es una transmisión vertical, aunque como ya se mencionó va precedida de una transmisión horizontal.

A pesar de la alta mortalidad entre los terneros PI (Houe, 1993), algunos pueden llegar a adultos y reproducirse, entonces los terneros de madres PI son también PI, por lo tanto, se forman líneas familiares de animales PI y puede ocurrir en varias generaciones (Houe, 1991). Además, puede ocurrir transmisión vertical después de la transferencia de embriones, si la receptora

es PI, si la hembra donante es PI. El VDVB esta presente en niveles altos en el medio uterino, por ello antes se puede dar una transmisión horizontal de madre a madre a través de los procedimientos del lavado (Houe, 1995).

La transmisión horizontal puede ser directa o indirecta. La transmisión directa, ocurre por contacto entre animales susceptibles y animales persistentemente infectados (PI), siendo esta la vía más importante de transmisión de la infección; presumiblemente, la más eficiente es el contacto de nariz a nariz (Travén *et al*, 1991), existe además la posibilidad de transmisión por el aire siendo a poca distancia, aunque esto no está probado experimentalmente.

Al igual que en la transmisión vertical, la principal fuente de infección son los animales PI aunque también esta probado la capacidad de transmitir el VDVB a partir de animales con infección aguda.

El semen es una fuente importante de transmisión horizontal para las vaca, esto está asociado con la eliminación del virus a través de este medio.

2.2.3. Prevalencia de la diarrea viral bovina.

Estudios realizados en diferentes países demuestran que la prevalencia del VDVB, se encuentra dentro del 40 - 90% (Niskaenen *et al*, 1991; Houe, 1995; Kirkland, 1994).

En un estudio de 1,593 bovinos de un total de 133 hatos en Inglaterra y Gales, se mostró que el 62.5% de animales presentaron anticuerpos neutralizantes contra el VDVB, la prevalencia entre regiones varían entre 43% y 79%. Otros estudios de UK mostró 1.8% de animales virémicos entre 3,151 animales y a la prevalencia de un total de 18,759 muestras fue 64.9% (Houe *et al*, 1995).

En Dinamarca con muestreo al azar, de un total de 1,332 muestras

colectadas en dos camales, se obtuvo 78% de animales positivos a anticuerpos y 0.9% de los animales fueron positivos al VDVB. Asimismo, en un total de 2,750 muestras en 19 hatos lecheros, se obtuvieron 37 (1.4%) de animales virémicos; 28 (1.1%) de animales PI y 64% fueron anticuerpo positivos (Houe, 1991).

En Suecia, evaluaron un total de 711 vaquillonas seleccionadas para inseminación artificial (IA), mostrando 1.7% animales virémicos; 1.3% animales PI y 41% de animales positivos anticuerpos.

En los Estados Unidos de América se evaluaron 3,157 animales de 67 hatos aproximadamente el 50% de los hatos tenían historia de infección por VDVB, mostrando el 1.7% de animales PI y 89% de animales positivo anticuerpos (Houe, 1995).

En el Perú, Contreras *et al*, 2000 determinó una prevalencia de 72.4% de la DVB, en un estudio realizado en el Valle del Mantaro. En un sistema de producción semi-intensiva del Valle de Mantaro, Rivera *et al.* 2003, reportó 0.74% de animales PI; Morales *et al* (2003) reportó una prevalencia de 0.76% de terneros PI en el Valle de Arequipa; Chacón *et al* (2003) reportó una prevalencia de 3.8% de animales PI en el Valle de Lima.

2.3 PATOGENESIS

La transmisión horizontal del virus es en forma directa, por inhalación de saliva infectada, descarga óculo nasal, vaginal, orina, heces. La transmisión también puede ocurrir a través del semen infectado, de toros con infección aguda o PI (Vanroose, *et al*, 1998; Baker, 1995). La transmisión vertical ocurre en cualquier etapa de la gestación; además la transmisión también es posible vía agujas hipodérmicas (Baker, 1987; Bitsch y Rondsbolt, 1995).

Las primeras poblaciones celulares que soportan la replicación viral son las células epiteliales de la cavidad bucal, tonsilas y del tracto digestivo, células

linfoides, como consecuencia el animal puede presentar múltiples expresiones clínicas.

La infección transplacentaria con VDVB es muy frecuente ya que el virus cruza la placenta con casi 100% de eficiencia. El resultado de la infección del feto dependerá principalmente del periodo de gestación cuando ocurra la infección y del biotipo de la cepa infectante. Los efectos pueden ser muerte embrionaria, fetal, aborto o momificación, malformación congénita, nacimientos de terneros débiles, nacimientos de terneros PI y nacimientos de terneros sanos (Baker, 1995.Hoenning y Liess, 1995). Los terneros PI son el resultado de la infección del feto entre los 120 a 125 días de edad fetal con una cepa NCP (Vanroose *et al*, 1998; Bock *et al*, 1997).

Los fetos bovinos son capaces de desarrollar una respuesta inmune contra el virus de la DVB a los 180 días de gestación, aunque para algunos fetos ya es posible una respuesta con anticuerpos entre los 120 y 165 días de gestación. Dicha respuesta inmune en el feto se desarrolla luego de 20 a 30 días post infección (Potgieter, 1995; Bruschke *et al*, 1996).

2.3.1 Infección subclínica

El 70 al 90% del ganado adulto susceptible puede presentar la DVB subclínico. El periodo de incubación es de 5 a 7 días aproximadamente luego de lo cual se presenta una ligera fiebre y leucopenia, que usualmente no es notado por el veterinario ganadero, siendo esto seguido por una producción de anticuerpos neutralizantes (Baker, 1987). En general, es raro que el VDVB causa enfermedad en animales inmunocompetentes, sin embargo, debido a su rol inmunosupresor el VDVB puede potenciar o favorecer el desarrollo de infecciones secundarias, sobre todo aquellas de tipo respiratorio como el complejo respiratorio bovino (Obando, 1999).

