

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Dinámica de Seroconversión en Terneras y Vaquillas Post eliminación de animales portadores del Pestivirus Bovino en un Hato Lechero de Arequipa en un Período de Doce Meses

Tesis para optar el Título Profesional de: MÉDICO VETERINARIO

AUTOR:

César Mitsuo Jayashi Flores

LIMA – PERÚ 2004

El presente trabajo es el fruto del apoyo, amor, cariño y esfuerzo de cada una de las personas que me ayudaron a realizarlo.

A mi padres y hermanos, gracias por su tiempo, ayuda, comprensión, apoyo, etc., etc. y etc.

A mis tíos, tías, primos y abuelos, gracias por su preocupación y confianza.

A mis sobrinos, gracias por la alegría, que a cada momento saben transmitirme.

*Agradezco a los doctores
que me apoyaron para la culminación de la tesis:*

*Dra. Hermelinda Rivera, muchas gracias
por toda su ayuda y enseñanzas*

*Dr. Alberto Manchego,
Dra. Mariluz Arainga,
Dr. César Gavidia,
Dr. Nestor Falcón,
Dra. Norma Noé.*

*A Ricardo, Mariluz, Christian, Yván y Daniel por
su ayuda en el laboratorio.*

*A Anita,
muchas gracias por todo el tiempo y confianza.
Siempre lo tendré presente.*

*A mis amigos:
Andrea, Nathann, Dante, Sandra,
Christian, Yván, Daniel, Carmen, Flor,
Erich, Hernán, Carlitos, Fernando,
Renato, Nelson, Gisel, Eric,
y demás compañeros de promoción,
muchas gracias por las horas de ocio, juerga y estudio
que siempre supieron compartir conmigo.*

RESUMEN

La diarrea viral bovina (DVB) es una enfermedad infecciosa considerada como causa importante de trastornos reproductivos en el ganado bovino lechero. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la eliminación de los animales portadores sobre la seroconversión contra VDVB, en la nueva generación de animales de un establo lechero de crianza intensiva, de la región Arequipa. Se evaluaron 204 sueros de bovinos en cuatro períodos de toma de muestra: enero (n=73), junio (n=48) y octubre (n=48) del 2003; y enero del 2004 (n=35). La seroprevalencia del VDVB fue de $80,83 \pm 9,03\%$ (59/73) en enero 2003; $56,25 \pm 14,03\%$ (27/48) en junio; $50,00 \pm 14,15\%$ (24/48) en octubre y $22,86 \pm 13,91\%$ (8/35) en enero 2004, usando la prueba de neutralización viral. Asimismo se detectaron 2,74% (2/73) animales persistentemente infectados (PI) en enero 2003, mediante la prueba de ELISA de captura, sin embargo, no se detectó ninguno en los posteriores muestreos. La incidencia de infección de VDVB fue de 23/100 terneras/vaquillas por mes (13/21) en el período junio a octubre del 2003; 5/100 (3/24) en el período octubre 2003 a enero 2004 y 12/100 (24/59) en el período enero 2003 a enero 2004. Mediante el análisis de regresión logística se demostró que la eliminación de animales PI en enero del 2003 redujo el riesgo de infección en los animales susceptibles en los siguientes períodos de muestreo. Además, la edad mostró ser un factor de riesgo para la infección con VDVB. Los resultados muestran que la infección con VDVB es altamente prevalente en hatos que albergan animales PI y que su eliminación reduce el riesgo de infección en el resto de animales. Debido a estos hallazgos se recomienda la identificación de animales PI mediante pruebas serológicas y su eliminación como una primera medida para el control y una posible erradicación del VDVB en hatos lecheros de crianza intensiva.

Palabras Claves: VDVB, bovinos, persistentemente infectados (PI), prevalencia, incidencia, hatos lecheros, factor de riesgo

SUMMARY

Bovine viral diarrhoea (BVD) is an infectious disease considered to be an important cause of reproductive losses in cattle. The objective of this study was to determine the effect of elimination of carrier animals on the seroconversion against BVDV of the new generation of animals of a dairy farm from the Arequipa region. 204 sera samples were taken, divided into four sampling periods, January (n=73), June (n=48) and October 2003 (n=48), and also January 2004 (n=35). BVDV seroprevalence was $80,83 \pm 9,03\%$ (59/73) for January; $56,25 \pm 14,03\%$ (27/48) for June; $50,00 \pm 14,15\%$ (24/48) for October 2003 and $22,86 \pm 13,91\%$ (8/35) for January 2004, using viral neutralisation test. Were also found 2,74% (2/73) persistently infected (PI) animals in January 2003, using an antigen-capture ELISA test. However, there was not found any PI animals in the subsequent samplings. There was an incidence of BVDV infection of 23/100 calves/heifers per month (13/21) for the June to October 2003 period, 5/100 (3/24) for the October 2003 to January 2004 period and 12/100 (24/59) for the January 2003 to January 2004 period. Logistic regression showed that elimination of PI animals in January 2003 reduced the infection risk for the subsequent sampling periods. It also showed that age was a risk factor for BVDV infection. The results showed BVDV infection is highly prevalent in herds that have PI animals and that their elimination leads to reduce the infection risk of their herd mates. Due to these findings, it is recommended to identify PI animals through serological tests and to eliminate them as a first approach to the control and eradication of BVDV in intensive management dairy herds.

Key words: BVDV, bovine, persistently infected (PI), prevalence, incidence, cattle farms, risk factor

I. INTRODUCCIÓN

La cuenca lechera de Arequipa es una de las principales del país, representando junto a Cajamarca a más del 38 % de la producción nacional lechera. Además, la cuenca lechera de Arequipa cuenta con una población de 66 200 bovinos y una producción de 213 000 T de leche (INEI, 1994). La producción lechera es una de las fuentes importantes de proteína de origen animal para el consumo de la población, por lo que los esfuerzos sanitarios deben estar dirigidos a lograr una mayor y más eficiente producción a través del mantenimiento de altos parámetros reproductivos mediante el control de factores que originan pérdidas productivas y reproductivas. Uno de estos factores son las enfermedades infecciosas como la diarrea viral bovina (DVB), considerada como una de las causantes de cuantiosas pérdidas económicas en la industria lechera a nivel mundial.

La diarrea viral bovina (DVB) es una enfermedad de origen viral, que afecta a los rumiantes domésticos y silvestres en el mundo. En el Perú la DVB tiene mayor prevalencia en las principales cuencas lecheras, como son Cajamarca, Lima, Arequipa, el valle del Mantaro en Junín y Ayacucho (Rivera 2002; 2001) y también se considera como una de las causantes de aborto en el valle de Lima.

Clínicamente la enfermedad de la DVB es aguda, subaguda o de tipo persistente. La forma subclínica y la aguda se caracteriza por un corto período de replicación viral con eliminación, seguido por eficiente seroconversión y recuperación. La infección aguda en animales preñados conlleva a la infección fetal, que puede resultar en el nacimiento de un ternero infectado e inmunotolerante, conocido como persistentemente infectado (PI), que elimina el virus mientras vive

(Vilcek *et al*, 1999). Los animales PI son los principales reservorios del virus en el hato por lo que su detección y eliminación es uno de los pilares en el control de la enfermedad.

Recientes estudios realizados en algunas irrigaciones de la cuenca lechera de Arequipa, como Majes y Santa Rita, indican que la DVB tiene una prevalencia superior a 80% (Rivera, datos sin publicar) y que el aborto y otros problemas reproductivos son constantes en los hatos lecheros, pudiendo alcanzar hasta 30% en algunos de ellos. Por estas razones algunos ganaderos están adoptando medidas de control para la enfermedad. Actualmente el control de la DVB es factible utilizando vacunas a virus muerto y la eliminación de animales PI (Bitsch y Ronsholt, 1995). En el Perú se utiliza la vacunación aunque no en forma masiva y la mayoría de los ganaderos emplean la vacuna como único método de control de la DVB.

El presente estudio tuvo como objetivo la determinar el efecto de la eliminación de los animales portadores sobre la seroconversión contra VDVB, en la nueva generación de animales en un hato de la irrigación Santa Rita, provincia de Sihuas, región Arequipa. Esto se realizó mediante la detección de anticuerpos contra VDVB en los animales que iban cumpliendo seis meses y de antígeno viral en animales seronegativos, (para hallar animales PI) en el período de un año (enero 2003 a enero 2004). También se hizo la determinación de la tasa de incidencia de la infección con el VDVB en los mismos animales durante el mismo período. Finalmente mediante el análisis de regresión logística se determinó el efecto de los factores edad y período de muestreo sobre la seropositividad de los animales.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características del Virus:

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es un miembro del género pestivirus, familia *Flaviviridae* (Wengler, 1991; Vanroose *et al*, 1998). La infección con VDVB tiene un impacto negativo en la producción de leche y en la campaña reproductiva de los animales de un hato lechero (Chi, 2002). Ocasiona fallas reproductivas, como son repeticiones de celo, muertes fetales y abortos. También se asocia a nacimientos de terneros débiles que mueren al poco tiempo de nacidos (Baker, 1995). Además McGowan (1995) menciona que el VDVB está asociado con una significativa causa de pérdidas reproductivas tempranas las cuales incluyen, fallas en la fertilización y mortalidad embrionaria.

2.1.1. Estructura Viral:

El VDVB es de forma esférica de 40-60 nm de diámetro. La partícula viral está constituida por una molécula de ácido ribonucleico (ARN) protegido por una cubierta proteica y una envoltura externa de naturaleza lipídica. (Ridpath, 2001).

Las proteínas estructurales del virus constituyen la proteína de la cápside y tres glicoproteínas ubicadas en la envoltura lipídica.

- **C (p14):** es la proteína de la cápside y tiene como función empaquetar el ARN genómico y proporcionar las interacciones necesarias para la formación de la envoltura del virión.

- **Erns (gp48), E1 (gp25) y E2 (gp53):** se asocian a la envoltura lipídica. La gp53 contiene una región hipervariable y es la mayor responsable de la producción de anticuerpos neutralizantes tras la infección o vacunación. (Paton, 1995; Sanjuán, 1999). Asimismo es en la gp53 donde se producen mutaciones las cuales originan las diferencias entre cepas de VDVB debido, posiblemente a presiones inmunológicas (Xue *et al*, 1990; Hertig *et al*, 1995). La proteína gp48 está asociada a la envoltura viral e induce en parte la producción de anticuerpos neutralizantes (Paton, 1995).
- **Npro (p20):** es una proteína no estructural responsable de la cortadura de la poliproteína viral.
- **NS23 (p125):** esta proteína no estructural es indispensable para la multiplicación viral. Los animales infectados naturalmente y aquellos o vacunados con cepas vivas desarrollan una respuesta humoral frente a esta proteína. (Paton, 1995).
- **NS3(p80):** es un fragmento más pequeño que la proteína NS23 y se encuentra en todas las variantes citopatogénicas del VDVB y la síntesis de esta proteína parece estar ligada al desarrollo de la enfermedad de las mucosas (Meyers *et al*, 1991).
- Se conocen otras proteínas no estructurales que incluyen la **NS4A(p10)**, **NS4B (p32)**, **NS4B (p38)** y **NS5A (p58)**, cuyas funciones aun no han sido establecidas, sin embargo, parecen ser importantes en la replicación vírica (Sanjuán, 1999).

