

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Fundada en 1551**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

# **Detección de Terneros con Infección Congenita con el Virus de la Diarrea Viral Bovina en dos Hatos Lecheros de la Provincia de Arequipa**

TESIS para obtener el Título Profesional de: MÉDICO VETERINARIO

AUTOR:

**SIEVER MIGUEL MORALES CAUTI**

**LIMA – PERÚ 2002**

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo identificar terneros con infección congénita con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), en dos establos lecheros de crianza intensiva ubicados en las irrigaciones de Santa Rita de Sigwas (Establo A) y Vitor (Establo B) de la cuenca lechera de Arequipa mediante la detección del VDVB en la sangre de los terneros a través de la prueba de ELISA de captura de antígeno. Con esta finalidad se obtuvieron muestras de sangre con anticoagulante de terneros de los establos A (n = 36) y B (n = 95) poco después de nacer y antes que tomen el calostro. El 0.76% (1/131) con IC mínimo 0.24 y máximo 3.5% de los terneros muestreados resulto ser un ternero con infección congénita o persistentemente infectado (PI) con el VDVB. El ternero PI fue detectado en el establo A indicando que la prevalencia de animales PI en este establo fue de 2.78% (1/36). De los 36 terneros nacidos en el establo A, 17 fueron hembras y el ternero PI perteneció a este grupo significando que la prevalencia de este grupo de hembras fue de 5.88% (1/17). No se detecto terneros PI en el establo B, pese a haber muestreados mayor numero de terneros. Los resultados del presente estudio indican que existen animales PI en algunos establos de crianza intensiva de una irrigación de la cuenca de Arequipa y que estos terneros pueden ser detectados al momento de nacer.

**Palabras claves:** bovinos, terneros, virus de la diarrea viral bovina (VDVB), infección persistente (PI), ELISA de captura de antígenos

## SUMMARY

The objective of the present study was to identify congenital infected calves with the bovine viral diarrhea virus (BVDV) in two herds of intensive production located in the irrigation's of Santa Rita of Sigüas (Herds A) and Vitor (Herds B) of the valley of Arequipa. The BVDV was detected using the test of ELISA of antigen capture. Samples of blood with anticoagulant were obtained of calves of the herd A (n=36) and B (n=95) after birth and before they take the calostro. The 0.76% (1/131) with IC minimum 0.24 and maximum 3.5% of the calves samples had a congenital infection or persistently infected (PI) with the BVDV. The calf PI was detected in the herd A, which indicates that the prevalence of animal PI in the group females was of 5.88% (1/17). Any calf PI were detected in the herd B, in spite the bigger number of calves sampled. The results of this study indicate that the animal PI to be in some herds of intensive production in valley of Arequipa and that those calves might be detected at the moment of birth.

**Key words:** bovine, calves, bovine viral diarrhea virus (BVDV), persistently infeccions (PI), antigen capture ELISA test.

## I. INTRODUCCION

De los 4 500 000 cabezas de ganado bovino del país, aproximadamente el 12.5% (550 000) corresponden al ganado lechero distribuido mayormente en las cuencas lecheras de Arequipa, Lima y Cajamarca (Ministerio de Agricultura, 1996), por lo que muchos de los estudios sobre el aspecto sanitario son realizados en los animales de estas cuencas lecheras.

Estudios realizados en la cuenca lechera de Arequipa, indican que algunas enfermedades virales como la Leucosis Bovina, Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) y Diarrea Viral Bovina (DVB) son prevalentes. De estas enfermedades, la DVB se encuentra ampliamente distribuido en los animales lecheros con prevalencias superiores al 50% (Rivera et al, datos por publicarse). Informaciones disponibles también indican que las altas prevalencias de esta enfermedad están asociadas a la existencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), que son animales que adquirieron la infección en la etapa prenatal, y son los portadores del virus (Houe, 1999)

Los animales (PI), usualmente mueren poco después de nacer o durante el primer año de vida debido a diversos problemas como los de tipo respiratorio o entérico ya que estos animales son inmunodeprimidos (Vanroose et al, 1998); sin embargo, muchos llegan a la etapa reproductiva y durante este tiempo son los principales diseminadores del virus a través de sus secreciones y

excreciones contaminando a los animales susceptibles (Houe, 1999; Muñoz-Zanzi et al, 2000).

Actualmente, el control de la DVB esta basado en la detección y eliminación de los animales PI a la edad de los 6 meses, significando que durante los 6 meses el animal PI puede estar eliminando el virus permanentemente. Considerando estos conceptos, el objetivo del presente trabajo fue detectar terneros con infección congénita, al momento de nacer y antes de que ingieran el calostro, procedente de dos hatos lecheros del valle de Arequipa mediante la detección del virus de la DVB en muestras de sangre de todos los terneros nacidos durante un periodo de 6 meses.

## II. REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1. CARACTERISTICAS DEL VIRUS

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB), agente causal de la DVB, es miembro del genero Pestivirus, perteneciente a la familia Flaviviridae. (Donis, 1995; 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 ovino respectivamente (Paton, 1995; Murphy et al, 1995; Vega et al, 2000). El VDVB es uno de los principales causantes de las fallas reproductivas y un componente del complejo respiratorio bovino; siendo por tanto, responsable de grandes perdidas económicas en la ganadería lechera mundial (Baker, 1987; Obando, 1999)

#### 2.1.1. Morfología.

El VDVB es de forma esférica de 40 – 60 nanómetros (nm) de diámetro, constituido por una cápside icosaédrica de 25 a 37 nm. de diámetro, de

naturaleza proteica y una envoltura externa. (Kobrak y Weber, 1997; San Juan et al, 1999).

### 2.1.2. Proteínas.

La información genética del virus de la DVB, esta contenida en una molécula de ARN de simple cadena de polaridad positiva, el genoma esta 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 genético 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 del 3', con excepción de la proteína P<sup>20</sup>/N<sup>pro</sup> la cual es codificada por el primer tercio del genoma viral. (Neill y Ridpath, 2001; Potgieter, 1995).

Entre las principales proteínas estructurales y no estructurales que constituyen la partícula viral se tiene:

- ◆ p20/N<sup>pro</sup> , responsable de la proteólisis de la poliproteína producto de la traducción del genoma.
- ◆ E0/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.
- ◆ P14/C, es la proteína mas 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.