La infección persistente con el VDVB en el ganado bovino resulta de infecciones en útero (Fredriksen *et al*, 1999; Sandvik, 1999). Las hembras

gestantes PI usualmente producen crías PI; teniendo éste las siguientes características: terneros anormales, nacimientos prematuros, retardan el crecimiento y dificultad para la lactación (Bock *et al.* 1997).

Algunos mueren dentro de los 6 primeros meses de vida, tal vez por el debilitamiento de la respuesta inmune contra la enfermedad. Sin embargo algunos muestran salud y crecimiento normal. Los animales PI resultan en una inmunotolerancia a los antígenos del virus de la DVB, resultando de esto evidencias de la interacción sinérgica del VDVB con otros agentes patógenos.

Los toros infectados en forma aguda o PI, producen semen infectado con el VDVB, como consecuencia de la replicación del virus en la vesícula seminal y glándula prostática (Kirkland *et al*, 1997), el cual sirve como medio para la transmisión del virus a vacas susceptibles. La calidad del semen infectado por el VDVB, es caracterizada por el descrecimiento de la motilidad, incremento de porcentaje de anormalidades morfológicas de las células espermáticas. (Kírkland *et al*., 1994; Baker, 1987).

2.3.2. Infección aguda.

La infección aguda en animales seronegativos e inmunocompetentes, puede dar un rango muy amplio de signos clínicos, estando relacionados con factores como cepa del virus, edad del animal, inmunidad y estado fisiológico del animal y la presencia de otros agentes patógenos. La mayoría de las infecciones agudas están causadas por el biotipo NCP, generalmente ocurre en animales entre 6 meses y 2 años de edad (Baker, 1995). El periodo de incubación es de 5 - 7 días; seguido de fiebre transitoria y viremia por encima de los 15 días.

Luego del ingreso del virus se replica en las células epiteliales de la mucosa oronasal y tonsilas, la progenie se disemina vía sanguínea y linfática, como virus libre o asociado a linfocitos y monositos. Además, clínicamente la enfermedad se caracteriza por: estomatitis erosiva aguda, gastroenteritis y

diarrea, leve depresión, inapetencia, descarga oculonasal. Las infecciones agudas causan ovaritis y producen infertilidad temporal (Vallroose *et al*, 1998).

El VDVB, raramente causa enfermedad en animales menores de 6 meses de edad. Los terneros recién nacidos infectados con VDVB pueden padecer de severas enteritis que son ocasionalmente de curso fatal (Ames y Baker, 1990). Experimentalmente se ha demostrado que en terneros que tomaron tarde el calostro, la infección que resultó fue una enfermedad clínica benigna con rápido restablecimiento. Los hatos susceptibles experimentan diarrea con alta morbilidad pero con baja o nula mortalidad; la producción lechera también se ve afectada. Generalmente, los anticuerpos neutralizantes son detectados en suero 3 a 4 semanas post infección y persisten probablemente por años. (Bruschke el al, 1996; Vanroose *et al*, 1998).

2.3.3. Enfermedad de las mucosas.

Es una forma esporádica de la infección con el VDVB y usualmente afecta a los animales entre meses y 2 años. La enfermedad de las mucosas, es usualmente de curso fatal y esta asociado con súper infección del animal PI con el biotipo NCP, por el biotipo CP del VDVB (Brownlie *et al*, 1998; Bolin *et al*, 1990; Paton, 1995), teniendo como condición, que el biotipo superinfectante CP debe ser antigénicarnente homólogo al biotipo NCP presente en el animal. (Vanroose *et al*, 1998; Paton, 1995). Estos animales desarrollan profusa diarrea, una rápida pérdida de condición corporal, erosiones a nivel del tracto gastrointestinal, y muerte (Baker, 1995; Bolin *et al*, 1995a).

2.3.4. Síndrome Hemorrágico

En USA Y CANADA, se han reportado como severos, en estos casos se observa diarrea con sangre, epistaxis, congestión en conjuntiva y mucosas, hemorragias petequiales y equimóticas en mucosas, los animales muestran pirexia, leucopenia, linfopenia y neutropenia. Este síndrome ha sido asociado con infecciones por cepas NCP del genotipo II (Ridpath *et al*, 2000)

2.3.5. Complejo respiratorio.

La infección con VDVB en animales inmunocompetentes y seronegatívos tiene poca importancia; Pero sí como un agente inmunosupresor. El VDVB potencia a otras infecciones virales y bacterianas como: Parainfluenza tipo 3, Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Coronavirus, Rotavirus, Pasteurella spp., Salmonella spp., Coccidia, etc.; Produciendo un cuadro de enfermedad respiratoria severa denominado complejo respiratorio bovino, que es uno de los problemas causantes de grandes perdidas económicas en el mundo. (Fulton *et al*, 2000)

2.4. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS.

Ambos biotipos del VDVB muestran un amplio tropismo celular y tienen una especial predilección por las células del sistema inmune incluyendo linfocitos B, T y macrófagos (López *et al*, 1993; Yu *et al*, 1996)

La respuesta inmune desarrollada luego de la exposición al virus es dirigida contra todas las proteínas estructurales y no estructurales del virus, siendo la proteína E2 la más importante en la inducción de los anticuerpos protectores o neutralizantes (Donis *et al*, 1995).

La respuesta inmune celular contra el VDVB no esta muy bien elucidada. Estudios realizados indican que de toda la población de células T, las células CD4+, pero no de las células CD8+, son las principales responsables de la inmunidad protectiva contra el VDVB (Howard *et al*, 1992; Rhodes *et al*, 1991). Sin embargo un estudio realizado in vitro describe una respuesta virus especifico de las células T CD4+ y CD8+ en animales seropositivos, lo que al parecer refuerza el concepto de que la respuesta antiviral de las células T comprenden células CD8+, capaces de actuar como efectoras contra células infectadas, y las células CD4+, que pueden proporcionar ayuda para la

producción de anticuerpos neutralizantes capaces de limitar la diseminación del virus (Rhodes *et al*, 1999).