2.1.2. Biotipos del Virus:

Existen dos biotipos de VDVB según su efecto en los cultivos celulares *in vitro* (Hornizek, 1981). Estos son el biotipo citopatogénico (CP) y no citopatogénico (NCP). Las cepas citopatogénicas derivan de las cepas no citopatogénicas por procesos de recombinaciones entre ARN viral o celular (Sanjuán, 1999). Una diferencia clave entre las cepas citopatogénicas (CP) y no-citopatogénicas (NCP) es el procesamiento de la proteína no estructural 125 (Sanjuán, 1999).

Las cepas de el biotipo **no-citopatogénico** (NCP) se aíslan comúnmente de casos de animales con infección aguda y están presentes en todos los animales persistentemente infectados

que son inmunotolerantes como resultado de una infección prenatal (McClurkin, 1984). Algunos animales persistentemente infectados desarrollan la forma severa de la DVB conocida como la enfermedad de las mucosas (Bolin *et al*, 1985). Ésta es usualmente fatal y se asocia a una superinfección con una cepa citopatógena homóloga de VDVB (Brownlie *et al*, 1984; Bolin *et al*, 1985).

Las cepas CP producen un efecto citopático *in vitro* en cultivos celulares, que se caracteriza por producción de intensa picnosis nuclear. En el citoplasma se observan granulaciones, vacuolización y apoptosis. La lisis celular se produce al cabo de 2 a 3 días post-inoculación. Las cepas CP producen un fragmento NS3 más pequeño ó p80 (Corapi, 1988) generado por una división proteolítica de una NS23 alterada, una duplicación genética de NS3 (Meyers *et al*, 1991) y delección genética de NS2 (Tautz *et al*, 1994). En algunos casos, el re-arreglo genómico incluye la recombinación con secuencias de ARN viral o celular (Meyers *et al*, 1992). Estas diferencias posiblemente expliquen las diferencias cualitativas en el efecto citopático causado por diferentes VDVB citopatógenos (Paton, 1995).

2.1.3. Genotipos Virales:

La gran variabilidad genética entre los aislados del VDVB es conocida. A la fecha se han determinado mediante técnicas moleculares dos genotipos dentro del VDVB, y se les denomina genotipo I y genotipo II (Pellerin, *et al*, 1994; Ridpath *et al*, 1994).

- Genotipo 1: Comprende las cepas de laboratorio y cepas vacunales como: NADL, SINGER, NY-1, C virus y TGAN. Este genotipo es el más común y es considerado el clásico VDVB. Basado en las comparaciones genéticas estas cepas has sido subdivididas en VDB subtipo 1a, representado por la cepa NADL y el subtipo 1b, representado por la cepa Osloss (Van Rijn *et al*, 1997). Dos subtipos más has sido identificados recientemente (Baule *et al*, 1997)
- Genotipo 2: Comprende a las nuevas cepas del VDVB asociadas con una alta mortalidad, trombocitopenia y hemorragias que se presentaron en USA y Canadá, cepas aisladas de animales con infección persistente, nacidos de vacas vacunadas y cepas aisladas de sueros y fetos: NY-93, 890 y AZSPLN (Kelling, 1996; Odeón *et al*, 1999)

2.2. Patogénesis:

El virus se transmite principalmente de forma directa. La principal vía de infección es la oronasal, a través de alimentos contaminados por orina heces, secreciones oronasales, heces o fetos abortados y placentas. Existen otras fuentes de infección que merecen tomarse en cuenta, como son, a través de semen contaminado (Vanroose, 1998), ropa de trabajadores o instrumentos, y algunas moscas picadoras (Bitsch y Ronsholt, 1995). Una vez que ingresa el virus al organismo se replica a nivel de las células epiteliales de la mucosa lingual, nasal y en las tonsilas. Luego se disemina sistémicamente o asociado a células sanguíneas leucocitarias, como son linfocitos o monocitos. Durante el período de viremia el virus puede llegar a la mayoría de tejidos teniendo predilección por los tejidos linfoides (Brownlie, 1991).

La mayoría de las infecciones con VDVB son subclínicas, sin embargo la infección viral puede llevar a la presentación de diferentes síndromes clínicos que se pueden agrupar en varias categorías (Smith, 1996):

- Diarrea viral bovina aguda
- Infecciones **in utero**; y
- Enfermedades en animales persistentemente infectados (PI), enfermedad de las mucosas.
- Síndrome hemorrágico

2.2.1. Infección Subclínica:

La mayoría de animales adultos infectados con el VDVB presenta infecciones subclínicas (Baker, 1987). Aunque en los animales jóvenes la inmunosupresión asociada con la infección, puede llevar a la manifestación de problemas ocasionados por infecciones respiratorias e intestinales oportunistas (Hurley, 1996; Peterhans, 2003). Cuando la infección de las vacas susceptibles se produce a través de un toro persistentemente infectado, suele existir muerte embrionaria y problemas pasajeros de repetición de celos, generalmente no apreciables por el ganadero o el veterinario (McGowan, 1995).

2.2.2. Infección aguda:

En líneas generales la diarrea viral bovina aguda puede variar mucho en la forma de presentación desde leves signos como fiebre, depresión, moqueo, lagrimeo, hasta diarrea y enfermedades respiratorias. Luego del ingreso del virus hay un período de incubación de 5 a 7 días

en el que pueden aparecer fiebre y leucopenia (Brownlie, 1995). Algunos animales de hatos susceptibles presentan diarrea que puede ser de un carácter explosivo, algunos otros animales pueden tener flujo ocular y nasal además de estomatitis erosiva (Vanroose, 1998). Ocasionalmente, la infección aguda puede asociarse con signos respiratorios y raramente con trombocitopenia la cual conduce a múltiples hemorragias en diferentes órganos (Rufenatch *et al*, 2001). En vacas en producción puede presentarse incluso una disminución de la producción (Baker, 1995). El desenlace de la enfermedad es la recuperación total del animal o la muerte del mismo. Ésto depende de una serie de factores que incluyen el estatus inmune del animal, la cepa con el cual está infectado y la edad del animal (Kelling, 1996). La mayoría de infecciones agudas de DVB son causadas por el biotipo no citopatogénico (NCP) (Smith, 1996).

Los animales con infección aguda pueden diseminar la enfermedad durante un período corto de viremia, que dura entre 7 a 10 días, pero el rol que tienen para el mantenimiento de la enfermedad parece ser de poca importancia (Barber y Nettleton, 1993; Niskanen, 1996).

2.2.3. Infecciones In Útero:

En vacas gestantes la infección tiene una mayor importancia debido a las consecuencias de ésta sobre el feto y la fertilidad del animal. En la vaca se desarrolla por lo general una enfermedad leve o inaparente (Sanjuán, 1999). Sin embargo, debido a la difusión transplacentaria del virus al feto, puede conducir a muertes embrionarias tempranas, malformaciones, abortos, nacimiento de terneros débiles (síndrome del ternero débil) (Baker, 1995) Durante la gestación temprana, los fetos expuestos pueden llegar a desarrollar una infección persistente, nacer normalmente o ser abortados (Rufenatch *et al*, 2001).

Estudios *in vitro* (Singh *et al*, 1982) han demostrado que la zona pelúcida protege las células embrionarias de una infección directa por diferentes virus entre los que se incluyen los pestivirus. En casos de vacas superovuladas e infectadas con pestivirus luego de 7 días de inseminación, los embriones mostraron una evidencia de retraso de crecimiento y de esto se concluye que el virus infecta el embrión (Archbald *et al*, 1979).

La infección fetal durante el primer trimestre de la gestación con cepas NCP, puede dar como resultado abortos o fetos momificados (Baker, 1995; Sanjuán, 1999), consecuencia de lesiones destructivas y retraso del desarrollo de órganos y tejidos (Baker, 1995). En caso de que el feto sea infectado con una cepa NCP entre 40 a 120 días de gestación y sobrevive a la infección,

dará lugar a un animal PI. Estos animales no son capaces de reconocer al virus como extraño, y se convierten en portadores y excretores del virus durante toda su vida (McClurkin, 1984; Brownlie, 1991). A los fetos bovinos se les considera inmunocompetentes alrededor del día 100 de gestación (Sanjuán, 1999). La infección suele afectar la génesis de los ojos y del sistema nervioso central, lo cual se manifiesta en forma de hipoplasia cerebelar, cavitación del cerebro y displasia de la retina (Baker, 1995).

En los animales PI el virus se multiplica en diversos tejidos, como son el cerebelo, cerebro, bazo, riñón, pulmón y parte del intestino (Bielefeldt-Ohman, 1995). Durante el último tercio de la gestación la infección con el VDVB no tiene mayor implicancia en el desarrollo normal del feto, debido que es inmunocompetente (Rufenatch *et al*, 2001).

Endsley *et al* (2003) demostraron que la vacunación en terneros jóvenes contra VDVB mientras los anticuerpos maternos se encuentran presentes puede generar células T y B de memoria, específicas contra VDVB. También demostraron que los terneros seronegativos con células de memoria T y B específicas para VDVB pueden ser inmunes al desafío con VDVB virulento.

2.2.4. Enfermedades en Individuos persistentemente infectados (PI):

Los animales PI pueden desarrollar distintos síndromes asociados a la infección con VDVB. La mortalidad de estos terneros suele alcanzar el 50% en el primer año de vida. Estos animales pueden además desarrollar la enfermedad de las mucosas la cual está asociada a la presencia de VDVB CP el cual puede emerger de biotipo NCP debido a una mutación (Brownlie, 1991; Weiss *et al*, 1994).