- ◆ E2/gp53, es la glicoproteína mas importante del virión y antígeno del serotipo. Esta glicoproteína contiene los epítomos 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).
  
- ◆ P125/ NS23. Es una proteína no estructural indispensable para la multiplicación del virus; es la mas 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 licasa en el extremo de carbono terminal y de proteasa en el extremo amino terminal. Esta presente únicamente en el biotipo citopatogénico del virus (Paton, 1995)

### 2.1.3. Biotipos.

El VDVB, presenta dos biotipos diferenciados por sus efectos en cultivo celular: 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 (Collect et al, 1988), duplicación genética de NS3 (Meyers et al, 1992), delección genética de



la NS2 (Tautz et al, 1994), o simple punto de mutación (Kummerer y Meyers, 2000; Vilcek et al, 2000). En algunos casos incluyen reacomodo genético o recombinaciones con secuencias de ARN celular (Meyers et al, 1992). La mayoría de estos cambios genéticos ocurren en dos posiciones llamadas A y B del genoma (Meyers et al, 1998), la posición A está localizada en la secuencia de ARN que codifica el aminoácido 1535, y la posición B se localiza en la secuencia que codifica el aminoácido 1589 de la proteína viral ambos dentro de la región NS2/3 (Neill y Ridpath, 2001). Reciente información en los eventos de recombinación en el virus citopatogénico de genotipo VDVBII muestran que la mayoría de eventos ocurren primariamente con una transcripción celular simple, y esta recombinación ocurre en la posición A. (Neill y Ridpath, 2001).

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 (PI) (Paton, 1995).

#### 2.1.4. **Genotipos.**

A través de estudios de secuenciamiento genético el VDVB ha sido subdividido en dos genotipos, el tipo 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 y Ic (San Juan et al, 1999)

El genotipo I incluye las cepas de laboratorio y las vacunales: NADL, SINGER, NY-1, C virus, TGAN y Osloss.

El genotipo II esta compuesta por las nuevas cepas asociadas con una alta mortalidad, trombocitopenia 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-1, SY-89 y V/FLL (Ridpath et al, 2000).

#### **2.1.5. Replicación viral.**

El VDVB, presenta un especial tropismo por células mitóticamente activas como: linfocitos, fagocitos mononucleares y células epiteliales (Njaa et al, 2000; Polak y Zmudzinski, 1999; Potgieter, 1995). La replicación comienza con la adhesión y penetración en la célula hospedadora, parece ser que el receptor específico del VDVB es una proteína de superficie de 50kD de las células, por mediación de la E2, el virus ingresa al citoplasma mediante endocitosis mediada y libera su genoma en el citosol, y luego el ARN viral es traducida 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 bs viriones adquieren su envoltura lipídica. Cada célula infectada libera de 100 a 1000 viriones que alcanzan el medio extracelular mediante exocitosis. (Xue et al, 1997; San Juan, 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..

## **2.2. EPIDEMIOLOGIA**

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 pueden causar enfermedad en otros rumiantes y en cerdos. El VDVB tiene una distribución mundial y es responsable de un síndrome que va desde muy benignos a severos, e incluyen la potenciación de otras infecciones, fallas reproductivas (Polak y Zmudzinski,

1999), defectos congénitos, animales PI, infecciones agudas, y una generalmente fatal enfermedad de las mucosas (Njaa et al, 2000; Paton, 1995; Baker, 1987).

### **2.2.1. Fuente de la infección.**

Los animales PI, juegan un rol importante como la fuente principal de diseminación del VDVB, y por ende de la infección (Njaa et al, 2000; Polak y Zmudzinski, 1999). 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, lagrimas y leche (Brock et al, 1991; Houe, 1995; Sandvik, 1999); siendo la prevalencia de los animales PI es de 0.5 – 2.0% (Polak y Zmudzinski, 1999; 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 eliminan 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 o 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 vertical y horizontal; 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).

### **2.2.2.1. *Transmisión vertical.***

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 menciona 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).

### **2.2.2.2. *Transmisión horizontal.***

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 mas importante de transmisión de la infección; presumiblemente, la mas 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 esta 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 vacas, esto está asociado con la eliminación del virus a través de este medio.

### **2.2.3. Epidemiología de los animales persistentemente infectados o portadores del VDVB.**

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 a través de animales persistentemente infectados, 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 especifica, 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 (Sandvick, 1999).

El animal PI es considerado el reservorio o portador mas 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 (Houe, 1999).

La persistencia viral es común en los pestivirus y otros como el virus de coriomeningitis linfocítica del ratón, un arenavirus, es el resultado de la interacción dinámica entre factores del animal y del virus a través de

mecanismos como: infecciones transplacentarias, establecimiento de la inmunotolerancia, replicación en células del sistema inmune, existencia de cepas no citolíticas, inducción de bajos niveles de anticuerpos o anticuerpos de baja afinidad, persistencia viral en los sitios poco accesibles al sistema inmune y variación antigénica e interesantemente, los pestivirus, hacen uso de todos estos mecanismos.

#### **2.2.4. Prevalencia de la diarrea viral bovina.**

Estudios realizados en diferentes países demuestran que la prevalencia del VDVB, se encuentra dentro del 40 – 90% (Niskanen et al, 1991; Houe, 1995; Kirkland, 1994). En el Perú, Contreras, 1999, determino una prevalencia de 72.4% de la DVB, en un estudio realizado en el valle del Mantaro.

En un estudio de 1593 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 de entre 3151 animales y a la prevalencia de un total de 18759 muestras fue 64.9%.(Houe et al, 1995).

En Dinamarca con muestreo al azar, de un total de 1332 muestras colectadas en dos camales, se obtuvo 78% de animales positivos a anticuerpos y 0.9% de los animales fueron positivos al virus de la DVB. Así mismo en un total de 2750 muestras en 19 hatos lecheros, se obtuvieron 37 (1.4%) de animales virémicos; 28 (1.1%) 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 a anticuerpos.