La persistencia del VDVB en el ganado es una consecuencia especifica de la inmunotolerancia de los linfocitos B y linfocitos T frente al antígeno del VDVB (Larson y Fossum, 1992). Los anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes contra el VDVB están ausentes en esos animales PI; pero estos animales son Inmunocompetentes a otros antígenos incluso a otras cepas del VDVB.

2.5. DIAGNOSTICO

No existen signos clínicos patognomónicos en una infección con el VDVB en el ganado. Por lo tanto, el diagnóstico esta basado en las confirmaciones en laboratorio mediante el aislamiento del virus, detección de antigenos virales o detección de ácido nucleico y detección de anticuerpos contra el virus.

Los animales PI pueden ser identificados por el uso combinado de pruebas serológicas y pruebas de identificación viral o en muestras de sangre.

2.5.1. Aislamiento viral en cultivo celular.

El aislamiento viral es la prueba estándar y tiene alta especificidad, pero es costoso, muy laborioso, requiere muchos días obtener el resultado y es dependiente de cultivo de células. El aislamiento viral puede realizarse a través de muestra de secreciones y tejidos fetales o sangre entera (Sandvik, 1999).

Es fundamental garantizar que las líneas celulares utilizadas, que pueden ser de riñón, pulmón o cornete nasal de feto bovino, sean libres del VDVB (Bolin *et al*, 1994); a su vez el suero fetal bovino utilizado debe ser libre no solo del VDVB, sino también de anticuerpos neutralizantes (Edwards, 1993).

2.5.2. Detección de antígeno virales.

2.5.2.1. Inmunoperoxidasa.

Es una prueba inmunohistoquímica rápida para detectar antígenos virales en muestras de tejido fresco o fijado en formalina. Esta prueba es: similar a la IF, pero en este caso el anticuerpo monoclonal o policlonal esta marcado a una enzima como la peroxidasa. Esta técnica no requiere de microscopio de florescencia.

2.5.2.2. Inmunofluorescencia.

Es una prueba inmunohistoquímica rápida para detectar antígeno viral en muestras de tejido fresco mediante el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales contra el VDVB marcados con fluorocromos.

2.5.2.3. ELISA de captura de antígenos.

La prueba de ELISA de captura de antígenos, esta basada en la detección de antígenos a través de anticuerpos monoclonales (Mabs). Debido a que los Mabs utilizados Reconocen la p125, debe ser capaz de detectar muchas sino todas, las cepas del VDVB. La rapidez y su independencia de cultivos celulares han hecho de esta prueba una herramienta muy útil para el examen de grandes cantidades de muestras en programas de control. La prueba utiliza dos grupos de anticuerpos monoclonales, los cuales reconocen diferentes epítopes conservados en el polipéptido no estructural 125K/80K del virus, uno de ellos esta pegado a los hoyos de la microplaca, los cuales capturan al antígeno viral de las muestras, el antígeno capturado es detectado por el otro Mabs conjugado con una peroxidasa. La presencia de color seguida de la adición del sustrato de la enzima identifica muestras positivas (Sandvik, 1999).

2.5.3. Detección de anticuerpos

2.5.3.1. Virus neutralización.

La prueba de virus neutralización es altamente especifica para detectar el VDVB, aceptada mundialmente como referencial para anticuerpos contra el VDVB (Edwards, 1990); el fundamento de la prueba radica en la capacidad de los anticuerpos para neutralizar la citopatogenicidad o la capacidad del virus de infectar a las células en vivo o in Vitro (Rivera *et al*, 1993).

Esta técnica es cualitativa y permite detectar y titular anticuerpos, la titulación de anticuerpos es de gran utilidad, ya que permite evaluar la respuesta inmune luego de una vacunación y además determinar la antigüedad de una exposición de campo. Sin embargo, existen varias condiciones que pueden afectar el resultado de la prueba: el biotipo del virus, línea celular, y medio para el cultivo celular, además de la performance de la prueba (Fredriksen *et al*, 1999; Edwards, 1990; Brock, 1995).

2.5.3.2. Inmunoabsorvancia ligada a enzimas (ELISA)

Estas pruebas son muy utilizadas debido a su independencia de cultivos celulares, pueden ser aplicados en muestras de leche, plasma y suero, es factible tener el resultado en pocas horas, y es posible su automatización (Niskanen *et al*, 1989; Sandvik, 1999). Los ELISAs pueden ser indirecta o de competición o de bloqueo utilizadas como pruebas tamiz en estudios epidemiológicos y en los programas de erradicación de enfermedades en grandes poblaciones. (Kramps *et al*, 1999).

2.5.4. Detección del ácido nucleico viral.

Los avances que se han producido en biología molecular han contribuido al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico altamente sensibles. Técnicas de DNA recombinante se aplican para la detección rápida de ácidos nucleicos víricos. La reacción en cadena por la polimerasa (PCR), es altamente sensible al virus de la diarrea viral bovina (VDVB) (Njaa *et al*, 2000), es un método

usado para la amplificación selectiva in vitro de una región particular del genoma viral. Estas moléculas sintéticas pueden ser utilizadas como componente de un DNA recombinante o como sonda en un test de hibridación. El principio de esta técnica es que moléculas de ácido nucleico marcadas, conocidas como sondas, se unen específicamente a las secuencias complementarias del ácido nucleico que se investiga, en este caso el cDNA del VDVB. Debido a la complementariedad entre la sonda y el ácido nucleico vírico, esta unión es específica. El diagnóstico por PCR del VDVB, se hace sobre órganos homogeneizados (enfermedad aguda) o suero (infección persistente). En el caso de la DVB, el RNA vírico debe ser purificado y trascrito a DNA complementario (cDNA), mediante una enzima transcriptasa reversa (Pellerin *et al*, 1994; Van Oirschot, 1999).