2.2.5. Enfermedad de las Mucosas:

Es la manifestación letal clínica de la enfermedad (Rufenatch *et al*, 2001). En los terneros se presenta con fiebre crónica, anorexia, intensa diarrea acuosa, flujo nasal y estomatitis erosiva o ulcerativa. Se produce deshidratación y emaciación y la muerte suele tener lugar a las pocas semanas o meses (Baker, 1995). Luego de la presentación de los signos clínicos, los animales alternan períodos de lucidez y recuperación con períodos de depresión y anorexia. Patológicamente, se observan lesiones múltiples con escasa inflamación periférica desde la boca hasta el abomaso, en el intestino puede aparecer una alteración del color de los pliegues de la mucosa, dando lugar a una

superficie luminal de aspecto listado. El estudio histológico confirma la necrosis epitelial y evidencia una destrucción masiva de tejido linfoide (Fenner, 1992)

La enfermedad de las mucosas en condiciones naturales necesita para su ocurrencia diversos factores. El primer factor es la existencia de animales PI. El segundo factor es que se produzca una superinfección del animal PI con un cepa antigénicamente similar (homóloga) (Paton, 1995). Si el virus CP que aparece en un animal PI se difunde a otros animales PI de la explotación, estos desarrollarían también enfermedad de las mucosas si el virus NCP con el que están persistentemente infectados es similar al del animal en que surgió el virus CP. Esto es probable dentro de una misma explotación (Hamers, 1998). La similitud antigénica entre ambos biotipos de virus del mismo animal sugirió que el VDVB CP surgió de NCP por mutación, recombinación o rearreglo genético. Los estudios genéticos han demostrado que las mutaciones y los rearreglos dentro del gene que codifica la proteína 125 no estructural coinciden con la conversión de VDVB NCP a VDVB CP (Meyers *et al*, 1992).

2.2.6. Síndrome Hemorrágico:

Está relacionado a la infección con el VDVB genotipo II no citopatogénico. En países como Inglaterra, Estados Unidos y Canadá se ha encontrado un aumento de la incidencia de DVB clínica y un incremento en la severidad de la enfermedad en los brotes, con alta mortalidad (David *et al*, 1994; Hibberd *et al*, 1993). Estos brotes se caracterizaron por una repentina leucopenia, pirexia, anorexia, diarrea severa, aborto y muerte tanto en ganado adulto como joven. Estos reportes refuerzan el consenso emergente de que el VDVB NCP es capaz de inducir la enfermedad severa en ganado nunca expuesto a VDVB (Odeón *et al*, 1999).

2.3. Epidemiología

El virus de la diarrea viral bovina está extendido alrededor del mundo, basándose su éxito epidemiológico en el hecho de que es capaz de producir infecciones persistentes en animales inmunotolerantes. (Corrales *et al*, 1999). Las infecciones persistentes en estos animales inmunotolerantes son casi imposibles de detectar por largos períodos de tiempo, lo que facilita la diseminación de la infección en el rebaño. Además estos animales eliminan virus por todas sus secreciones lo que facilita aún más el contagio entre animales. (Corrales *et al*, 1999). La prevalencia de estos animales es baja (entre 0,5 a 3%) pero el potencial de diseminación de la enfermedad es

tremendo (Dubovi, 1996). Debido a la importancia de los animales persistentemente infectados se va a describir su importancia como un punto aparte.

2.3.1. Fuentes de Infección:

Existen varias fuentes de infección pero la principal es a través de los animales PI (Rufenacht *et al*, 2001; Lindberg, 2001). A pesar de que los terneros PI tienen tasas de mortalidad del 50% en los primeros doce meses de vida (Smith, 1996). La diseminación que provocan estos animales puede ser tan grande que en 3 a 4 meses son capaces de infectar al 90% de los animales con los que conviven (Houe, 1999). Los animales PI eliminan el virus durante toda su vida a través de secreciones y excreciones como son: la saliva, orina, heces, descargas nasales, leche y lágrimas (Houe, 1995).

Los animales transitoriamente infectados pueden también diseminar la enfermedad durante un breve período de viremia (de 5 a 7 días de duración), pero el rol que ejercen el mantenimiento de la infección en el hato parece ser de poca importancia (Barber y Nettleton, 1993; Niskanen *et al*, 1996). También parece ser que el contacto cercano con otros hatos pueda servir como fuente de infección (Valle *et al*, 1999). Braun *et al* (1999) demostraron que el uso de pasturas comunes (pasturas alpinas, Suiza) entre diferentes hatos inducía la diseminación de la infección entre animales seronegativos. Otras fuentes de infección son: semen contaminado, transmisión del virus por los trabajadores o instrumentos (Bitsch y Ronsholt, 1995)

2.3.2. Métodos de Transmisión

2.3.2.1. Transmisión Vertical:

La transmisión vertical puede ser de una madre a PI a su descendencia o de una madre sana que se infecta horizontalmente y durante esta infección el feto se convierte en un feto PI (Houe, 1995). Este patrón de comportamiento de la infección puede originar la formación de líneas familiares de animales PI, los cuales al llegar a la madurez sexual van a reproducirse y perpetuar la transmisión del virus. En estas líneas familiares la condición de PI se va a mantener de generación en generación (Houe, 1991).

La inseminación con semen de toros PI produce invariablemente la infección en las hembras susceptibles inseminadas (Revell *et al*, 1988; Kirkland, 1994). Estas hembras por lo general tienen

bajas tasas de concepción (McGowan, 1995). Sin embargo, la producción de un ternero PI a través de la inseminación artificial rara vez se presenta (McGowan, 1995), por lo que la condición de ternero PI se produce en etapas posteriores de la gestación.

Otra vía para la transmisión vertical es la transferencia de embriones. Aquí si la hembra donante es PI, un inadecuado lavado de los embriones puede transmitir la infección a la receptora, que a su vez puede transmitirla al embrión transplantado (Corrales *et al*, 1999)

2.3.2.2. Transmisión Horizontal:

La transmisión horizontal puede darse de manera directa o indirecta. La directa es a través de secreciones o excreciones de animales infectados, PI principalmente, no descartándose la transmisión a través de animales infectados transitoriamente (Tremblay, 1996). La vía oro-nasal es la principal para el contagio de los animales susceptibles (Houe, 1995). De forma indirecta se puede transmitir el virus a través de instrumentos de uso veterinario y de manejo (Bitsch y Ronsholt, 1995). La transmisión horizontal puede producirse también a partir de un toro PI, ya sea por monta natural o por inseminación artificial a través de semen infectado con el virus (McGowan, 1995).

2.4. Prevalencia de la Infección por VDVB

La seroprevalencia en hatos no vacunados difiere entre áreas y países, teniéndose un rango de 20 a 90% (Meyling, 1984; Bolin *et al*, 1985). Estas diferencias pueden explicarse en parte por factores como la densidad de ganado, tamaño del hato y comercio animal (Houe, 1995). Ståhl *et al* (2002) indican que la infección con VDVB tiende a ser endémica en la mayor parte de las poblaciones, con un 60 a 80% del ganado que posee anticuerpos neutralizantes contra el virus.

En el Perú estudios llevados a cabo en la cuenca lechera de Arequipa, indican que el VDVB posee una prevalencia de entre 50 a 80% en el ganado bovino (Rivera, 2001). Mientras que en el valle de Mantaro se determinó una prevalencia de 72,4% de infección de VDVB (Contreras, 1999). Además Ståhl *et al* (2002) encontraron una prevalencia en el valle del Mantaro, Junín, de 96% de un total de 636 vacas lactantes pertenecientes a 60 hatos.

En los países europeos las prevalencias varían entre países. En España la prevalencia de animales infectados se encuentra entre el 43% (Castro, 1984) y 64% (Vega, 1997). Sin embargo, Mainar-Jaime (2001) encontró una prevalencia de 21%, la cual era mucho menor de lo esperada.

Entre los países europeos son Finlandia y Noruega los países que tienen más baja prevalencia, de 1 a 9% (Corrales *et al*, 1999). En Croacia se encontró que el 79,2% de animales que presentaban desórdenes reproductivos poseía anticuerpos contra el VDVB (Biuk-Rudan, 1999). En Suiza Rufenatch *et al* (2001) encontró que de 34440 animales pertenecientes a 121 granjas, 1982 fueron positivos a la infección con VDVB, esto es, 57,6% de prevalencia y se encontró además que 22 animales eran PI. Por su parte Björkman (2000) encontró en Suecia una prevalencia de 32% para VDVB, en animales que tenían un historial de aborto reciente y asoció estos abortos a la infección concurrente de *Neospora caninum* y VDVB. En Dinamarca se obtuvo una prevalencia de 64% de un total de 2750 muestras de 19 hatos lecheros, además se hallaron 28 animales PI (Houe, 1991). En Eslovaquia Vilcek *et al* (2002) muestrearon 1295 animales de 6 a 12 meses de edad, pertenecientes a 45 granjas. De éstas, 13 granjas tuvieron más de 90% de animales seropositivos; en 14 granjas la prevalencia estuvo en 71% y 90%; en otras 13 granjas sólo el 50 a 70% de animales fueron positivos para anticuerpos contra VDVB, mientras que en las 5 granjas restantes se obtuvo prevalencias menores al 50%.

En Canadá Chi *et al* (2002) encontraron una prevalencia de 37,8% para VDVB de 2604 animales pertenecientes a 90 hatos en las provincias marítimas del Canadá. Por su parte, VanLeeuwen *et al* (2001), también en Canadá, encontraron prevalencias entre 35,5% a 57,6% para VDVB de 30 hatos muestreados tomando por cada hato 5 animales no vacunados mayores de seis meses. Finalmente en los estados Unidos de Norteamérica se evaluaron 3157 animales de 66 hatos, los cuales tenían historia de infección por VDVB, encontrándose 89% de animales positivos a la presencia de anticuerpos y 1,7% de animales PI (Houe, 1995).

2.5. Diagnóstico

2.5.1 Detección de Animales Persistentemente Infectados:

Los terneros PI pueden identificarse a través del aislamiento viral a partir de suero tejidos. Se usan además pruebas inmunohistoquímicas para detectar el antígeno en biopsias, la prueba de inmunoabsorcancia ligada a enzimas (ELISA) y la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Dubovi, 1996). Los animales PI eliminan virus que pueden ser aislados de cualquier tejido que se tome como muestra. Una prueba inmunohistoquímica para la determinación de VDVB de biopsias de piel está disponible para diferenciar entre animales PI y animales con infecciones agudas (Njaa, 2000). Esta prueba se usa como prueba tamiz en un hato porque las muestras pueden ser tomadas de animales de cualquier edad, la toma de muestra es simple y las muestras son estables

para el transporte y el manejo (Baszler *et al*, 1995). La prueba de PCR es más rápida que la de aislamiento viral y puede detectar el virus en complejos inmunes de antígeno-anticuerpo. La prueba es sensible y ha demostrado diferenciar entre los genotipos de VDVB, pero pueden obtenerse resultados positivos a pesar de que la muestra sea negativa al aislamiento viral o pruebas inmunohistoquímicas (Njaa, 2000).