En los Estados Unidos de América se evaluaron 3157 animales de 66 hatos, aproximadamente el 50% de los hatos tenían historia de infección por VDVB, mostrando 1.7% de animales PI, y 89% de animales positivos a anticuerpos. (Houe, 1995)

## **2.3. PATOGÉNESIS.**

La transmisión horizontal del virus es en forma directa, por inhalación de saliva infectada, descarga oculo nasal, vaginal, orina, heces. La transmisión, también puede ocurrir a través de semen de toros infectados en forma aguda o toros 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 Ronsholt, 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 como:

### **2.3.1. Infección subclínica.**

El 70 a 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 o ganadero siendo esto seguido por una producción de anticuerpos neutralizantes (Baker, 1987). En general es raro que el VDVB cause 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).

### **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 monocitos.

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 (Vanroose et al, 1998).

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. (Baker, 1987; Bruscke et al, 1996; Vanroose et al, 1998).

### **2.3.3. Enfermedad de las mucosas.**

La enfermedad de las mucosas, es usualmente de curso fatal y esta asociado con superinfección 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 antigénicamente homologo al biotipo NCP presente en el animal. (Vanroose et al, 1998; Paton 1995). Estos animales desarrollan profusa diarrea, u una rápida pérdida de condición corporal, erosiones a nivel del tracto gastrointestinal, y muerte (Tautz et al, 1994; 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 seronegativos tiene poca importancia; pero si 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 pérdidas económicas en el mundo. (Fulton et al, 2000)

### **2.3.6. Infección persistente.**

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 estas las siguientes características: terneros anormales, nacimientos prematuros, retardo en el crecimiento, y dificultad para la lactación. (Bock et al, 1997).

Algunos mueren dentro de los primeros 6 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.

### **2.3.7. Infección venérea.**

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 caracterizado por el decrecimiento de la motilidad, incremento del porcentaje de anomalías morfológicas de las células espermáticas. (Kirkland et al, 1994; Baker, 1987).

### **2.3.8. Virus de la diarrea viral bovina en terneros recién nacidos.**

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 resulto fue una enfermedad clínica benigna con rápido restablecimiento.

### **2.3.9. Infecciones en hembras gestantes.**

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 en el 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 nacimiento de terneros sanos (Baker, 1995; Hoening y Liess, 1995). Los terneros PI son el resultado de la infección del feto en un momento 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; Brusckhe et al, 1996).

## **2.4. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS.**

La respuesta inmune es dirigida contra todas las proteínas estructurales o no estructurales del virus (Donis et al, 1995). El VDVB induce ambos tipos de respuesta, tanto de células B como de células T (Larsson y Fossum, 1992).

Estudios realizados, indican un mayor rol de las células CD4+, pero no de las células CD8+ , lo cual indica actividad restringida de las células T citotóxicas (Howard et al, 1992; Rhodes et al, 1999). Sin embargo un estudio realizado in vitro describe una respuesta virus específico de las células T CD4+ y CD8+ en animales seropositivos, lo que al parecer refuerza el concepto de que la respuesta anti viral 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 específica de la inmunotolerancia de los linfocitos B y linfocitos T frente al antígeno del VDVB (Larsson 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 diagnostico esta basado en las confirmaciones en laboratorio mediante el aislamiento del virus, detección de antígenos 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.**

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 antígenos virales.**

#### **2.5.2.1. 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.

#### **2.5.2.2. 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 está marcado a una enzima como la peroxidasa. Esta técnica no requiere de microscopio de fluorescencia.

#### **2.5.2.3. ELISA de captura de antígenos.**

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 si no 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 está pegado a los hoyos de la microplaca, los cuales capturan al antígeno viral de las muestras, el antígeno capturado es detectado por el otro Mab 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**

Las pruebas de inmunoabsorción ligada a enzimas ELISA y virus neutralización, son las más comúnmente usadas para la detección de anticuerpos contra el VDVB (Edwards, 1990; Paton et al, 1991; Kramps et al, 1999).

#### **2.5.3.1. Virus neutralización.**

La prueba es altamente específica para detectar el VDVB, aceptada mundialmente como referencial para anticuerpos contra el VDVB (Edwards, 1990); 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).

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 in vivo o in vitro (Rivera et al, 1993). Esta técnica es cualitativa y permite detectar y titular anticuerpos.

### **2.5.3.2. Inmunoabsorvancia ligada a enzimas (ELISA)**

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). 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)

### **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 complementaria 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 transcrito a DNA complementario (cDNA), mediante una enzima transcriptasa reversa (Pellerin et al, 1994; Van Oirschot, 1999)

## 2.6. CONTROL Y PREVENCIÓN

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

Un programa de prevención, control o erradicación de una enfermedad puede adoptar distintas estrategias que van a variar de acuerdo 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, 1995).

- ◆ Bioseguridad, la implementación de medidas de bioseguridad están dirigidas 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 cuales 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 muerto o modificado, con el objetivo de prevenir la infección congénita, así como para evitar las infecciones postnatales (Van Oirschot et al, 1999).

### 2.6.1. Vacunas:

Una complicación para el desarrollo de las vacunas contra el VDVB es la diversidad antigénica. La tendencia es identificar la mayor cantidad de variantes antigénicas e incluirlos en la vacuna. 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).

#### **2.6.1.1. Vacuna a virus vivo modificado.**

La vacuna a virus vivo modificado contra la DVB, esta 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 mas 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 usualmente son VDVB – NADL, VDVB- Singer, VDVB- C24V (Bolin, 1995b).

Las ventajas de uso de una vacuna a virus vivo modificado para controlar la DVB son:

- ◆ La MLV, estimula una rápida respuesta inmune y la protección se establece muy fácilmente dentro de 3 semanas post vacunación, ya se detecta anticuerpos en suero y neutraliza al VDVB.
- ◆ La duración de los anticuerpos en sueros post vacunación con MLV, es similar a la provocada por infección natural, permaneciendo en esto en altos niveles por mas 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 (Bolin, 1995)
- ◆ Son 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



vacunal; además, existe el riesgo de contaminación de las líneas celulares y suero fetal bovino utilizados en la producción de las vacunas con VDVB nocitopatogénico.

- ◆ Estas fallas están asociadas con enfermedad de las mucosas y fracasos reproductivos asociados al virus vacunal. La enfermedad de las mucosas ocurre 1 a 4 semanas post vacunación (Bolin, 1995b). Por ello, la vacuna MLV no es recomendado para hembras preñadas.
- ◆ Pueden ocasionar aborto.
- ◆ La inmuno supresión y la recombinación genética son otros potenciales problemas asociados con MLV vacuna.