2.6. CONTROL Y PREVENCIÓN

Un programa de prevención, control o erradicación de una enfermedad puede adoptar distintas estrategias que van a variar de a cuerdo a la situación inicial de la explotación, pero apoyadas en tres pilares fundamentales que son: las medidas de bioseguridad, identificación y remoción de los animales PI y vacunación contra VDVB en el hato (Muñoz-Zanzi *et al*, 2000; Ames y Baker, 1990; Bitsch y Ronsholt, J 995).

Bíoseguridad, la implementación de medidas de bioseguridad está dirigida a evitar el ingreso del VDVB, así como su difusión dentro del hato, a través del control estricto de todos los animales que se incorporan, los cuáles deben ser seronegativos al virus antes y después de la cuarentena estricta, evitar el contacto directo o indirecto con otros hatos, evitar el servicio con semen sin certificación de ser libre de la enfermedad.

Identificación y eliminación de animales PI, estrategia indispensable por la importancia epidemiológica de estos animales.

Inmunización con vacunas de virus muertos o modificado, con el objetivo de prevenir la infección congénita, así como para evitar las infecciones

postnatales (Van Oirschot *et al*, 1999).

El conocimiento detallado de la epidemiología de la DVB y del comportamiento de las pruebas diagnósticas en uso es esencial para la identificación de animales virémicos (animales PI y animales con infección aguda), que son la fuente mas importante de diseminación viral en hatos afectados (Sandvik, 1999).

2.6.1. Vacunas:

Las evaluaciones realizadas a las vacunas existentes dieron resultados muy variados, tanto para la infección postnatal como para la infección prenatal (Van Oirschot *et al*, 1999). Una complicación para el desarrollo de las vacunas contra el VDVB es la diversidad antigénica. La tendencia es identificar la mayor cantidad de variantes antigénica e incluirlos en la vacuna. Existen en el mercado dos tipos de vacuna:

2.6.1.1. Vacuna a virus vivo modificado.

La vacuna a virus vivo modificado contra la DVB, está asociada a una gran variedad de: efectos adversos tales como la inducción de la enfermedad de las mucosas (MD), infección fetal e inmunosupresión, pueden potenciar infecciones recurrentes, resultando en un incremento en la incidencia de enfermedades respiratorias (Potgieter, 1995; Van Oirschot *et al*, 1999)

Existen más de 140 vacunas; autorizadas en USA todas satisfacen requerimientos como pureza, potencia, y seguridad; garantizando una respuesta inmune libres de agentes extraños. La vacuna a virus vivo modificado (MLV), usualmente contiene un solo biotipo de virus de la DVB citopatogénico. Los biotipos citopáticos usados comúnmente son VDVBNADL, VDVB- Singer, VDVB-C24V (Bolin.1995)

Las ventajas de uso de una vacuna MLV para controlar la DVB radican en que estas estimulan una rápida respuesta inmune y la protección se

establece muy fácilmente dentro de 3 semanas post vacunación, se detecta anticuerpos en suero y ya neutraliza al VDVB. La duración de los anticuerpos en suero post vacunación con MLV, es similar a la provocada por infección natural, permaneciendo en esto en altos niveles por más de un año y persisten por varios años. Sin embargo, en algunos animales los anticuerpos neutralizantes contra el VDVB desaparecen dentro de dos años post vacunación (Balín, 1995). Además de ser menos costosas.

Las desventajas asociadas a MLV, están asociadas al fracaso en la inmunización por Falla en el almacenamiento o manipulación lo Cual puede provocar una enfermedad postnatal producto de la reactivación de la virulencia del virus vacunad; además, existe el riesgo de contaminación de las líneas celulares y suero fetal bovino utilizados en la producción de las vacunas con VDVB cito patogénico. Estas fallas están asociadas con enfermedad de las mucosas y fracasos reproductivos asociados al virus vacunad. La enfermedad de: las mucosas ocurren 1 a 4 semanas post vacunación (Bolin, 1995). Por ello, la vacuna MLV no es recomendado para hembras preñadas. Pueden ocasionar aborto.

La inmunosupresión; y la recombinación genética son otros potenciales problemas asociados con vacunas MLV.

2.6.1.2. Vacuna Inactivada

Las ventajas del uso de este tipo de vacunas esta relacionada a las desventajas del uso de las vacunas MLV; sin embargo las desventajas de este tipo de vacuna inactivada está relacionada con la necesidad de usar 2 dosis de vacuna y esto a su vez retrasa el tiempo necesario para que se establezca una inmunidad protectiva. (Bolín. 1995), a su vez, la duración de inmunidad inducida es corta. (Van Oirschot. 1999).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en doce hatos lecheros de crianza intensiva del Valle de Lima, ubicados en las localidades de Huaral (2), Huacho (1), Chancay (2), Carabayllo (2), Puente Piedra (2), Lurin (1) y Cañete (2). Los que fueron agrupados según su ubicación en el valle en zona sur, centro y norte (Cuadro 1).

3.2 ANIMALES

Todos los hatos no cuentan con un programa de vacunación contra el virus de la diarrea viral bovina por lo menos desde hace cinco años atrás, que era la única condición para que estos fueran incluidos en el estudio.

Se muestrearon bovinos hembras mayores de seis meses, sin importar el estado productivo o reproductivo en que se encontraban.

Cuadro 1. Ubicación de los establos lecheros considerados en el estudio.2002.