2.5.2. Detección de antígenos:

2.5.2.1. Inmunoperoxidasa:

En una prueba inmunohistoquímica, rápida, usada para la detección de antígeno de VDVB en tejidos frescos o fijados en formalina. En esta prueba se usa un anticuerpo monoclonal o policlonal marcado a una enzima que es la peroxidasa. Además la prueba permite observar la arquitectura del tejido y por tanto las lesiones histológicas que pudieran estar presentes (Baszler *et al.*, 1995). Para animales persistentemente infectados puede usarse prácticamente cualquier tejido, pero con particular éxito se ha encontrado en nódulos linfáticos, glándula tiroides, piel, cerebro, abomaso y placenta (Wilhelmsen *et al*, 1991). La inmunohistoquímica tiene un grado de sensibilidad de 97% y especificidad de 97% (Lértora, 2003)

2.5.2.2. Inmunofluorescencia:

Es una prueba inmunohistoquímica, la cual se usa para la detección de antígeno en los tejidos frescos, usando para esto anticuerpos monoclonales o policlonales contra el VDVB marcados con fluorocromos. La prueba requiere del uso de microscopio de fluorescencia para observar el antígeno (Werdin, 1989). La inmunofluorescencia tiene una sensibilidad de 77% y una especificidad de 83% (Lértora, 2003)

2.5.2.3. ELISA de captura de antígenos:

Tiene su fundamento en la detección del antígeno viral a través de los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales usados reconocen la p125, por lo que pueden detectarse las diferentes cepas del VDVB. En la prueba se utilizan anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epítopes en la proteína no estructural conservada 125/80k del virus. Un anticuerpo monoclonal está pegado a la placa de ELISA para la captura del antígeno viral presente en las muestras de sangre y un segundo anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa revela la

unión de Antígeno-Anticuerpo. La presencia de color indica la positividad de la muestra (Sandvik, 1995). Esta prueba es adecuada para la detección de animales persistentemente infectados y usualmente detecta el antígeno de VDVB en los leucocitos de sangre periférica. Este método puede llegar a alcanzar una sensibilidad y especificidad (97% y 99% respectivamente (Shannon *et al*, 1991)) equivalentes a la prueba de aislamiento viral y se prefiere en aquellos raros casos donde la viremia persistente está combinada con seropositividad. La prueba de ELISA de captura es de poca utilidad para la detección del virus en infecciones agudas (Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccines, 2000).

2.5.3. Aislamiento Viral en cultivos celulares:

Es considerada como la prueba estándar. Esta prueba tiene una alta especificidad para la detección de la infección con BVDB; sin embargo, los anticuerpos colostrales pueden temporalmente disminuir la cantidad de virus libre del suero de los animales jóvenes. Además el aislamiento viral puede no diferenciar entre infecciones agudas y animales H a menos que los animales positivos sean nuevamente sometidos a la prueba luego de 2 o 3 semanas. Una desventaja de la prueba de aislamiento viral es la frecuente contaminación de las células con VDVB endógeno, lo cual interfiere con los resultados del aislamiento. Adicionalmente, el método es muy laborioso y requiere de varios días para la obtención de los resultados, además de equipos, un sistema de cultivo celular permanente y personal calificado (Dubovi, 1996).

2.5.4. Detección de Anticuerpos:

Existen varias pruebas para la detección de anticuerpos contra el VDVB, siendo las de mayor uso, las prueba de Neutralización Viral y ELISA.

El uso de pruebas para la detección de anticuerpos es importante sobretodo para establecer un diagnóstico de la infección contra VDVB en un hato o en una población. Por lo general valores altamente positivos de anticuerpos (Neutralización viral) o densidades ópticas (ELISA) indican una infección activa dentro del hato (Niskanen, 1993).

2.5.4.1. Prueba de Neutralización Viral:

La prueba de neutralización viral es uno de los métodos serológicos más sensibles y específicos para la detección de VDVB (Edwards, 1990). Sus aplicaciones incluyen: demostración

de un incremento específico de anticuerpos durante una infección (seroconversión), mediante la comparación de títulos en las fases aguda y convaleciente e identificación del virus.

El fundamento de la prueba radica en la capacidad de los anticuerpos para neutralizar la infectividad o citopatogenicidad del virus homólogo (Bishai, 1974; Rivera *et al*, 1993). La prueba de neutralización puede llevarse a cabo haciendo diluciones del suero y enfrentando a una cantidad constante de virus. La muestra requerida para esta prueba es el suero y/o fluido torácico fetal, pero no plasma. Actualmente la prueba es realizada en microplacas de 96 hoyos y requiere de una cepa citopática (CP) del VDVB que debe ser mantenida en el laboratorio debidamente titulada en cultivo celular secundario o línea celular continua libre de VDVB endógeno y la lectura se hace al tercer o cuarto día. (Benito *et al*, 2001)

2.5.4.2. Inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA)

En la prueba de ELISA indirecta, el antígeno está inmovilizado en un sustrato y se usa para atrapar el antígeno presente en la muestra formando un complejo que es detectado por la adición de un conjugado marcado con una enzima y un sustrato cromógeno (Sandvik, 1999). En general ofrece ventajas debido a su simplicidad, capacidad de automatización, alta sensibilidad y especificidad. Estas características la convierten en una prueba útil para monitoreos serológicos de gran número de muestras de suero, leche o plasma que son procesadas durante las etapas de erradicación de la enfermedad (Kramps, 1999). Además tiene la ventaja de no requerir de cultivos celulares (Niskanen, 1993).

Su uso en programas de control y erradicación en hatos incluye tanto a muestras individuales como a muestras leche de tanque para determinar el estado de infección en el grupo de animales del hato (Niskanen, 1993; Ståhl *et al*, 2002).

2.5.5. Detección del ácido nucleico viral:

La prueba de PCR ha demostrado poder diferenciar entre genotipos de VDVB (Njaa, 2000), sin embargo, su aplicación diagnóstica requiere adaptación para el uso de muestras clínicas.

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa-reversa (RT-PCR) puede ser adaptada para la detección de ARN del VDVB para propósitos de diagnóstico (Hamel *et al*, 1995). Esta

prueba puede tener un valor especial donde se sospecha de baja contaminación viral, por ejemplo en productos biológicos, como son las vacunas (Harasawa, 1995). Se debe tener cuidado en la interpretación de los resultados, porque la detección del ARN viral no indica *per se* que el virus infeccioso esté presente. El hacer pruebas en cultivos celulares usando PCR debe evitarse si se han usado sueros comerciales en medio de crecimiento, porque invariablemente resultarán positivas (Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccines, 2000).

La técnica de RT-PCR es lo suficientemente sensible como para detectar vacas lactantes persistentemente infectadas en un hato de hasta 100 animales o más, a través del muestreo de células somáticas en leche de tanque. Un resultado positivo indica que por lo menos un animal PI está presente dentro de los animales en lactación del hato. Posteriormente se deben hacer pruebas de aislamiento viral o detección de antígeno individuales para identificar al animal (Drew *et al*, 1999).

2.6. Control y Prevención

La importancia del VDVB es tanto de carácter económico como sanitario. Uno, sino el más importante método para el control es identificar animales PI y descartarlos para prevenir la diseminación de la infección en animales susceptibles (Sanjuán, 1999). La eliminación de los animales PI constituye una ruptura a nivel del ciclo de infección del virus. A través de este método podrían obtenerse hatos libres de la enfermedad, sin embargo, el mantenimiento del estatus de libre en un hato es otro punto que debe analizarse ya que en la práctica es muy difícil lograrlo (Sanjuán, 1999).

Lindberg *et al* (1999) proponen un programa de control y erradicación del VDVB en una determinada región o país, el cual consta de 4 fases. Estas fases incluyen: identificación de hatos infectados y libres; monitorización y certificación de hatos libres mediante muestreos repetidos; eliminación del virus en hatos infectados mediante la eliminación de los animales PI; y, tomar medidas de control de la infección para prevenir la transmisión a hatos libres y evitar la reinfección en hatos previamente infectados.

En el Perú la infección por VDVB es endémica y está presente en la mayoría de hatos lecheros del país (Rivera, comunicación personal). Debido a estas características las estrategias de control deben centrarse en la **identificación y eliminación de animales PI** que son los principales difusores de la enfermedad, secundadas por diversas medidas de bioseguridad y monitoreos serológicos que con el tiempo permitirán la eliminación del virus del hato.

2.6.1. Vacunación:

Las vacunas comerciales contra el VDVB están disponibles desde 1959 (Bolin, 1995). Debido a que el VDVB 1 y el VDVB 2 son antigénicamente distintos uno del otro y que se han reportado brotes con VDVB 2 en hatos vacunados con VDVB 1 (Ridpath *et al*, 1994), se debe tener en consideración que los programas de vacunación deben incluir vacunas contra VDVB 1 y VDVB 2; actualmente las vacunas poseen ambos genotipos. Existen tanto vacunas a virus vivo modificado (MLV) como vacunas inactivadas y su uso dependerá de las necesidades particulares del hato

2.6.1.1. Vacunas a virus vivo modificado (MLV):

Las vacunas a virus vivo modificado son fáciles de producir y menos costosas, lo que las hace adecuadas para el ganadero. En teoría la respuesta inmune contra una MLV es de amplio rango y de mayor duración que la inducida por las vacunas inactivadas (Ridpath, 1998). Se recomienda la inmunización entre los 4 y 6 meses de edad, sin embargo se recomienda una re-vacunación antes del primer empadre (Bolin *et al*, 1995). Las desventajas de las vacunas MLV incluyen: enfermedad de las mucosas postvacunal, fallas reproductivas, inmunosupresión y recombinación genética (Ridpath y Bolin, 1995)

2.6.1.2. Vacunas Inactivadas:

Las vacunas inactivadas tienen la ventaja de no causar enfermedad de las mucosas, problemas reproductivos, inmunosupresión o recombinación a diferencia de las vacunas MLV. Además pueden administrarse de manera segura a animales preñados (Ridpath, 1998). Las desventajas de las vacunas inactivadas son su alto costo y la necesidad de que sean administradas en dos o más dosis. Debido a que los anticuerpos maternos pueden interferir con las vacunas inactivadas, éstas deben ser administradas periódicamente desde los 6 meses hasta el primer empadre (Bolin *et al*, 1995). Sin embargo y a pesar del uso masivo de las vacunas inactivadas existen estudios que indican que la protección que proveen las vacunas inactivadas es de corta duración (Harkness, 1987)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de Estudio:

El estudio fue realizado en un establo lechero de crianza intensiva ubicado en la irrigación Santa Rita, provincia de Siñüas, región Arequipa. El establo contó con aproximadamente 300 vacas en producción durante el año 2003 y no tiene programa de vacunación contra VDVB desde hace diez años atrás.

3.2. Historia del Hato:

El **problema sanitario** prevalente del hato es la presentación de abortos, que supera el 20% anual, por lo que en el año 2002 se decidió hacer un programa de control de VDVB. Con este fin, en enero del año 2002 se muestrearon todos los animales mayores de 6 meses para conocer el estatus serológico de los animales referente al VDVB, mediante la prueba de ELISA indirecta, dándose inicio al programa de control de VDVB en el hato. El estudio determinó que el 98,5% (590/600 animales) de los animales tenían anticuerpos contra el VDVB y de los diez animales seronegativos en la población de animales jóvenes, dos resultaron ser portadores (animales PI), por lo cual fueron beneficiados.