#### 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 esta 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 protectora. (Bolin, 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 realizo en dos establos lecheros de crianza intensiva de la cuenca lechera de Arequipa. El establo A ubicado en la irrigacion de Santa Rita de Sigwas. con 200 vacas en producción y el establo B ubicado en la irrigación de Vitor con 190 vacas en producción. Ambos establos no cuentan con un programa de vacunación contra el virus de la diarrea viral bovina, por lo menos desde hace 5 años atrás. Los problemas de abortos, repetición de servicios y mortalidad neonatal fueron mas prevalentes en el establo A.

#### **3.2.MATERIALES**

##### **3.2.1. Animales.**

Se incluyeron todos los terneros sin distinción de raza ni sexo nacidos durante los meses de julio a diciembre del 2001.

### **3.2.2. Equipos y materiales.**

Lector de ELISA (Labsystems Multiskan Plus), cabina de flujo laminar (Steril Gardhood), centrifuga (Selecta), estufa de 37° C (Gallenhamp), microcentrifuga (National labnet CO<sub>2</sub>), tubos al vacío (sistema vacutainers), con EDTA como anticoagulante, agujas vacutainers, microplacas estériles, viales, micropipetas simples y multicanales de 5 – 50 µl ; 50 – 200 µl y de 200 – 1000 µl, espectrofotómetro, refrigeradora, tips descartables, pipetas pasteur.

### **3.2.3. Reactivos.**

Kit de ELISA de captura de antígenos de pestivirus de procedencia comercial (Moredum Diagnostics, UK), el cual contiene: dos placas de 96 hoyos cubiertas con anticuerpos monoclonales, como contra la proteína no estructural 125 de los pestivirus, y el otro es el conjugado (anticuerpo monoclonal conjugado a peróxido de rábano silvestre (HRP)), control positivo C1, control positivo C2, control positivo C3, control negativo C4, buffer de lavado (PBSTween), sustrato, solución de bloqueo, y buffer de extracción A, B y C., para lisar globulos rojos y polimorfonucleares y lavado respectivamente.

## **3.3.METODOS**

### **3.3.1. Obtención de muestras.**

Se obtuvieron muestras de sangre entera, mediante punción de la vena yugular de los terneros recién nacidos antes de que tomen el calostro, utilizando tubos al vacío conteniendo EDTA como anticoagulante. Las muestras fueron identificadas y transportadas adecuadamente al laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) para su procesamiento.

### **3.3.2. Tamaño muestral.**

No fue necesario obtener el tamaño muestral ya que se realizó un muestreo dirigido que incluyeron a todos los terneros nacidos durante un periodo de 6 meses (julio a diciembre del 2001), sin distinción de raza ni sexo. Habiéndose trabajado un total de 131 terneros recién nacidos.

### **3.3.3. Criterios utilizados para la detección de antígenos virales en las muestras de los terneros.**

- ◆ Primero, se realizó la detección del antígeno de virus de la DVB en muestras de sangre entera de terneros recién nacidos, mediante la prueba de ELISA de captura de antígeno.
- ◆ Segundo, en las muestras cuyo resultado a la espectrofotometría no superaba el valor del control C2 (sospechoso), se evaluaron nuevamente utilizando el buffy coat, como recomienda el kit comercial.
- ◆ En caso de muestras positivas o sospechosas, se realizó la confirmación de la persistencia del virus de la DVB en los animales, luego de superado los 4 meses de vida que la literatura recomienda para evitar la interferencia de los anticuerpos maternos.
- ◆ Se investigó la presencia del VDVB en la madre del animal PI.

### **3.3.4. Detección de antígeno viral mediante la prueba de ELISA de captura de antígenos.**

La detección del VDVB mediante la prueba ELISA de captura de antígenos fue realizado de acuerdo al manual del kit comercial (Moredun Diagnostics). El procedimiento fue el siguiente:

(a) Preparación de buffy coat.

- ◆ Se llevaron los buffer de extracción A, B, y C a temperatura ambiente.

- ◆ Se centrifugaron las muestras de sangre con anticoagulante a 800 rpm por 10 minutos.
- ◆ Se extrajo el buffy coat, utilizando pipetas pasteur y se colocaron en viales estériles, añadiendo buffer de extracción A hasta el volumen de 1.5 ml.
- ◆ Se mezclaron suavemente hasta que los glóbulos rojos se lisaran (30 segundos).
- ◆ Las muestras se centrifugan a 2000 rpm (1 minuto)
- ◆ Cuando los glóbulos rojos no se lisaron completamente, se descarto cuidadosamente el sobrenadante, se añadió el buffer A hasta un volumen de 1.5 ml y se resuspendió el pellet. Se repitió los dos pasos anteriores.
- ◆ Se descarto el sobrenadante, se lavaron los pellet 3 veces adicionando 1.5 ml del buffer B y descartando el sobrenadante después de cada lavado.
- ◆ Se resuspendió los pellets en 1.5 ml de buffer C, por inversión y agitación; las muestras se agitaron por rotación durante 120 minutos a temperatura ambiente; y finalmente. Se almacenaron las muestras a – 20°C hasta su utilización.

(b) Detección de Antígenos contra VDVB.

- ◆ Antes de iniciar la prueba los reactivos fueron mantenidos hasta que obtengan la temperatura ambiente.
- ◆ Se colocaron 100 ul de los controles y de las muestras en los hoyos de la microplaca previamente determinados.
- ◆ La microplaca fue colocada en una cámara húmeda y se incubo a 37° C por 120 minutos.
- ◆ Se elimino el contenido de la microplaca, se lava tres veces con buffer de lavado, y secado sobre papel absorbente.
- ◆ Se adiciono 100ul de conjugado a toda la microplaca.

- ◆ La microplaca nuevamente fue colocada en una cámara húmeda y puesto a incubar a 37°C por 60 minutos.
- ◆ Se eliminó el contenido de los hoyos de la microplaca y se lavó de la forma anteriormente descrita.
- ◆ Se adicionó 100ul de sustrato a toda la microplaca.
- ◆ La microplaca se incubó durante por 15 minutos a temperatura ambiente.
- ◆ Se agregó 50 ul de la solución de bloqueo a toda la microplaca.
- ◆ Y se procedió a la lectura a través de un espectrofotómetro con filtro de 450nm de absorvancia.