Zona	Establo	Población	Ubicación
Norte	A	300	Chancay
	B	250	Chancay
	C	450	Huaral
	D	75	Huaral
	E	780	Huacho
Centro	F	140	Carabayllo
	G	451	Carabayllo
	H	230	Puente Piedra
	I	325	Puente Piedra
	J	220	Lurín
Sur			
	K	586	Cañete
	L	480	Cañete

3.3. MATERIALES

3.3.1. Equipos y otros materiales

Se utilizaron agujas descartables, tubos al vacío (sistema vacutainers) sin anticoagulante, viales, pipetas serológicas, frascos de cultivo celular descartables, micropipetas simples y multicanales, microplacas para cultivo celular de 96 pocillos, portapipetas, tips, frascos de 100,250 y 500 ml, beakers, palcas petri, probetas, congeladora de -80^0 C (Revco), cabina de flujo laminar tipo II (Steril Gardhood), Vortex mixer (Stuart Scientific), estufa de C02 (Memmert), centrífuga (Selecta), estufa (Gallehamp), microscopio invertido (Leitz Wetzlar).

3.3.2. Reactivos

Medio de cultivo Eagle Minimal Esencial Médium (MEM) y Leibovitz (L-15) en la misma proporción, antibióticos y antimicóticos, suero fetal bovino (Sigma, USA), tripsina, agua tridestilada, sueros positivos y negativos a DVB de referencia (Holanda).

3.3.3. 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. Las células fueron cultivadas empleando medios de cultivos arriba indicados así como antibióticos y antimicóticos.

3.3.4. Cepa del VDVB

Se utilizo la cepa Singer, prototipo del biotipo CP, genotipo I procedente de USA, con un título de $10^{-5}DI_{50}$cc/50 ul.

3.4. TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de muestra se calculó mediante el método de muestreo al azar simple, tomándose como referencia para el cálculo una prevalencia de 72% (Contreras, 2000), un nivel de confianza de 95% y una precisión de 5%, mediante la siguiente formula (Daniel 1996):

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

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%).

Siendo 310 el número mínimo de muestras, las que fueron estratificadas de acuerdo a la población de cada establo (Cuadro 1), mediante la formula:

$$nh = \frac{Nh}{N} n$$

Donde:

nh: tamaño de muestra de cada establo.
Nh: población de cada establo.
N : población total
n: muestra calculada (310)

Cuadro 2. Número de animales muestreados por establos en estudio. 2002.

Establo	**Número de Animales**	**Muestra estratificada**
A	300	22
B	250	18
C	450	33
D	75	5
E	780	56
F	140	10
G	451	33
H	230	17
I	325	24
J	220	16
K	586	42
L	480	35
Total	4287	311

3.5. METODOS

3.5.1. Obtención de muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena yugular, utilizando el sistema vacutainers. Las muestras de suero fueron trasvasadas a viales y almacenadas en congelación en el laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria.

3.5.2. Detección de anticuerpos neutralizantes contra el VDVB

La detección y titulación de los anticuerpos contra el VDVB fueron realizados mediante la prueba de neutralización viral, siguiendo el protocolo disponible en el laboratorio de virología, brevemente este consistió:

1. Se inactivaron los sueros en baño maría a 56°C por 30 minutos.
2. Se colocó 50 ul de diluyente (MEM+ antibiótico) en una microplaca de 96 hoyos para cultivo celular.
3. Se añadió 50 ul de suero en la primera hilera de la mícroplaca (12 sueros diferentes).
4. Con una micropipeta multicanal se realizó diluciones dobles empezando por 1:2 hasta 1:256.
5. Se añadió a toda la microplaca 50 ul de VDVB conteniendo 100 DI_{50} cc/50 ul.
6. En parte de la placa se realizó los controles de 100, 10 y 1 dosis infectiva del virus y de las células CNB utilizadas.
7. Se incubó en estufa a 37°C por 1 hora .
8. Cumplido este tiempo se añadió a toda la microplaca 100 ul de una suspensión de células de CNB (3x 10^5/ hoyo) y se incubo en estufa a 37ºC y 5%) de $C0_2$ por 4 días luego del cual se hizo la lectura.

Interpretación

Un suero fue considerado positivo a anticuerpos contra el VDVB si era capaz de neutralizar 75 a 100 % de la capacidad infectante del virus en cultivo celular, manifestado por ausencia del efecto citopático en las células indicadoras. Y fue considerado negativo si no neutraliza la capacidad infectante del virus, observándose el efecto citopático.

3.6. ANÁLISIS DE DATOS

a) Prevalencia

La seroprevalencia se determinó en forma porcentual según la fórmula descrita por Thrusfield, 1990:

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

La prevalencia fue expresada en forma porcentual, indicando el intervalo de confianza (IC) de 95% según la formula:

$$p \pm Z \sqrt{pq / n}$$

En donde:

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

IV. RESULTADOS

El 56 ± 5.5% (174/311) de las muestras de suero tuvieron anticuerpos contra el VDVB. De los 12 hatos muestreados 7 tuvieron animales seroreactores al VDVB, con prevalencias de 12.1 a 100% (Cuadro 3).

Animales seroreactores al virus fueron detectados en los establos muestreados de todas las zonas del valle de Lima, y el mayor porcentaje de hatos con animales seroreactores fue observado en la zona sur con 97.4% (Cuadro 4).

El virus tuvo mayor prevalencia en animales mayores a 2 años de edad (Cuadro 5) y los títulos de anticuerpos neutralizantes estuvieron en un rango de 2 a >256 (Cuadro 6).

Cuadro 3. Seroprevalencia del VDVB en bovinos lecheros de 12 hatos del valle de Lima. 2002.

Establo	Nº animales muestreados	Animales con anticuerpos contra el VDVB	
		Nº	%
A	22	0	0
B	18	0	0
C	33	4	12.12
D	5	0	0
E	56	56	100
F	10	0	0
G	33	15	45.45
H	17	0	0
I	24	8	33.33
J	16	16	100
K	42	42	100
L	35	33	94.28
TOTAL	**311**	**174**	**56.0 ± 5.5**

Cuadro 4. Seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina según zona de procedencia de los animales muestreados. 2002.