3.3. Materiales:

3.3.1. Animales:

Para el estudio se consideró el 100% de animales que iban cumpliendo seis meses de edad a la fecha de cada toma de muestra y que no habían tenido aún ningún servicio. La toma de muestras se realizó en 4 momentos del año: enero 2003, junio 2003, octubre 2003 y enero 2004.

3.3.4. Equipos:

Lector de ELISA (Labsystems Multiskan Plus), cabina de flujolaminar (Steril Gardhood), centrífuga (Selecta), estufa de 37° C (Gallenhamp), microcentrifuga (National labnet CO2), tubos de vacío (sistema vacutainer), con EDTA como anticoagulante, agujas vacutainer, 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.

3.3.5. Reactivos

Kit de ELISA de captura de antígenos de pestivirus de procedencia comercial (SVANOVA, Suecia). El cual consta de: placas de 96 hoyos cubiertas con anticuerpos monoclonales, contra la proteína no estructural 125 de los pestivirus, conjugado (anticuerpo monoclonal conjugado a peróxido de rábano silvestre (HRP)), control positivo muy fuerte (C1), control positivo fuerte (C2), control positivo débil (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.

3.3.6. Cultivos celulares:

Se utilizaron cultivos celulares de cornete nasal de feto bovino, libres de VDVB. Las células fueron cultivadas empleando medios de cultivos Eagle Esencial Médium (MEM) y Leibowitz (L-15) (SIGMA, USA), en una proporción de 50:50, suplementadas con el 10% de suero fetal bovinos libre de VDVB y antibióticos (SIGMA, USA)..

3.3.7. Cepa del VDVB:

La cepa del virus fue la cepa Singer, prototipo del biotipo CP genotipo I, procedente de USA y con título de 10^{-5} DI₅₀ CC/50 ìl.

3.4. Métodos:

3.4.1. Obtención de muestras.

Durante el período enero 2003 a enero 2004 se obtuvieron muestras de sangre entera, mediante punción de la vena caudal media (Goshal y Getty, 1967) utilizando tubos al vacío también sin anticoagulante del 100% de animales que iban cumpliendo seis meses, hasta antes del primer servicio. La toma de muestras se realizó en 4 momentos del año: enero 2003, junio 2003, octubre 2003 y enero 2004. A los animales que resultaron negativos a anticuerpos contra VDVB en cada período de muestreo se les volvió a tomar una muestra de sangre con y sin anticoagulante para la búsqueda de antígeno viral y para determinar la incidencia de infección en el hato.

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. En el laboratorio todas las muestras fueron centrifugadas para obtener el suero y fueron guardadas a -20°C hasta el momento de realizar la serología.

3.4.2. Detección de Anticuerpos contra VDVB:

Los anticuerpos contra el VDVB fueron detectados mediante la prueba de neutralización viral. De los animales que resultaron negativos a la prueba de neutralización viral se colectaron muestras de sangre con anticoagulante para la detección de antígeno de VDVB mediante la prueba de ELISA de Captura.

Las muestras fueron procesadas según el protocolo disponible en el laboratorio de Virología de la FMV de la UNMSM. A continuación se describe brevemente el procedimiento:

- Se descongeló un vial de virus y se mantuvo frío
- Se inactivaron los sueros a 56 °C por 30 minutos en baño María
- En una microplaca de 96 hoyos se colocaron 50 ìl de diluyente (MEM más antibiótico) en toda la placa. Cuando se trabajaron varias placas, los controles se colocaron solo en la primera placa.
- Se colocaron 50 ìl de cada suero problema y sueros controles, positivo y negativo en los hoyos de H.

- Con una micropipeta multicanal se tomaron 50 μ l (previa mezcla) de los hoyos de la fila H y se transfirieron a los hoyos de la fila G y de aquí a la fila F y así sucesivamente hasta el final (fila A). Las diluciones del suero fueron 1:2, 1:4, etc. Hasta 1:256.
- Se preparó el virus stock conteniendo las 100 DI_{50} CC/50 μ l
- Se prepararon controles de 100, 10, 1 y 0,1 dosis del virus.
- Se añadió 50 μ l del virus conteniendo las 100 DI_{50} CC a todas las diluciones de los sueros.
- Se agitó suavemente la microplaca y se incubó en estufa a 37 °C por 1 hora o por 18 horas en refrigeración.
- Se añadió 100 μ l de suspensión de células en una concentración de 3×10^5 células/ml a toda la microplaca y se incubó a 37°C y en 5% de CO₂ por 4 a 5 días.
- Se hizo la lectura siempre y cuando, la monocapa de los cuatro hoyos de la columna 9 exhibiera 100% de efecto citopático (ECP), el 50% en la columna 10 y ningún ECP en las columnas 11 y 12.

Interpretación:

El título de anticuerpos del suero fue la dilución más alta capaz de neutralizar entre 75 a 100 DI_{50} CC/50 μ l, del virus, evidenciado por la ausencia de lesión celular. Los títulos de suero iguales o mayores a la dilución 1:2 fueron considerados positivos a la presencia de anticuerpos.

3.4.3. Detección de antígeno:

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

- 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 descartó 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 descartó 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.
- 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 eliminó el contenido de la microplaca, se lavó tres veces con buffer de lavado, y secado sobre papel absorbente.
 - Se adicionó 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 agrego 50 ul de la solución de bloqueo a toda la microplaca.
 - Finalmente se procedió a la lectura a través de un espectrofotómetro con filtro de 450nm de absorvancia.

3.5. Análisis de Datos

3.5.1. Eliminación de animales PI:

En enero del 2003 se detectaron dos animales positivos a la presencia de antígeno viral. Estos animales fueron eliminados y es a partir de este momento en que se evalúa el efecto de su eliminación a través de todo el estudio.

3.5.1. Prevalencia.

Se determinó la prevalencia de animales positivos a anticuerpos contra el VDVB y de animales PI en los cuatro períodos de la toma de muestras mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{Número de Animales positivos a anticuerpos}}{\text{Total de animales de la muestra}} \times 100$$

3.5.2. Intervalo de Confianza:

La prevalencia fue expresada con intervalos de confianza (I.C.) de 95% según la siguiente fórmula:

$$P \pm Z \sqrt{\frac{P * Q}{n}}$$

Donde:

P = Prevalencia obtenida

Z = 95% de nivel de confianza

Q = 1 - p

N = Tamaño de muestra (número de animales)

Para determinar la prevalencia de animales PI se usó el mismo criterio arriba mencionado.

3.5.3. Incidencia

Se calculó la tasa de incidencia de nuevos casos durante los tres períodos correspondientes a los intervalos de tiempo entre una toma de muestra y otra; y posteriormente se calculó la incidencia global durante el período enero 2003 a enero 2004. Para tal efecto se utilizó la siguiente fórmula.

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{Número de nuevos casos en el período de tiempo en meses}}{\text{â (número de individuos susceptibles por el período de tiempo que estuvieron en riesgo, en meses)}}$$

3.5.4. Intervalo de confianza:

$$n \pm z_{1-\alpha} \frac{\bar{O}}{n}$$

Donde:

n: número de nuevos casos

z: 95% de nivel de confianza

Los individuos determinados susceptibles son aquellos que fueron negativos a la detección de anticuerpos específicos contra VDVB, mediante la prueba de neutralización viral, en cada período de muestreo.

3.5.5. Chi-Cuadrado (χ^2)

Se utilizó la prueba de Chi cuadrado para determinar si existía asociación entre el período de toma de muestra y la seropositividad de los animales. Se usó el mismo criterio para determinar asociación entre la edad y la seropositividad de los animales. Para tales fines se usó el software STATA ® para el análisis de datos. El nivel de significancia fue de 0,05.

3.5.6. Regresión Logística

Se utilizó el modelo de regresión logística para determinar el efecto de las variables, edad y período de toma de muestra sobre la positividad o negatividad de los animales muestreados para la infección con el VDVB. Para tales fines se usó el software STATA ® para el análisis de datos. El nivel de significancia fue de 0,05.

IV. RESULTADOS

En el Cuadro 1 y Figura 1 se presentan las seroprevalencias de VDVB y de animales PI en las cuatro tomas de muestra, durante el período enero 2003 a enero 2004. En enero 2003 se registra la mayor prevalencia $80,83 \pm 9,03\%$ (59/73). En las siguientes tomas de muestra se observa que la prevalencia va decreciendo hasta llegar a $22,86 \pm 13,91$ (8/35) en enero 2004.

De las muestras obtenidas en enero del 2003 que resultaron negativas (14/73) a la prueba de neutralización viral, dos fueron positivas a antígeno viral mediante la prueba de ELISA de Captura (Cuadro 2). En las siguientes tomas de muestra no se detectaron animales PI (Cuadro 2).

En el Cuadro 3 se presenta la tasa de incidencia de infección con VDVB en las vaquillas mayores a seis meses en el establo en estudio, durante el período enero 2003 a enero 2004. La tasa de incidencia para el período junio 2003 a octubre 2003 fue de 23/100 vaquilla/mes; para el período octubre 2003 a enero 2004 fue de 5/100 vaquilla/mes y se obtuvo una incidencia anual de 12/100 vaquilla/mes.

Los títulos de anticuerpos obtenidos estuvieron entre un rango de 2 a 256 (inversa de la dilución). El cuadro 4 muestra los títulos de la prueba de neutralización viral, a lo largo del período enero 2003 a enero 2004.

El Cuadro 5 muestra la distribución de edades y seropositividad de las vaquillas/terneras del hato lechero en estudio.

La prueba de Chi cuadrado demostró tanto una asociación entre el período de toma de muestra y la seropositividad en los animales ($P < 0.05$), como, una asociación entre la edad y la seropositividad de los animales ($P < 0.05$).