### 3.3.5. Análisis de Datos.

#### Intervalo de confianza (IC):

Los intervalos de confianza se estimaron empleando el método de Simulación Beta [ $b(a_1, a_2)$ ] considerando para el cálculo de la función de prevalencia los parámetros de distribución:

$a_1$  = éxitos más 1 (positivos a la prueba)

$a_2$  = fracasos más 1 (negativos a la prueba)

#### IV. RESULTADOS

Uno (1) de los 131 (0.76 %) terneros muestreados de los establos A y B resultó ser congénitamente infectado con el VDVB (Cuadro 1). El ternero congénitamente infectado fue hembra y perteneció al establo A (Cuadro 2), mientras que en el establo B no se encontraron terneros con infección congénita. Según el análisis de la **Simulación b**, el valor de prevalencia promedio de los terneros portadores de VDVB en los hatos fue de 0.76% ( $7.6 \times 10^{-1}$ ), con intervalos de confianza de 0.24% ( $2.43 \times 10^{-1}$ ) a 3.49% ( $34.88 \times 10^{-1}$ ) (Cuadro 3), los intervalos de confianza se obtuvieron directamente del gráfico de la función beta (Apéndice 1)

Cuadro 1. *Detección de terneros con infección congénita con el VDVB mediante la prueba de ELISA de captura de antígenos en dos establos lecheros de las irrigaciones de Santa Rita de Sigwas (A) y Vitor(B) , Arequipa*

<b>Procedencia</b>	<b>Nº de terneros</b>	<b>Antígeno de la DVB</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Establo A	36	1	2.78
Establo B	95	0	0.00
<b>Total</b>	<b>131</b>	<b>1</b>	<b>0.76</b>

Cuadro 2. *Detección de antígeno del VDVB en terneros del establo A según sexo (n=36)*

<b>Sexo</b>	<b>Nº terneros</b>	<b>Detección de antígeno del VDVB</b>	
		<b>Nº</b>	<b>%</b>
Macho	19	0	<b>0.0</b>
Hembra	17	1	<b>5.88</b>
<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>1</b>	<b>2.78</b>



*Cuadro 3. Prevalencia de terneros recién nacidos con infección congénita con el VDVB en los establos A y B del valle de Arequipa.*

Nº total de animales	Persistentemente infectados (PI)		Prevalencia (%)	Intervalo de confianza (%)	
	Negativos	Positivos		Mínimo	Máximo

## V. DISCUSION

Actualmente uno de los pilares del control de la DVB es la identificación y eliminación del animal con infección persistente o animales PI que son los reservorios y diseminadores del VDVB (Lindberg y Alenius, 1999). Estos animales PI pueden ser identificados en la población de animales mayores de 6 meses, es decir, cuando los anticuerpos maternos hayan desaparecido. A diferencia, el presente estudio tuvo por objetivo detectar los animales PI al momento de nacer, antes de la primera toma del calostro. Evitando de esta manera que los animales PI diseminen el virus durante 6 meses; así como, el costo de criar un animal PI que finalmente debe ir al matadero.

De los 131 terneros muestreados de los establos A y B, uno (0.76%) nació infectado con el VDVB. Este animal fue detectado en el establo A, significando el 2.78% (1/36) de prevalencia de animales PI en este establo con un IC de 0.24% como mínimo y 3.49% como máximo según el análisis estadístico de simulación  $\beta$ , (Apéndice 1) mientras que en el establo B, no se detectaron animales PI (Cuadro 1 y 3). Previos estudios realizados en ambos establos determinaron una seroprevalencia del VDVB superior al 80% (datos por publicarse) sugiriendo la existencia de animales PI ya que como lo indica Houe et al, (1993) en un establo con alta prevalencia viral generalmente existen animales PI; se reporta también que un solo animal PI puede infectar 90% o más de animales susceptibles; los resultados del presente estudio concuerdan con lo indicado en la literatura.

El sistema de crianza de los bovinos en los establos A y B es de tipo intensivo con un número similar de vacas en producción; sin embargo, la presencia de un ternero PI en el establo A, pese de haberse colectado menor

numero de muestras sugiere que en el establo A existen factores como la falta de control de la DVB, mal manejo, frecuente introducción al hato de animales infectados, presencia de otras infecciones como la neosporosis, etc., que estaría favoreciendo la endemidad del virus en este establo.

Previos estudios realizados en el establo B se encontró alta prevalencia del VDVB y además se detectó 0.75% (3/400) animales (Rivera et al, artículo en preparación). La ausencia de terneros PI en el grupo de terneros nacidos en un periodo de 6 meses (n = 95) en el establo B sugiere que la infección por el VDVB en este establo podría ser reciente y las tres vaquillonas PI habrían sido la primera generación de PI. Era de esperar que estos tres animales PI tuvieran igualmente crías PI, así mismo, el ganadero podría estar eliminando los animales de pobre condición física o afectados por problemas diarreicos o respiratorios ya que los animales PI tienen una incrementada susceptibilidad a desarrollar infecciones secundarias (Houe, 1995). La ausencia de terneros PI en el establo B nacidos en el periodo de estudio (6 meses) indican que nacieron de madres que se habrían recuperado de la infección.

De los 36 terneros del establo A muestreados 17 fueron hembras y en este grupo se detectó la ternera PI demostrándose un 5.88% (1/17) de prevalencia de animales PI en el grupo de hembras (Cuadro 2). Bolin (1990), menciona que la persistencia viral mayormente ocurre en fetos hembras y en menor grado en los machos, tal vez, como un exquisito mecanismo de sobrevivencia viral. La densidad óptica obtenida en la muestra de sangre y suero de esta ternera fue de 0.9 indicando un alto contenido de virus en la sangre y posiblemente en saliva, lágrima y otras secreciones que no fueron analizadas en el presente estudio.