Zona	Nº animales muestreados	Animales con anticuerpos contra el VDVB	
		Nº	%
Norte	134	60	44.8 ± 8.4
Centro	100	39	39.0 ± 9.6
Sur	77	75	97.4 ± 3.6
Total	**311**	**174**	**56.0 ± 5.5**

Cuadro 5.Seroprevalencia de la diarrea viral bovina según edad de los animales muestreados. 2002.

Edad	Nº	Positivos a anticuerpos contra VDVB	
		Nº	%
< 2 años	53	18	33.9 ± 12.8
> 2 años	258	156	60.5 ± 6.0

Cuadro 6. Distribución de los títulos de anticuerpos contra el VDVB en los animales muestreados según zona de ubicación. 2002.

Procedencia	Inversa de la dilución del suero			
	< 2	**2 – 8**	**16 – 64**	**128 - >256**
Norte	74	4	50	6
Centro	61	0	22	17
Sur	2	9	49	17
Total	**137**	**13**	**121**	**40**

V. DISCUSIÓN

La detección de anticuerpos contra el VDVB en el 56.0 ± 5.5% de los animales productores de leche sin historia de vacunación, en los doce hatos muestreados significó una evidente exposición de los animales con el virus de campo. Los resultados también indican que si bien el virus estuvo distribuido en la población bovina a lo largo del valle de Lima, hubieron hatos con ausencia de animales seroreactores (Cuadro 3).

El 58% (7/12) de los hatos muestreados tuvieron animales seroreactores en rangos de 12.1 a 100%. Las informaciones obtenidas de los propietarios o responsables de los hatos y datos de los registros sanitarios no mostraron signos de la enfermedad clínica de la DVB, pero los problemas reproductivos y respiratorios estuvieron presentes indicando que la infección fue predominantemente de tipo subclínica, pero la silenciosa distribución del virus en los animales podría haber sido una de las causas de los problemas reproductivos. Un animal con infección aguda o subclínica presenta viremia entre 4to a 5to día después de la infección y puede persistir hasta por más de 15 días durante este tiempo el virus es eliminado en las secreciones y excreciones constituyendo una fuente de infección para el resto de animales susceptibles (Houe, 1999; Baker, 1995), en una población numerosa y de crianza intensiva el virus tiene mayor oportunidad para infectar a los animales susceptibles, situación que podría estar ocurriendo en los hatos donde se

detectaron altas prevalencias de la infección.

Rivera *et al.* (2002), Reportaron que el 20,6% (6/29) de fetos abortados de muchos de estos establos tuvieron antígeno del VDVB, y que el 69% de las vacas que abortaron tuvieron anticuerpos contra VDVB, si bien estos datos no son concluyentes del rol del VDVB como causante de los abortos ya que existen otros agentes como *Neospora caninum*, sugieren que el VDVB al menos en los establos donde es altamente prevalente es un componente del complejo reproductivo y respiratorio.

La no detección de la infección viral en hatos ubicados en zonas como Puente Piedra indica que el virus puede haber tenido una muy baja prevalencia por lo que no fue detectado en los animales muestreados o que estos hatos cuentan con un buen sistema de bioseguridad manteniendo el hato cerrado y por lo tanto menor oportunidad de ingreso del virus. La aparente existencia de hatos libres de la infección sugiere que es posible el control de la DVB e incluso su erradicación basado en la eliminación de animales portadores y de estrictas medidas de bioseguridad, sin embargo debe tenerse presente la existencia de un alto riesgo debido a la falta de uniformidad en el manejo de cada hato de la zona.

La distribución de la prevalencia viral es similar en los hatos infectados de la zona norte y centro con 44,8 y 39,0 % respectivamente (Cuadro 4). En la zona sur la prevalencia fue de 97,4%, sin embargo el número de establos muestreados lo hace estadísticamente no significativo, Cañete es una zona ganadera por lo que se debería continuar el trabajo en más establos y conocer la real prevalencia de la infección. En los hatos del sur así como en aquellos de mayor población de animales (Cuadros 1 y 3) el virus tuvo una prevalencia de 100% significando que el virus tiene más oportunidad de difundirse dentro del hato ocasionando posiblemente fallas reproductivas. Así mismo, esta alta prevalencia viral sugiere la existencia de animales portadores del virus. Se menciona que un hato con prevalencias entre 40 a > de 70 % tiene grandes posibilidades de tener al menos un animal portador, animales que eliminan

grandes cantidades de virus en sus secreciones y excreciones pudiendo transmitir a todos los animales susceptibles del hato mientras vive (Houe, 1995; Schreiber *et al*, 1999; Houe, 2003). Estos conceptos han sido demostrados en hatos de crianza intensiva y semi extensiva de cuencas lecheras como el valle de Lima, el Mantaro y Arequipa (Rivera *et al.*, 2002; Chacón *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 2002).

En relación a la prevalencia viral por edad de los animales muestreados se determino que e virus fue mas prevalente en los animales mayores (Cuadro 5) indicando que estos animales tuvieron mayor oportunidad de infección y que los anticuerpos neutralizantes inducidos por virus de campo permanece por mucho tiempo y algunos científicos mencionan que permanece por toda la vida del animal (Rufenacht *et al.*, 2000; Fredriksen *et al.*, 1999). Este hallazgo no puede ser analizado estadísticamente por la diferencia en el número de animales.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes detectados estuvieron en un rango de 2 a mayores a 256 (Cuadro 6). Los títulos mayores a 256 detectado en el 12,86% de las muestras podrían indicar infecciones recientes o quizás nuevos desafíos, la respuesta humoral frente a la infección por el VDVB en un animal susceptible inmunocompetente puede ser detectado entre la 2da a 4ta semana después de la infección (Baker, 1995). Se menciona que los anticuerpos contra el VDVB pueden durar por muchos años (Fredriksen *et al.*, 1999) pero no existen datos de la curva de anticuerpos a lo largo de la vida del animal, si un animal no recibe nuevos desafíos posiblemente la curva de los anticuerpos descienda, la persistencia de altos títulos de anticuerpos podría significar reinfecciones o infecciones recientes.