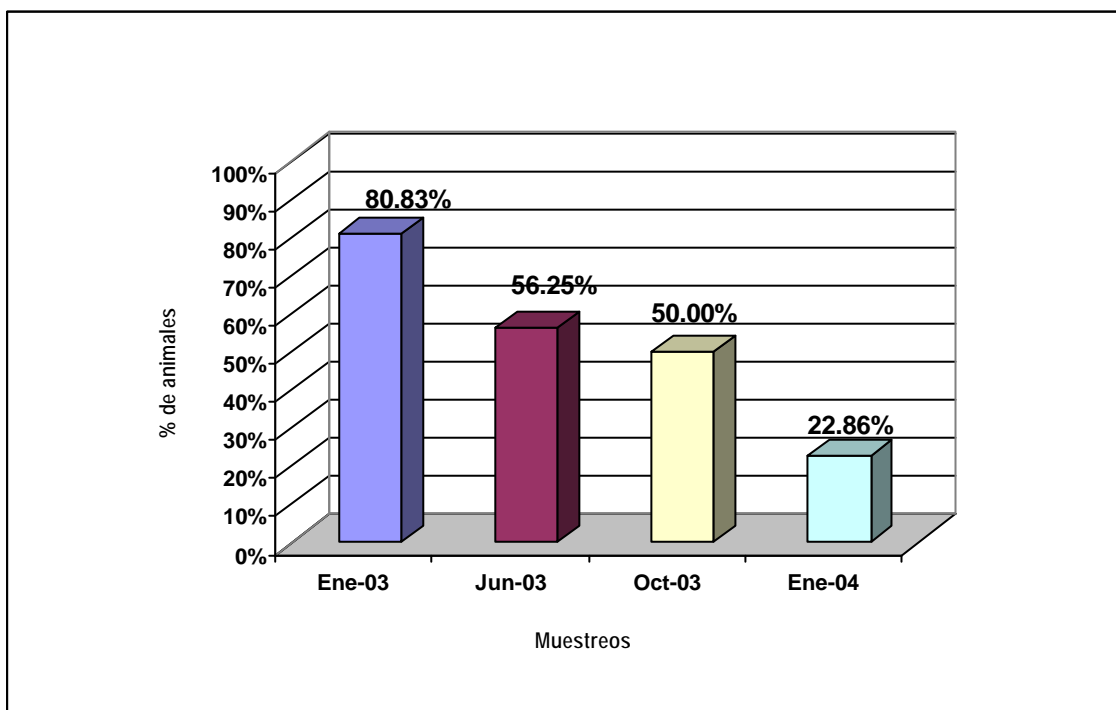
El modelo de regresión logística demostró que la edad (edades de 7 y 9 meses) era un factor de riesgo para la infección con VDVB en las terneras y vaquillas. Del mismo modo, se determinó

que los animales del período de toma de muestra enero 2003, tenían mayor riesgo de infección que los de las tomas posteriores (junio 2003, octubre 2003, enero 2004) (Cuadro 6).

Cuadro 1. Prevalencia del VDVB en terneras/vaquillas mayores a seis meses en el Establo en estudio, mediante la prueba de neutralización viral.

Período	Nº Animales	Animales Seropositivos	Prevalencia ± IC (%)
Enero 2003	73	59	80,83 ± 9,03
Junio 2003	48	27	56,25 ± 14,03
Octubre 2003	48	24	50,00 ± 14,15
Enero 2004	35	8	22,86 ± 13,91

Figura 1. Variación de la prevalencia de VDVB en terneras/vaquillas mayores a seis meses en el establo en estudio, durante el período enero 2003 a enero 2004, mediante la prueba de neutralización viral



Cuadro 2. Prevalencia de terneras/vaquillas persistentemente infectadas (PI) en el grupo de terneras y vaquillas del establo en estudio, mediante la prueba de ELISA de Captura.

Período	N° Animales	Animales PI	
		N°	%
Enero 2003	73	2	2.74
Junio 2003	48	0	0
Octubre 2003	48	0	0
Enero 2004	35	0	0
Total	204	2	0.98

Cuadro 3. Tasa de incidencia de infección con el VDVB, en vaquillas/terneras mayores a seis meses en el establo en estudio, durante el período Enero 2003 a enero 2004.

Período	N° de Animales Susceptibles	N° de Casos Nuevos	Incidencia (Vaquilla/mes)
Enero 2003 a Enero 2004	12	8	11/100
Junio 2003 a Octubre 2003	21	13	23/100
Octubre 2003 a Enero 2004	24	3	5/100
Enero 2003 a Enero 2004 (Global)	57	24	12/100

* **Nota:** La tasa de incidencia está indicada en número de animales que se infectan por cada 100 animales susceptibles.

Cuadro 4. Distribución de títulos de anticuerpos neutralizantes contra el VDVB detectados en las terneras/vaquillas en estudio, mediante la prueba de neutralización viral.

Período	Animales (n)	Inversa de Títulos de Anticuerpos							
		< 2		2 - 8		16 - 64		128 - >256	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Enero 2003	73	14	19,18	7	9,59	22	30,14	30	41,10
Junio 2003	48	21	43,75	2	4,17	7	14,58	18	37,5
Octubre 2003	48	24	50	0	0	3	6,25	21	43,75
Enero 2004	35	27	77,14	3	8,57	5	14,29	0	0
Total	204	86	42,16	12	5,88	37	18,14	69	33,82

Cuadro 5. Distribución de edad de terneras/vaquillas según resultado a la prueba de neutralización viral y período de toma de muestra.

		Edad de terneras/vaquillas en meses					
Período	Resultado NV	6	7	8	9	10	Total
Enero 2003	Positivas	23	12	12	5	7	59
	Negativas	7	2	4	1	0	14
Junio 2003	Positivas	8	6	5	8	0	27
	Negativas	11	5	3	2	0	21
Octubre 2003	Positivas	2	5	4	13	0	24
	Negativas	9	4	2	9	0	24
Enero 2004	Positivas	0	7	0	0	0	7
	Negativas	0	10	18	0	0	28
Total	Positivas	33	30	21	26	7	117
	Negativas	27	21	27	12	0	87

NV: Prueba Neutralización Viral

Cuadro 6. Riesgo de infección con el VDVB determinado por las variables edad y toma de muestra, según el modelo de regresión logística

Variables	Odds Ratio (OR)	Intervalo de Confianza
Edad: 7 meses	3,36	1,30 – 8,61 *
Edad: 8 meses	1,29	0,52 – 3,19
Edad: 9 meses	3,61	1,35 – 9,70 *
Período: Junio 2003	0,28	0,12 – 0,66 *
Período: Octubre 2003	0,16	0,06 – 0,41 *
Período: Enero 2004	0,05	0,02 – 0,16 *

(*): Existe diferencia estadística significativa ($P < 0,05$)

V. DISCUSIÓN

Actualmente pocos países, como Suecia, poseen un programa nacional de control y erradicación de la DVB, basado principalmente en la identificación y eliminación de los animales persistentemente infectados (PI), sin uso de vacunaciones (Synge *et al.*, 1999), así mismo, existen escasos estudios de evaluación del estatus de la DVB en un hato lechero post detección y eliminación de animales PI como una primera medida para el control de la DVB. En el Perú, la enfermedad no está sujeta a control y menos erradicación, pero recientemente el efecto negativo del VDVB en el rendimiento reproductivo de los animales ha motivado a contados ganaderos a iniciar medidas de control y erradicación del virus.

Previamente al estudio, uno de los primeros pasos para establecer el estatus del establo fue la determinación de la prevalencia del VDVB en el 100% de los animales mayores a seis meses (en el hato en estudio). El resultado fue que 98,5% (590/600) de los animales tuvieron anticuerpos contra el VDVB. Esta alta seroprevalencia en el hato fue una clara evidencia de la existencia de animales PI y efectivamente se encontraron dos terneras/vaquillas PI.

Iniciado el presente estudio, en enero del 2003, al analizarse 73 vaquillas que habían cumplido los seis meses de edad se encontró que el $80,83 \pm 9,03\%$ tuvieron anticuerpos contra el VDVB (Cuadro 1), y dos de estas vaquillas fueron PI (Cuadro 2). En los bovinos los anticuerpos pasivos no son detectados pasados a los seis meses de edad, por lo que los anticuerpos detectados en estos animales habrían sido inducidos por el virus de campo, diseminado principalmente por las dos (2) vaquillas PI, puesto que un animal PI es suficiente para infectar al 90% o más animales del hato (Houe, 1995). Además los anticuerpos neutralizantes detectados no corresponden tampoco a anticuerpos vacunales debido a la historia del establo de no haber utilizado vacunas como medida de prevención de la DVB en el hato. Si bien en la actualidad el hato es cerrado, la DVB en éste fue diagnosticada serológicamente casi dos décadas antes y a pesar de los serios problemas reproductivos y entéricos, donde el VDVB posiblemente jugó un rol importante, no se tomaron

medidas de control. La prevalencia de animales PI en el hato durante el período de doce meses fue de 0,98% (Cuadro 2), lo cual es similar a otros resultados de estudios en el país y en el mundo (Rivera *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 2002; Chacón *et al.*, 2002; Schreiber *et al.*, 1999), posiblemente el surgimiento de animales PI en el hato fue propiciado por el sistema de manejo, endemnicidad de la infección y por la falta de control.

La elevada seroprevalencia ($80,83 \pm 9,03\%$, 59/73) del VDVB en bovinos lecheros del hato en estudio corrobora una amplia infección previa a la eliminación de los animales portadores (PI) (Figura 1). Estos resultados son parecidos a los encontrados en otras cuencas lecheras del país, como son la de Junín, Lima, Cajamarca, Cuzco, donde se encontraron prevalencias superiores a 70% (Contreras, 2000; Alvarez *et al.*, 2002; Stähl, 2002; Rivera, 2003). De la misma manera estos resultados concuerdan con resultados encontrados en otros países como Estados Unidos (89%), Croacia (79%) y son superiores a los encontrados en países como España (64%), Suiza (57,6%), Dinamarca (64%), Canadá (57,6%), lo cual indica la amplia distribución a nivel mundial del VDVB (Houe, 1995). La prevalencia de $80,83 \pm 9,03$ (59/73) obtenida en enero 2003 fue superior a la encontrada en los períodos siguientes posteriores a la eliminación de los animales PI, teniendo prevalencias de $56,25 \pm 14,03\%$ (27/48) en junio 2003, $50,00 \pm 14,15\%$ (24/24) en octubre 2003 y $22,86 \pm 13,91\%$ (8/35) en enero 2004 (Cuadro 1).

En junio y octubre de 96 vaquillas muestreadas (48 en cada período), el $56,25 \pm 14,03\%$ (27/48) y $50 \pm 14,15\%$ (24/48) resultaron con anticuerpos, respectivamente, y en ambos grupos no se detectaron vaquillas PI. En enero del 2004, solo 8 vaquillas de 35 ($22,86 \pm 13,91\%$) analizadas tuvieron anticuerpos contra el VDVB y tampoco hubieron animales PI. La prevalencia en el hato bajó a $22,86 \pm 13,91\%$ (Cuadros 1 y 2, Figura 1). Estos resultados muestran la probable eficacia del control de la DVB mediante la eliminación de los animales reservorios del virus sin la necesidad del uso de vacunas. La presencia de anticuerpos posterior a la eliminación de los animales PI sugiere que aún el virus estuvo en este lote de animales susceptibles posiblemente ocasionando infecciones subclínicas o quizás tal vez el virus ingresó desde el exterior por fallas en las medidas de bioseguridad (Nettleton *et al.*, 1995). En posteriores análisis no se detectaron anticuerpos contra el VDVB ni animales PI en el 100% de nuevas terneras/vaquillas muestreadas en marzo (n=22) y mayo (n=28) del 2004 (Rivera, comunicación personal).