Los animales PI surgen cuando una vaca susceptible es infectada con el virus del biotipo NCP durante el primer tercio de gestación o antes de que el feto desarrolle su sistema inmune (Brownlie et al, 1998) por lo que se obtuvo una muestra de sangre de la madre de la ternera PI para la búsqueda del virus; sin embargo, no se detectó el VDVB en la madre indicando que no fue una vaca PI; sino, una vaca que fue infectada horizontalmente con el virus durante el primer tercio de la gestación evidenciando además la continua circulación del virus en los animales susceptibles del hato. La alta seroprevalencia del VDVB

en este hato y la detección de un animal PI constituyen evidencias de la existencia de otros animales PI sobre todo en el grupo de los animales de recría donde coincidentemente existen alta incidencia de problemas diarreicos y respiratorios en los terneros.

En general los datos de prevalencia de los animales PI fluctúan entre el 0.5 al 2% pudiendo sin embargo en algunos hatos alcanzar hasta el 10%. El 0.76% de prevalencia de terneros PI detectados en el presente estudio es similar a lo reportado en hatos lecheros de crianza semi intensiva (0.74%) del valle del Mantaro (Huamán, 2001) pero inferior a lo reportado en un hato de crianza intensiva del valle de Lima, donde Chacón (2001) reporta una prevalencia de 3.8% (4/105) de animales PI. Así mismo, es similar a lo reportado en otros países como Bélgica (0.75%), Dinamarca (1.1%), Suecia (1.3%) y USA (1.7%) (Houe, 1999).

Ultimamente la detección de los animales PI no es una tarea difícil ante la existencia de herramientas diagnosticas disponibles a nivel comercial como es la ELISA de captura de antígenos que posee una sensibilidad y especificidad de 98% y 97% respectivamente frente al aislamiento viral (Sandvik, 1999). Esta prueba permite trabajar grandes cantidades de muestras simultáneamente y las muestras pueden ser sangre entera, leche o suero.

Sin duda el sistema de crianza de tipo intensivo podría favorecer el surgimiento de los animales PI, sin embargo, el clima y el tamaño de la población bovina en nuestro medio podría constituir una ventaja para iniciar el control de la DVB empezando con la detección y eliminación de los reservorios que son los PI para disminuir la prevalencia de la infección, los problemas secundarios prevalentes en la recría o la emergencia de cepas virulentas como las reportadas en estas ultimas décadas en Canadá y otros países (Rebhun et al, 1989), pero también la presentación de la enfermedad de las mucosas que ocurren cuando un animal PI es superinfectado con una cepa de virus del biotipo CP, la existencia de varios animales PI en el hato podría incrementar el riesgo de la ocurrencia de esta forma clínica de la DVB que al parecer no ha sido reportado en el país.

## VI. CONCLUSIONES

- ◆ Los terneros PI pueden ser detectados poco después de nacer y antes que tomen el calostro.
- ◆ El porcentaje de animales persistentemente infectados detectados en el estudio (0.76%), se encuentra dentro del rango reportado en la literatura.

## VII. RECOMENDACIONES

- ◆ Continuar con el estudio de detección de animales PI como una estrategia de control de la DVB y evitar las fallas reproductivas y la mortalidad neonatal en los establos de crianza intensiva y semi intensiva.
- ◆ Cuantificar las pérdidas debido a fallas reproductivas en establos donde la DVB es prevalente.
- ◆ Realizar un estudio de costo – beneficio del control de la DVB basado en la detección de los animales PI en hatos sin vacunación y con vacunación pero sin eliminación de los PI

## VIII. BIBLIOGRAFIA 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 Oct: 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. Becher, P., G. Meyers., A. Shannon, H. Thiel. 1996. Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. J Virol 70, 2992 – 2998.
5. Bielanski, A., K. Loewen, M. Del Campo., M. Sirard., J. Willadsen. 1993. Isolation of bovine herpesvirus – 1 (BHV-1) and bovine viral diarrhea virus (BVDV) in association with the in vitro production of bovine embryos. Theriogenology 40: 531-545.
6. Bitsch, 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.
7. 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-Eastern Queensland. Aust Vet J 75(9):656-659.
8. Bolin, S. 1990. The current understanding about pathogenesis and clinical forms of BVD. Simposium on bovine viral diarrhoea. Vet Med October: 2-8.
9. Bolin, S.R. y J. Ridpath. 1990. Range of neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhea virus vaccines. Am J Vet Res 51: 703-707
10. Bolin, S.R., J. Ridpath., J. Black. 1994. Survey of cell line in the American Tissue Culture Collection for bovine viral diarrhea virus. J Virol Methods 48: 211

11. Bolin, S.R. 1995a. The pathogenesis of Mucosal disease. In: Bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 11(3):489-500.
12. Bolin, S.R. 1995b. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. *Vet Clin North Am Food Animal Practice* 11(3):615-625.
13. Bolin, S.R. y J.F. Ridpath. 1996. Glycoprotein E2 of bovine viral diarrhea virus expressed in insect cells provides calves protected from systemic infection and disease. *Arch Virol* 141(8):1463-1477.
14. Brock, K.V., D. Redman, M. Vickers., and N. Irvine. 1991. Quantification of bovine viral diarrhoea virus in Embryo Transfer Flush Fluids collected from a persistently infected heifer. *J Vet Diagn Invest* 3: 99-100.
15. Brock, K.V. 1995. Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet Clin. North. Am Food Anim Practice* 11: 549-561
16. Brownlie, J. 1991. The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch Virol* 3:79-96.
17. Brownlie, J., D.A. Booth, M.E. Stevens y M.E. Collins. 1997. Expression of non-cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in oocytes and follicles of persistently infected cattle. *Vet Record* 141:335-337.
18. Brownlie, J., L.B. Hooper, I. Thompson y M.E. Collins. 1998. Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV)-the bovine pestivirus. *Clin and Diag Virol* 10:141-150.
19. Brusckhe, 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 diarrhoea virus vaccine efficacy studies. *Vet Microbiol* 50: 33-43.
20. Brusckhe, C.J.M., M. Hulst, P. Van Rijn., R. Moormann and J. Van Oirschot. 1997. Glycoprotein E<sup>ms</sup> of pestivirus induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J Virol* 71: 6692-6696.
21. Cai, T.Q., P. Weston; L. Lund; B. Brodie; D. McKenna; W. Wagner. 1994. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am J Vet Res* 55: 934-943.
22. Chacón, J. 2001. Identificación de los animales persistentemente infectados con el virus de la diarrea viral bovina en dos establos lecheros de crianza intensiva de Lima. Tesis Bach Fac Med Vet Univ Nac Mayor de San Marcos. Perú. 49p.
23. Collett, M.S., R. Larson; C. Gold; D. Strick; D. Anderson and A. Purchio. 1988. Molecular cloning and nucleotide and sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virol* 165: 191-199.
24. Collett, M.S. 1992. Molecular Genetics of Pestiviruses. *Comp. Immunol Infect Dis* 15: 145-154.
25. Contreras, H. 1999. Prevalencia del VDVB en bovinos del valle del Mantaro. Tesis bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima, 43p.
26. Corapi, W.V., T.W. French; E. Dubovi. 1989 Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J Virol* 63: 3934-3943.
27. Cortese, V.S., K. West and J. Ellis. 1996. Clinical and immunologic responses to type 2 BVDV challenge in vaccinated and unvaccinated calves. *BCVA Edinburgh*, 610-613.