VI. CONCLUSIONES

El virus de la diarrea viral bovina esta difundido en el ganado productor de leche del valle de Lima, con prevalencias que variaron de hato en hato.

Existen hatos lecheros libres del VDVB o que sus prevalencias son muy bajas por lo que no fue detectado.

VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Ames, T. Y J. Baker. 1990. Management practices and vaccination program that help control BVD virus infection. In: Symposium on BVD. Vet Med Get: 15-24.
2. Baker, J. 1987. Bovine Viral Diarrhea Virus: A Review. JAVMA 190 (11): 1449 - 1458.
3. Baker, J. 1995. The Clinical Manifestation of Bovine Viral Diarrhea infection. In BVD virus. Vet Clin North Am Food Anim Practice 11(3): 425-445.
4. Bitsh, V. y L. Ronsholt. 1995. Control of bovine viral diarrhea virus infection without vaccines. Vet Clin North Am Food Animal Practice 11(3): 627-640.
5. Bock, R.E., B.J., Rodwell, y M. McGowan. 1997. Detection of calves persistently infected with bovine pestivirus in a sample of dairy calves in South- Easten Queensland. Aust Vet J 75 (9): 656-659
6. Bolin, S.R., J. Ridpath. J. Black. 1994 Survey of cell line in the American Tipe Culture Collection for bovine viral diarrhea virus. J Virol Methods 48: 211.
7. Bolin, S.R., 1995. The pathogenesis of mucosal disease. In: Bovine viral

diarrhea virus. Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice 11 (3): 489-500.

8. Brock, K.V., D. Reedman, M. Vickers, and N. Irvine. 1991. Quantification of bovine viral diarrhea virus in Embryo Transfer Flush Fluids collected from a persistently infected heifer. J. Vet Diagn Invest 3:99-100.
9. Brock, K. V. 1995. Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. Vet Clin. North. Am Food Anim Practice 11:549-561
10. Brownlie, J., 1991. The pathways for bovine virus diarrhea virus biotypes in the pathogenesis of disease. Arch. Virol 3:79-96
11. Brownlie, J., L.B. Hooper, I. Thompson y M.E. Collins. 1997. Expression of noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus (BVDV) in oocytes and follicles of persistently infected cattle. Vet Record. 141:335-337.
12. Brownlie, J., L.B. Hooper. L. Thompson y M.E. Collins. 1998, maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhea virus (BVDV) – the bovine pesitivirus: Clin and Diag Virol: 141-150.
13. Bruschek, C.J.M., P. Van Rijn, R. Moormann and J. Van Oirschot. 1996 Antigenically different pestivirus strains induce congenital infection in sheep: a model for bovine virus diarrhea virus vaccine efficacy studies. Vet Mircobiol 50:33-43
14. Bruschke, C.J.M., P. Van Rijn, R. Moormann and J. Van Oirschot. 1997. Glycoprotein Erns of pesitivirus induces apoptosis in lymphocytes of several species. J. Virol 71:6692-6696
15. Chacón, J.; A. Benito; H. Rivera. 2002. Detección de animales portadores del virus de la diarrea viral bovina en un establo vacunado y en otro sin vacunar del valle de Lima. Rev. Acad. Peru. Cienc. Vet. 3: 14-23.
16. Collectt, M.S., R. Larson; C. Gold; D. Strick; D. Anderson and A. Purchio. 1988. Molecular cloning and nucleotide and sequence of the pesitivirus bovine viral diarrhea virus. Virol 165:191-199.
17. Collectt, M.S. 1992. Molecular Genetics of Pestiviruses. Comp. Inmunol Infect Dis 15:145-154
18. Contreras, G.; K. Stáhl; C. Arana; H. Rivera. 2000. Anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en muestras de leche de bovinos del valle

del Mantaro. Rev. Inv. Vet. Perú 11: 58-65.

19. Donis, R. 1995. Molecular Biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. In: Bovine viral diarrhea virus. Veterinary Clinics of North America; Food Animal Practice 11(3): 393-423
20. Edwards S. 1990. The diagnosis of bovine viral diarrhea-mucosal disease in cattle Rev Sci Tech Offint Epiz 9: 115-130
21. Fredriksen, B., T. Sandvik, T. Loken y S.A. Odegaard 1999. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhea virus. Vet Record 144:111-114.
22. Fulton, R.W., C. W. Purdy, A.W. Confer, J.T. Sliki, R.W. Loan, R.E. Briggs y L.J. Burge. 2000. 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 64:151-1-59.
23. Houe. H. A. Meyling. 1991, Prevalence of Bovine Virus Diarrhea (BVD) in 19 Danish Dairy Herds and Estimation of Incidence of infection in Early pregnancy. Prev. Vet Med. 11:9-16.
24. Houe, H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhea Virus. Vet Clin North Am Food Animal Practice 11(3):521-547
25. Houe, H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhea virus (BVDV) infections. Vet Microbiol 64:89-107.
26. Houe, H. 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. Biologicals 31: 137-143.
27. Howard, C. 1990. Immunological responses to bovine viral diarrhea virus Infections. Rev. Sci. Tech Off Int. Epiz. 9:95-103.
28. Huaman, K. 2001. Detección de animales portadores del virus de la diarrea viral bovina en un hato lechero del valle del Mantaro. Tesis Bach Fac Med Vent Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Perú. 47 p.
29. Kirkland, P.D., M. McGowan; S. Mackintosh. 1992. Factors influencing the development of persistent infection of cattle with pestiviruses. Proc. Symp. Pestiviruses Eur Scc virol 2:117-121.
30. Kirkland, P.D., S. Macintosh and Moyle, 1994, the outcome of widespread use of seaman from a bull persistently infected with

pestivirus. Vet. Rec. 135:527-529.