Las vaquillas que resultaron negativas a anticuerpos con el VDVB en enero (n=14), junio (n=21) y octubre (n=24) del 2003, fueron nuevamente muestreadas entre los 4 a 5 meses posteriores a cada toma de muestra, determinándose una tasa anual de incidencia de 12/100 animales susceptibles (Cuadro 3). Estos resultados indican que si bien había virus en este lote de animales, éste no tuvo oportunidad de establecerse por la habilidad de las terneras y vaquillas de seroconvertir en anticuerpos y remover al virus antes de llegar a la etapa reproductiva. Sin embargo, debe tenerse

presente que la eliminación del virus del hato a través de la identificación y remoción de los animales PI, sumado al monitoreo serológico son herramientas para el control y erradicación de la DVB del hato, siempre y cuando en el establo se tengan buenas medidas de bioseguridad.

El 41% de las vaquillas seroreactoras detectadas en enero del 2003, tuvieron títulos de anticuerpos entre 1:128 y $> 1:256$, seguidos por aquellas (30%) con títulos entre 1:16 a 1:64, repitiéndose la misma tendencia hasta octubre del 2003 (Cuadro 4). Los variados títulos de anticuerpos detectados en todos los grupos de terneras y vaquillas indica una intensa actividad viral, los títulos menores podrían indicar infecciones recientes ya que los anticuerpos pueden ser detectados entre una a tres semanas posteriores a la infección, incrementándose hasta alcanzar la meseta entre 10 a 12 semanas con títulos superiores a 1:256 (Brownlie, 1990), por su parte, Fredriksen *et al.* (1999) menciona que los niveles de anticuerpos pueden también estar influenciados por la naturaleza de la cepa viral presente en el hato y también por la cepa viral empleada como antígeno en la prueba de neutralización viral debido a la amplia variación de las cepas de campo.

El análisis de regresión logística demostró que cuanto mayor era la edad de los animales, mayor era el riesgo de infección con VDVB. Los animales de 7 y 9 meses tienen un riesgo de infección 3,36 y 3,61 veces mayor que los animales de seis meses. En los animales de 8 meses no se encontró un mayor riesgo de infección que en los de 6 meses. Los resultados concuerdan con Mainar Jaime (2001), el cual encontró que la edad de los animales era un factor de riesgo para la infección con VDVB.

El efecto de la eliminación de los animales PI se aprecia de manera notable con el modelo de regresión logística. Los OR hallados en los diferentes períodos de toma de muestra: 0,28 para junio 2003, 0,16 para octubre 2003 y 0,05 para enero 2004, indican que la eliminación de los animales PI en enero 2003 reduce el riesgo de infección con VDVB en los subsecuentes períodos de toma de muestra. Los animales tienen 72%, 84% y 95% menos probabilidades de infectarse en los períodos de junio, octubre y enero 2004, respectivamente, que los de enero del 2003, sin importar la edad al momento del muestreo (ajustado por edad). Se demostró además que a mayor edad de los animales, mayor era el riesgo de infección con VDVB. Los animales de 7 y 9 meses tienen un riesgo de infección 3,36 y 3,61 veces mayor que los animales de seis meses, sin importar el período de muestreo (ajustado por tiempo). En los animales de 8 meses no se encontró un mayor riesgo de infección que en los de 6 meses. Los resultados concuerdan con Mainar-Jaime (2001), el cual encontró que la edad de los animales era un factor de riesgo para la infección con VDVB.

Teniendo en cuenta el rol epidemiológico tan importante de los animales PI en la difusión y mantenimiento de la infección (Houe, 1995), el estudio de la dinámica de infección post eliminación de animales PI podría servir para cuantificar los efectos de las medidas de control y

erradicación del VDVB, basadas en la eliminación de animales portadores (PI). Finalmente, una de las consecuencias del amplio conocimiento de la patogénesis de la DVB es que la enfermedad puede ser controlada y erradicada sobretodo en hatos lecheros de crianza intensiva por el escaso riesgo de contacto con otros animales de otras especies (Bezek, 1995). El resultado de este estudio, tendría un efecto multiplicador en los demás hatos lecheros de crianza intensiva de la región, ya que la mayoría tienen similares características al hato en estudio.

VI. CONCLUSIONES

1. La prevalencia del VDVB en el hato en estudio post eliminación de animales PI se redujo de $80,83 \pm 9,03\%$ a $22,86 \pm 13,91\%$ en un período de 12 meses.
2. La eliminación de animales persistentemente infectados (PI) redujo el riesgo de infección con el VDVB en los animales susceptibles.
3. La edad es un factor de riesgo para la infección con el VDVB. A mayor edad aumenta el riesgo de infección con VDVB.
4. Los efectos del control de la DVB en el hato mediante la eliminación de animales PI y evaluación serológica fueron progresivos, como lo indican los resultados de la incidencia de infección del hato.
5. La prevalencia de animales PI en el hato fue similar a la reportada en la literatura.

VI. LITERATURA CITADA

1. Álvarez, S. 2002. Detección de anticuerpos contra pestivirus en rumiantes en una comunidad campesina de la provincia de Canchis, Cusco. *Rev Inv Vet. Perú.* 13(1): 46-51.
2. Archbald, L., Fulton, R., Seger, C., Al-Bagdadi, F., Godke, R. 1979. Effects of the bovine viral diarrhea (BVD) virus on preimplantation bovine embryos: a preliminary study. *Theriogenology.* 11(9):81
3. Baker, J. 1987. Bovine viral diarrhea virus: A Review. *JAVMA* 190 (11):1449–1458.
4. 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.
5. Baker, J. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11:425.
6. Barber, D. and Nettleton. P. 1993. Investigations into bovine diarrhea virus in a dairy herd. *Vet Rec.* 133:549-550.
7. Baszler, T., Evermann, J., Kaylor, P., Byington, T., Dilbeck, P. 1995. Diagnosis of naturally occurring bovine viral diarrhea virus infection in ruminants using monoclonal antibody-based immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 32:609-618.
8. Baule, C., M. van Vuuren, J. P. Lowings, and S. Belák. 1997. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses isolated in Southern Africa. *Virus Res.* 52:205-220
9. Benito, A., Chacón, J., Rivera, H. 2001. Técnicas diagnósticas disponibles para el estudio de la diarrea viral bovina en el Perú. *Rev Inv Vet, Perú. Suplemento* 1:387-390.
10. Bezek DM.1996. Bovine Virus Diarrhea Virus Infection: Individual and Herd Diagnosis. *The Compendium,* Pp.57-62.
11. Bielefeldt-Ohmann, H. 1995. The pathologies of bovine viral diarrhea virus infection. *Vet clin North Am Food Anim Pract.* 11:447.

12. Bishai, F. 1974. Neutralization test. In: Virology Manual. Ministry of Health, Ontario, Canada. Pp:214-215.
13. Bitsch, V. y L. Ronsholt. 1995. Control of bovine viral diarrhoea virus infection without vaccines. *Vet Clin North Am Food Animal Practice* 11(3):627-640.
14. Biuk-Rudan, N., Cvetnic, S., Madic, J., Rudan, D. 1999. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders *Theriogenology*. Apr 1. 51(5):875-81.
15. Björkman, C., Alenius, S., Emanuelsson, U., Uggla, A. 2000. *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *The Veterinary Journal*. 159:201-206.
16. Bolin, S. 1995. The pathogenesis of mucosal disease. *Vet Clin North Am*. 11:489-500.
17. Bolin, S., Ridpath, J., Black, J., Macy, M., Roblin, R. 1994. Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. *J Virol Methods*. 48, 211-221.
18. Bolin, S., McClurkin, A., Cutlip, R., Coria, M. 1985. Response of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus to vaccination for bovine viral diarrhoea and to subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *American Journal of Veterinary Research*. 46:2467-2470.
19. Braun, U., Schonmann, M., Ehrensperger, F., Hilbe, M., Strasser, M. 1999. Intrauterine infection with bovine virus diarrhoea virus on alpine communal pastures in Switzerland. *Zentralbl Veterinarmed A*. Feb, 46(1):7-13.
20. Brownlie, J., Clarke, M., Howard, C. 1984. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Veterinary Record*. 114:535-536.
21. Brownlie, J. 1991. The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch Virol* 3:79-96.
22. Brownlie, J., Clarke, M., Hooper, L., Bell, G. 1995 Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. *Vet Rec*. 137(3):58-62.
23. Castro, J., Gómez tejedor, C., Solana, A. 1984. Distribución de la diarrea vírica bovina en España. *Med Vet*. 1:181.
24. Chacón, J. 2001. Identificación de animales persistentemente infectados con el virus de la diarrea viral bovina en 02 establos lecheros de crianza de Lima. Tesis bachillerato. Fac Med Vet Univ Nac Mayor San Marcos. Lima.
25. Chi, J., VanLeeuwen, J., Weersink, A., Keefe, G. 2002. Management factors relates to seroprevalences to bovine viral diarrhoea virus, bovine-leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy herds in the Canadian maritimes. *Preventive Veterinary Medicine* 55:57-68.

26. Contreras, H. 1999. Prevalencia del VDVB en bovinos del valle del Mantaro. Tesis bachillerato. Fac Med Vet Univ Nac Mayor San Marcos, Lima. Pp:43.
27. Corapi, W., Donis, R., Dubovi, E. 1988. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea virus infections. *Journal Virology*. 62:2823-2827.
28. Corrales, J., Sanjuán, M.; García, C. J. 1999. Epidemiología e importancia económica de la diarrea vírica bovina. En E.Yus y M.L. Sanjuán. Eds. *Diarrea vírica bovina*. Consejo General de Médicos Veterinarios de España. 24:9-24.
29. David, G., and Gunning, R. 1994. Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associates with BVD virus infection. *Vet Rec*. 134:468-472.
30. Drew, T., Yapp, F., Paton, D. 1999. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Vet. Microbiol*. 64:145-154.
31. Dubovi, E. 1996. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Veterinary Medicine*. 9:867-872.
32. Edwards, S. 1990. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Rev Sci. Tech Off Int Epiz* 9:115-130.
33. Endsley, J., Roth, J., Ridpath, J., Neill, 2003. Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals*. Jun, 31(2):123-5.
34. Fenner, F., Gibbs, P., Murphy, F., Studdert, M.; White, D. 1992. *Virología veterinaria*. Ed. Acribia, España. Pp:477-481.
35. Frediksen, B., Sándwich, T., Loken, T., Odegaard, 1999. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhea virus. *Vet. Record*. 144:111-114.
36. Goshal, N., and Getty, R. 1967. Arterias y corazón de los ruminates. En: *Anatomía de los animales domésticos*. Eds. Sisson y Grossman. 5ta ed. Ciencia y Cultura Latinoamérica SA. México. Pp:1095-1096.
37. Hamers, C., Lecomte, C., Kulesar, G., Lambot, M., Pastoret, P. 1998. Persistently infected cattle stabilise bovine viral diarrhea virus leading to herd specific strains. *Vet Microbiol*. 61(3):177-182.
38. Harasawa, R. 1995. Adventitious pestivirus RNA in live virus vaccines against bovine and swine diseases. *Vaccine*, 13:100-103.
39. Harkness, J., Roeder, P., Drew, T., Wood, L., Jeffrey, M. 1987. The efficacy of an experimental inactivated BVD-MD vaccine. In: *pestivirus infections of ruminants*. Ed. Brussels. Pp:233-250.
40. Hertig, C., Stalder, H., Peterhans, E. 1995. Genetic heterogeneity within the coding regions of E2 and NS3 in strains of bovine viral diarrhea virus. *Gene* 153(2)191-195.