28. Donis, R. 1995. Molecular Biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. In: Bovine viral diarrhoea virus. Veterinary Clinics of North America; Food Animal Practice 11(3):393-423.
29. Edwards S. 1990. The diagnosis of bovine viral diarrhoea – mucosal disease in cattle. Rev Sci Tech Off Int Epiz 9: 115-130.
30. Entrican, G., A. Dand; P. Nettleton. 1995. A double monoclonal antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. Vet Microbiol 43: 65-74.
31. Fernandez, A., M. Herwicker; G. Trautwein; J. Pohlenz; B. Leiss. 1989. Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. Vet Pathol 26: 26-32.
32. 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 diarrhoea virus. Vet Record 144:111-114.
33. Fulton, R.W., C.W. Purdy, A.W. Confer, J.T. Saliki, R.W. Loan, R.E. Briggs y L.J. Burge. 2000. Bovine viral diarrhoea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with pasteurized spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. Can J Vet Res 64:151-159.
34. Guitián, J. y E. Yus. 1999. Diagnóstico de la diarrea vírica bovina a nivel de rebaño e individual. En E.Yus y M.L. Sanjuán. Eds. Diarrea vírica bovina. Consejo General de Médicos Veterinarios de España. 24:39-66.
35. Gilbert, S., K. Burton; S. Prins; and D. Deregt. 1999. Typing of bovine viral diarrhoea viruses directly from blood of persistently infected cattle by multiplex PCR. J Clin Microbiol 37: 2020-2023.
36. Hofmann, M., K. Brechtbuhl and N. Stauber. 1994. Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region. Arch Virol 139: 217-229.
37. Houe, H; A. Meyling. 1991, Prevalence of Bovine Virus Diarrhoea (BVD) in 19 Danish Dairy Herds and Estimation of Incidence of Infection in Early Pregnancy. Prev Vet Med 11: 9–16.
38. Houe, H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhoea Virus. Vet Clin North Am Food Animal Practice 11(3):521-547.
39. Houe, H; J. Baker; R. Maes; et al. 1995. Prevalence of Cattle Persistently Infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus in 20 Dairy Herds in 2 Counties in Central Michigan and Comparison of Prevalence of antibody – Positive Cattle Among Herds with Different Infection and Vaccination Status. J Vet Diagn Invest 7: 321–326.
40. Houe, H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. Vet Microbiol 64:89-107.
41. Howard, C. 1990 Immunological responses to bovine viral diarrhoea virus infections. Rev Sci Tech Off Int Epiz 9: 95-103.
42. Huamán, 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 Vet Univ Nac Mayor de San Marcos. Perú. 47p
43. Kirkland, P.D., M. McGowan; S. Mackintosh. 1992. Factors influencing the development of persistent infection of cattle with pestiviruses. Proc. Symp. Pestiviruses Eur Soc Vet Virol 2: 117-121.

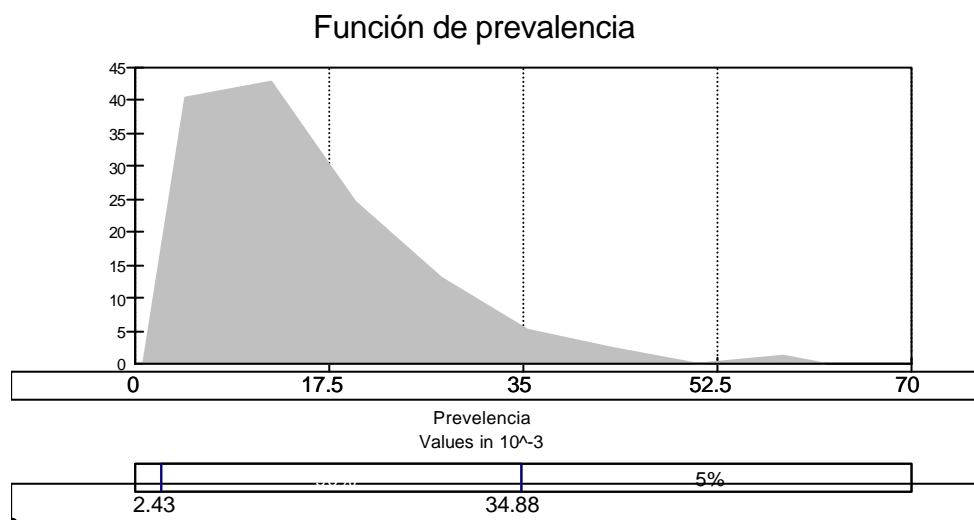
44. Kirkland, P.D., S. Mackintosh and Moyle, 1994. The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. *Vet Rec* 135: 527-529.
45. Kobrak, A. y E.L. Weber. 1997. Bovine diarrhoea virus: an update. *Rev Argent Microbiol* 29(1):47-61.
46. Kramps J.A., C. Maanen, G. Van de Wetering y G. Stendas. 1999. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. *Vet Microbiol* 64:135-144.
47. Kümmerer, B. y G. Meyers. 2000. Correlation between point mutations in NS2 and viability and cytopathogenicity of bovine viral diarrhoea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. *J Virol* 74: 390-400.
48. Lambot, M., A. Douart; E. Joris; J. Letesson y P. P. Pastoret. 1997. Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol* 78(5):1041-1047.
49. Larsson, B. and C. Fossum. 1992. Bovine virus diarrhoea virus induces in vitro a proliferative response of peripheral blood mononuclear cells from cattle immunized by infection. *Vet Microbiol* 31: 317-325.
50. Lindberg, A. and S. Alenius. 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet Microbiol* 64: 197-222.
51. Meyers, G., N. Tautz. 1992. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* 191: 368.
52. Meyers, G., N. Tautz. 1992. Insertion of a sequence encoding light chain 3 of microtubule-associated proteins 1A and 1B in a pestivirus genome: connection with virus cytopathogenicity and induction of lethal disease in cattle. *J Virol* 72: 4139-4148.
53. Ministerio de Agricultura, Peru. 1996. Producción Pecuaria e Industria Avícola. Presidencia de la República, Documento de Consulta.
54. Moenning, V. and B. Liess. 1995. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am* 11: 477-487.
55. Muñoz – Zanzi, C; W. Johnson; M. Thurmond; S. Hietala. 2000. Pool – Sample Testing as a Herd – Screening tool for Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus Persistently Infected Cattle. *J Vet Diagn Invest* 12: 195–203.
56. Murphy, F., C. Fauquet; H. Bishop; S. Ghabrial; G. Martelli; M. Mayo; M. Summers. 1995. *Flaviviridae, Virus taxonomy*. Springer, New York, pp 415-427.
57. Niskanen, R., S. Alenius; B. Larsson; S. Jacobsson. 1991. Determination of level of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds. *Arch Virol Suppl* 3: 245-251.
58. Njaa, B; E. Clark; E. Jansen; J. Ellis; D. Haines. 2000. Diagnosis of Persistent Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection of Immunohistochemical Staining of Formalin – Fixed Skin Biopsy Specimens. *J Vet Diagn Invest* 12: 393–399.
59. Obando R., Cesar. 1999. Emphasis on Diagnosis and Concomitant Infections with other Viruses of the Bovine Respiratory Disease Complex. Swedish University of Agricultural Sciences.