31. Kobrak, A. y E.L. Weber. 1997. Bovine diarrhea virus: and update. Rev Argent MicrobioI 29(1):47-61.
32. Kramps J.A., C.Maanen, G.Van de Wetering y G. Stendas. 1999. A simple, rapid and reliable enzyme linked immunosorbent assay for detection of bovine virus diarrhea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. Vet Microbiol 64:135-144.
33. Kummerer, B., y G. Meyers. 2000 Correlation between point mutations in NS2 and viability and citopathogenicity of bovine viral diarrhea virus strain Oregon analyzed with an infectious Cdna CLONE. J. Virol74:390-400
34. Larsson, B. And. C. Fossum. 1992. Bovine virus diarrhea virus induces in viro o proliferative response of peripheral blood mononuclear cells from cattle immunized by infection. Vet Microbiol 31:317-325
35. Meyers G. N. Tautz. 1992. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. J. Virol. 191:368.
36. Morales, S.; A. Benito; H. Rivera. 2002. Terneros persistentemente infectados con el virus de la diarrea viral bovina en dos hatos lecheros de la provincia de Arequipa. Rev. Acad. Peru. Cienc. Vet. 3: 8-13.
37. Muñoz-Zanzi, C., W.-Johnson; M. Thurmond; S. Hietala 2000. Pool. – SAMPLE testing as herd – Screaning tool for Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus Persistently Infected Cattle. J. Vet Diagn Invest. 1:195-203.
38. Murphy, F., C. Fauquest; H. Bishop; S. Ghabrialk; G. Martelli; M. Mayo; M. Summers. 1995. Flaviviridae, Virus taxonomy. Springer, New York, pp. 415-427.
39. Niskaenen, R., S. Alenius; B. Larson; S. Jacombsson. 1991. Determination of level of antibodies to bovine viral diarrhea virus in bulk tank milk as a tool on the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds. Arch Virol Suppl 3: 245-251.
40. Njaa. B.; E. Clarck: E. Jansen; J. Ellis; D. Haines. 2000. Diagnosis of Persistent Bovine Viral Diarrhea Virus infection of Immunohistochemical Staining of Formalin – Fixed Skin Biopsy Specimens. J. Vet Diagn Invest

12:393-399.

41. Obando R., César. 1999. Emphasis on Diagnosis and Concomitant Infections with other Viruses of the Bovine Respiratory Disease Complex. Swedish UNIVERSITY OF agricultural Sciences.
42. Paton, D.J. 1995. Pestivirus diversity. J comp. Path. 112:215-236
43. Pellerin C., J. Vandenhurk; J. Lecomte and P. Tijssen. 1994. Identification of outbreaks and highs mortalities. J. Virol 203:260-268.
44. Potgieter, L. 1995. Immunology of bovine viral diarrhea virus. Vet Clin North Am Food Animal Practice. 11(3):501-520.
45. Rhoedes, S., J.M. Cocksedge; A. Collins y W.I. Morrison. 199 Differential cytokine responses of CD4+ANDCD8+Tcells in response to bovine viral diarrhea virus in cattle. J. Gen. Virol 80:1673-1679.
46. Ridpath, J.F., J.D. Nelly, M. Frey y J.G. Landgraf 2000. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 bvdv from North America. Vet Microbiol. 77:145-155.
47. Rivera, H., A. Manchego, M. Sandoval, A. Vargas, Araujo, A. Gonzáles y R. ROSADIO. 1993. Aborto infeccioso en bovino de leche del valle de Lima. Rev. Inv pec IVITA(PERÚ), 6(1):31-37
48. Rivera, H. 2001. Causas frecuentes de aborto bovino. Rev. Inv. Vet. Perú 12: 117- 122.
49. Rivera, H.; K. Huamán; A. Benito; A. Díaz; C. Arana. 2003. Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina y animales portadores del virus en un hato lechero del valle del Mantaro. Rev. Acad. Peru. Cienc. Vet. 3: 1-7.
50. Sandvik, T. 1999. Laboratoy diagnostic investigations for bovine viral diarrhea virus infections in cattle. Vet Microbiol. 64:123-134.
51. Sanjuan M.I., c. García y Corrales. 1999. Etiopatogenia de la diarrea viral bovina: aspectos de interés. En: E. Yus y M.L. Sanjuán. Eds. Diarrea virica bovina: Consejo General de Medicos Veterinarios de España. 24:9-24.
52. Schreiber, P.; F. Dreze; N. Lacroix; B. Limbourg; P. Coppe. 1999. Prevalence of bovine virus diarrhea virus infection in Belgian white blue cattle in Southern Belgium. Vet. Quart. 21: 28-32.
53. Tautz. N., E. Thiel; J. Dubobi ; G. Meyers 1994. Pathogenesis of mucosal

disease: a citophagenic pestivirus generated by an internal deletion. J. Virol 68:3289.

54. Thursfield, M. 1990. Epidemiología Veterinaria, Editorial Acribia, España pag 42.

55. Travén, M., S. Alenius; C. Fossum; B. Larsson. 1991. Primary bovine viral diarrhea virus infection in calves following direct contact with a persistently viraemic calf. J. Vet. Med. 38:435-462.

56. Van Oirschot, J.T.; CJM Bruschkne y P.A. Van Rijn 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea. Vet Microbiol 64:169-183.

57. Vanroose, G.H. Nauwinck; A. VAN Soom; E. Vanopdenbosch; A. de Kruif 1998. Replication of Cytopathic and Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus in zone – Free and Zone – Intact in Vitro – Produced Bovine Embryos and the Effect on Embryo Quality, Biology of reproduction. 58:857-866.

58. Vega, S.R. Rosell; J. Paton; J. Orden; R. De la Puente, 2000 Antigenic characterization of bovine viral diarrhea virus isolates from Spain with of monoclonal antibodies. J. Vet Med 47:701-706.

59. Vilceck, S.J. Greiser-Wilke; p. Nettleton; D. Paton. 2000. Cellular Insertions in the NS2-3 genome region of cytopathic bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates. Vet Microbiol 77:129-136.