41. Hibberd, R., Turkington, A., Brownlie, J. 1993. Fatal bovine viral diarrhoea virus infection of adult cattle. *Vet Rec* 132:227-228.
42. Hornizek, M. 1981. Non-arthropod-borne togaviruses. Experimental virology series. Ed. Tinsley, T. and Brown, F. Academic Press, London. pp:200.
43. Houe, H., Meyling, A. 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.
44. Houe, H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Animal Practice* 11(3):521-547.
45. Hurley, D. 1996. Bovine viral diarrhoea virus: a practitioner's guide to immunology of bovine diarrhoea virus. *Large animal veterinarian*. 51(3):24-29.
46. INEI, 1994. Censo agropecuario. Disponible en: <http://www.inei.gob.pe>
47. Kelling, C. 1996. The effects of bovine diarrhoea virus infection on cattle. *Veterinary Medicine*. 9:862-863.
48. Kirkland, P., Mackintosh, S. Moyle, P. 1994. The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. *Vet Rec* 135: 527-529.
49. Kramps, J., Maanen, C., Van de Wetering, g., Stendas, G. 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.
50. Lértora, W. 2003. Diarrea viral bovina: actualización. *Rev Vet*. 14:42-51
51. Lindberg, A., Groenendaal, H., Alenius, S., Emanuelssons, U. 2001. Validation of a test for dams that carry fetuses persistently infected with bovine viral diarrhoea virus based on determination of antibody level in late pregnancy. *Prev Vet Med*. 51:199-224.
52. Lindberg, A., and Alenius, S. 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet Microbiol*. 64, 197-222.
53. Mainar-Jaime, R., Berzal-Herranz, B., Arias, P., Rojo-Vásquez, F. 2001. Epidemiological pattern risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from de Asturias region of Spain. *Prev Vet Med*. 52:63-73.
54. Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccines. 2000. Chapter X.5. Bovine viral diarrhoea. OIE World Organisation for Animal Health. Disponible en: <http://www.oie.int/>
55. McClurkin, A., Littledike, E., Cutlip, R., Coria, H., Bolin, S. 1984. Production of cattle immunotolerant to BVD virus. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 27:162-164.
56. McGowan, M. and Kirkland, P. 1995. Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *Br Vet J*. 151(3):263-270.

57. Meyers, G., Tautz, N. 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.
58. Meyers, G., Tautz, N., Dubovi, E., Stark, N., Brownlie, J., Collet, M., Thiel, H. 1991. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology*. 191(2):368-386.
59. Meyling, A. 1984. Detection of BVD virus in viraemic cattle by an indirect immunoperoxidase technique. *Recent advances in virus diagnosis*. P:37-46.
60. Morales, S. 2002. Detección de terneros con infección congénita con el virus de la diarrea viral bovina en dos hatos lecheros de la provincia de Arequipa. Tesis Bachillerato. Fac Med Vet Univ Nac Mayor San Marcos. Lima.
61. Nettleton, P. F. & Entrican, G. 1995. Ruminant pestiviruses. *Br Vet J*. **151**:615-642.
62. Niskanen, R., Lindberg, A., Larsson, B., Alenius, S. 1996. Primarily BVDV-infected calves as transmitters of the infection. *Proceedings of the World Buiaiatrics Congress, Edinburg, UK, July 8-12- pp:593-595*.
63. Niskanen, R. (1993). Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet Rec*. 133:341-344.
64. Njaa, B., Clark, E., Jansen, E., Ellis, J., Haines, D. 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.
65. Odeón, A., Clayton, L., Kelling, D., Marshall, E., Edward, S., Dubovi, E., Donis, R. 1999. Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus genotype II (NY-93). *J Vet Diagn Invest*. 11:221-228.
66. Paton, D.J. 1995. Pestivirus diversity. *J Comp Path*. 112:215-236.
67. 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. *Virology* 203: 260-268.
68. Peterhans, E., Jungi, T., Schweizer M. 2003. BVDV and innate immunity. *Biologicals*. 2003 Jun; 31(2):107-12.
69. Revell, S., Chasey, D., Drew, t., Edwards, S. 1988. Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec*. 123:122-5.
70. Ridpath, J., Neill, J., Frey, M., Landgraf, L.. 2000. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 bvdv from North America. *Vet Microbiol*. 77:145-155.
71. Ridpath, J., and Bolin, S. 1995. Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhoea virus in calves. *Am J Vet Res*. 56:755-759.

72. Ridpath, J., Bolin, S., Dubovi, E. 1994. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology*. 205:66-74.
73. Rivera, H, Álvarez, S. Pezo, D. García, W. 2002. Detección de anticuerpos contra pestivirus en rumiantes de una comunidad campesina de canchis, cusco. *Rev Inv Vet Perú*. 13(1):46-51.
74. Rivera, H. 2001 Causas frecuentes de aborto bovino, *Rev Inv Vet Perú*. 12(2):117-122.
75. Rivera, H., A. Manchego, N. Sandoval, A. Vargas, A. Araujo, A. Gonzales., Rosadio, R. 1993. Aborto infeccioso en bovino de leche del Valle de Lima. *Rev Inv Pec IVITA*. Perú. 6(1):31-37.
76. Rüfenatch, J., Schaller, P., Audige, L., Knutti, B., Küpfer, U., Peterhans, E. 2001. The effect of infection with bovine viral diarrhea virus on the fertility of swiss diary cattle. *Theriogenology*. 56:199-210.
77. Sandvik, T. and J. Krogsrud. 1995. Evaluation of an antigen capture ELISA for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle blood samples. *J Vet Diagn Invest* 7: 65-71.
78. Sandvik, T. 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet Microbiol*. 64:123-134.
79. Sanjuán, M., García, C., Corrales, J. 1999. Etiopatogenia 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.
80. Schreiber, P., Dubois, F., Dreze, F., Lacroix, N., Limbourg, B., Coppe, P. 1999. Prevalence of bovine virus diarrhea virus infection in Belgian white blue cattle in southern Belgium. *Vet. Quart*. 21:28-32.
81. Shannon, A., Richards, S., Kirkland, P., Moyle, A. 1991. An antigen-capture ELISA detects pestivirus antigens in blood and tissues of immunotolerant carrier cattle. *J Virol Methods*. 34:1-12.
82. Singh, E., Eaglesome, M., Thomas, F., Hare, N. 1982. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. The in-vitro exposure of preimplantation embryos of akabane, bluetongue and bovine viral diarrhea viruses. *Theriogenology*. 17:437-444.
83. Smith, B. 1996. *Bovine virus diarrhea: mucosal disease: large animal internal medicine*. Mosby Publications. Pp:806-814.
84. Ståhl, K., Rivera, H., Vågsholm, I., Moreno-López, J. 2002. Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. *Prev Vet Med*. 56:193-202.
85. Synge, B., Clark, A., Moar, J., Nicolson, J., Nettleto, P., Herring, J., J. 1999. The control of bovine virus diarrhea virus in Shetland. *Veterinary Microbiology*. 64:223-229.
86. Tautz, N., Thiel, H., Dubovi, E., Meyers, G. 1994. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J Virol* 68: 3289.

87. Tremblay, R. 1996. Transmission of bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Medicine*. 9:858-866
88. Valle, P., Martin, S., Tremblay, R., Bateman, K. 1999. Factors associated with being a bovine-virus diarrhea (BVD) seropositive dairy herd in the More and Romsdal county of Norway. *Prev Vet Med*. 40:165-177.
89. VanLeeuwen, J., Keefe, G., Tremblay, R., Power, C., Wichtel, J. 2001. Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus in maritime Canada dairy cattle. *Can Vet J*. Mar;42(3):193-8.
90. Vanroose, G., Nauwinck, H., Van Soom, A., Vanopdenbosch, E., de Kruif, A. 1998. Replication of Cytopathic and Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus in Zona – Free and Zona – Intact In Vitro – Produced Bovine Embryos and the Effect on Embryo Quality. *Biology of Reproduction*. 58: 857 – 866.
91. Vega, S., Bayon, M., Jiménez., T., Asensio, A., Mirat, F. Cid, D., De la Fuente, R. 1997. Proc 3rd ESVV Symp Pestivirus infections, Lelystad, Netherlands, 19-20 Sep. 16-119.
92. Van Rijn, P., Van Gennip, H., Leendertse, C., Brusckhe, C., Paton, D., Moormann, R., Van Oirschot. 1997. Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology* 237:337-348.
93. Vilcek, S., Mojzisova, J., Bajova, V., Paulik, S., Strojny, L., Durkovic, B., Hipikova V. 2003. A survey for BVDV antibodies in cattle farms in Slovakia and genetic typing of BVDV isolates from imported animals. *Acta Vet Hung*. 51(2):229-36.
94. Weiss, M., Hertig, C., Strasser, M., Vogt, H., Peterhans, E. 1994. Bovine virus diarrhea/mucosal disease: eine Übersicht, *Schweiz Arch Tierheilk*. 136:173-185.
95. Wengler. 1991. Family *Flaviviridae* In: classification and nomenclature of viruses, ed. Francki, R. Frauquet, C. Knudson, D., Brown, F. Berlin . Germany. 5th ed pp:223-233.
96. Werdin, R., Ames, T., Goyal, S., DeVries, G. 1989. Diagnostic investigation of bovine viral diarrhea infection in a Minnesota dairy herd. *J Vet Diagn Invest*. 1:57-61.
97. Wilhelmsen, C., Bolin, S., Ridpath, J., Cheville, F., Kluge, J. 1991. Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhea. *Am J Vet Res*, 52, 269-275.
98. Xue, W., Zhang, S., Minocha, H. 1997. Characterization of a putative receptor protein for bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol*. 57(3):105-118.
99. Xue, W., Blecha, F., Minocha, H. 1990. Antigenic variation in bovine viral diarrhea viruses detected by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*. 28(8):1688-1693.