60. Paton, D., G. Ibata; S. Edwards and G. Wendvoort. 1991. An ELISA detecting antibody to conserved Pestivirus epitopes. *J Virol Methods* 341: 315-324.
61. Paton, D.J. 1995. Pestivirus diversity. *J Comp Path.* 112:215-236.
62. Peters, W., J. Greiser-Wilke; V. Moennig; B. Liess. 1986. Preliminary serological characterization of bovine viral diarrhoea virus strains using monoclonal antibodies. *Vet Microbiol* 12: 195-200.
63. Pellerin, C., J. Vandenhurk; J. Lecomte and P. Tijssen. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virol* 203: 260-268.
64. Polak, M.P. y J.F. Z mudzinski. 1999. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection in bulls in artificial insemination centers in Poland. *Vet Microbiol* 64:253-257.
65. Potgieter, L. 1995. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Animal Practice.* 11(3):501-520.
66. Rebhun, W.; T. French; Perdrizet. 1989. Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhoea infection in cattle. *J Vet Intern Med.* 3: 42-46.
67. Rhodes, S., J.M. Cocksedge; R.A. Collins y W.I. Morrison. 1999. Differential cytokine responses of CD4<sup>+</sup> AND CD8<sup>+</sup> T cells in response to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *J Gen Virol* 80:1673-1679.
68. Ridpath, J.F., J.D. Neill, M. Frey y J.G. Landgraf. 2000. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 bvdv from North America. *Vet Microbiol.* 77:145-155.
69. Rivera, H., A. Manchego, N. Sandoval, A. Vargas, A. Araujo, A. Gonzales y R. Rosadio. 1993. Aborto infeccioso en bovino de leche del Valle de Lima. *Rev Inv Pec IVITA(Perú),* 6(1): 31-37.
70. Sandvik, T. and J. Krogsrud. 1995. Evaluation of an antigen capture ELISA for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle blood samples. *J Vet Diagn Invest* 7: 65-71.
71. Sandvik, T. 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet Microbiol.* 64:123-134.
72. Sanjuán M.L., C. García y J.C. Corrales. 1999. Etiopatogénia de la diarrea vírica bovina: aspectos de interés. En E.Yus y M.L. Sanjuán. Eds. *Diarrea vírica bovina. Consejo General de Médicos Veterinarios de España.* 24:9-24.
73. Tautz, N., E. Thiel; J. Dubobi; G. Meyers. 1994. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathic pestivirus generated by an internal deletion. *J Virol* 68: 3289.
74. Travén, M., S. Alenius; C. Fossum; B. Larsson. 1991. Primary bovine viral diarrhoea virus infections in calves following direct contact with a persistently viraemic calf. *J Vet Med* 38: 435-462.
75. Van Oirschot, J.T; C.J.M. Brusckke y P.A. Van Rijn. 1998. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol* (in press).
76. Van Oirschot, J.T; C.J.M. Brusckke y P.A. Van Rijn. 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol* 64:169-183.
77. Vanroose, G; H. Nauwinck; A. Van Soom; E. Vanopdenbosch; A. de Kruif. 1998. Replication of Cytopathic and Noncytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus in Zona – Free and Zona – Intact In Vitro – Produced Bovine Embryos and the Effect on Embryo Quality. *Biology of Reproduction.* 58: 857 – 866.

78. Vega, S., R. Rosell; J. Paton; J. Orden; R. De la Puente. 2000. Antigenic characterization of bovine viral diarrhoea virus isolates from Spain with monoclonal antibodies. *J Vet Med* 47: 701-706.
79. Vilcek, S., J. Greiser-Wilke; P. Nettleton; D. Paton. 2000. Cellular insertions in the NS2-3 genome region of cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates. *Vet Microbiol* 77: 129-136.
80. Waage, S. 2000. Influence of new infection with bovine viral diarrhoea virus on udder health in Norwegian dairy cows. *Prev Vet Med* 43: 123-135.
81. Wensvoort, G., C. Terpstra. and E. Kluiver. 1989. Characterization of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralization. *Vet Microbiol.* 20: 291
82. Yus Respaldiza, E; H. Sanjuan. 2000. *Diarrea Vírica Bovina*. Edit Publex Estudio Fac Vet Univ. De Santiago de Compostela. Madrid. España

## IX. APENDICE

Apendice 1. Prevalencia promedio de terneros PI e intervalos de confianza,



según la función de simulación beta