

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Asociación de la presencia de anticuerpos contra
pestivirus con problemas reproductivos en borregas en
una empresa de la sierra central durante la campaña
2003**

TESIS

para optar el título de Médico Veterinario

AUTOR

Daniel Flores Bustamante

Lima-Perú

2008

Este trabajo está dedicado a todos aquellos que siguen sus sueños, a quienes nunca pierden la fe, ni dejan de creer en sí mismos. Está dedicado a la más noble de las profesiones:
LA MEDICINA VETERINARIA

*A mis padres por todo el apoyo
que me han dado durante toda
una vida, son el mejor ejemplo a
seguir.*

*A mi directora de tesis, Dra.
Hermelinda Rivera, por su apoyo,
paciencia y por creer en mí,
gracias.*

*Al Dr. Gamarra, a la Dra.
Nieves, al Dr. Gavidia, por el
asesoramiento en el desarrollo
de esta tesis.*

*A mis amigos Dra. Andrea Flores
y Dr. Carlos Delgado, gracias
chicos por acompañarme en el
viaje.*

*Al Dr. Carlos Angulo, amigo de
toda la vida, por estar ahí
cuando se le necesita, muchas
gracias.*

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	viii
Summary	ix
Lista de Cuadros	x
I Introducción	1
II Revisión de Literatura	3
A. Características Pecuarías de la SAIS Tupac Amaru	3
B. Pestivirus	4
1. El Virus de la Enfermedad de la Frontera	5
2. El Virus de la Diarrea Viral Bovina	5
3. Biotipos	5
4. Genotipos	7
C. Patogénesis	9
1. Infección Aguda	10
2. Infección Subclínica	10
D. Control	13
1. Identificación y eliminación de animales persistentemente infectados	13
2. Manejo Sanitario	13
3. Vacunación	14
E. Diagnóstico	15
1. Aislamiento Viral	15
2. Detección de Antígeno Viral	16
3. Detección de Anticuerpos	16
4. Reacción en Cadena por la Polimerasa	17

III	Materiales y Métodos	19
	A. Materiales	19
	1. Lugar	19
	2. Animales	19
	3. Muestreo	19
	4. Grupos	20
	5. Reactivos y cultivos Celulares	20
	6. Cepa del VDVB	20
	B. Métodos	20
	1. Colección y procesamiento de muestras	20
	2. Detección de Anticuerpos Pestivirales	21
	3. Tamaño Muestral	22
	4. Análisis de Datos	23
IV	Resultados	24
V	Discusión	27
VI	Conclusiones	30
VII	Literatura Citada	31

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Presencia de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en borregas según grupo de estudio. 2003	24
Cuadro 2. Presencia de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en borregas según la zona de estudio. 2003	24
Cuadro 3. Presencia de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en borregas con problemas reproductivos según zona de estudio. 2003	25
Cuadro 4. Título de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en borregas del grupo CASO (n= 162) según zona de estudio. 2003	26
Cuadro 5. Título de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en borregas del grupo CONTROL (n= 144) según zona de estudio. 2003	26

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la asociación del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) y los problemas reproductivos de borregas de una empresa de la sierra central del país. Con este fin se seleccionaron 440 borregas de las localidades de Casaracra y Consac divididas en grupo Caso (n=220) constituido por borregas que presentaron abortos, vacías simples, vacías dobles; y en el grupo Control (n=220) constituido por borregas que no presentaron problemas arriba indicados. De cada grupo se colectaron muestras de sangre durante la faena del perneo, para la detección de anticuerpos contra el VDVB mediante la prueba de neutralización viral. El 69.5 + 4.4% (306/440) de las borregas presentaron anticuerpos contra el VDVB correspondiendo 73.6 + 6.1% (162/220) al grupo Caso y el 65.5 + 6.5% (144/220) al grupo control. Las borregas de ambas localidades presentaron anticuerpos contra el VDVB. No hubo asociación estadística entre la presencia de animales con anticuerpos contra el VDVB y la presencia o ausencia de problemas reproductivos ($p > 0.05$), tampoco hubo asociación entre las variables seropositividad y lugar de procedencia de las borregas. Los títulos de anticuerpos contra el VDVB tanto en el grupo Caso como en el grupo Control estuvieron dentro de un rango de 2 a mayor a 256. Los resultados indican que el VDVB está difundido en la población de borregas de la empresa, pero su rol en la presentación de los problemas reproductivos de las borregas durante la campaña del 2003 no ha sido establecido.

Palabras clave: borregas, pestivirus, diarrea viral bovina, aborto, anticuerpos, neutralización viral.

SUMMARY

The aim of the present study was to determine the association between Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and reproductive failure in ewes from an enterprise peruvian central sierra. Four hundred and forty ewes were randomly selected from two counties and divided in two groups. The first group (n=220) included barren and aborting ewes while the second group (n=220) was formed by ewes that had no shown any of the problems noted above. Blood samples were collected from both groups for testing antibodies against BVDV using the virus neutralization test. Antibody titers to BVD virus were present in 69.5 + 4.4% (306/440) of the ewes. In the first group, 73.6 + 6.1% (162/220) of the ewes showed antibody titers to BVD virus; and 65.5 + 6.5% (144/220) in the second group. Ewes from both counties showed antibodies against BVDV. There was no association between ewes showing antibodies against BVDV and the presence (or absence) of reproductive failure ($p>0.05$). Antibody titers to BVD virus in both groups ranged from 2 to > 256. These results indicate that BVDV is widely spread in ewes from this enterprise and its role as a causative of reproductive failure during 2003 parturition is still to be determined.

Key words: ewes, pestivirus, bovine viral diarrhea, abortion, antibody, neutralization test.

I. Introducción

El ovino es una de las especies domésticas más cosmopolitas del mundo. Existen 328 razas principales y más de 605 tipos, líneas y variedades creadas por el hombre que prosperan en diferentes ambientes con características propias. Países como Inglaterra, Australia, Rusia, Sudáfrica, China, Argentina, Estados Unidos y Nueva Zelanda, son líderes en explotación ovina (DGIA, 2002)

En el Perú, la crianza de ovinos se inicia con la introducción del ovino “Churro” Español durante la conquista. Al inicio se estableció en los valles de Lima, para posteriormente ser criados definitivamente en la Sierra, donde más del 97% de la población, de 13 millones de cabezas que tiene el país, es explotada. Los departamentos con mayor población ovina son Puno, Cusco y Junín (INEI, 1994).

La crianza ovina constituye el sustento de las comunidades altoandinas, de manera directa o indirecta, donde la topografía accidentada, baja calidad de las pasturas nativas y la altura hacen difícil el desarrollo de la agricultura y crianza de vacunos. Sin embargo, a pesar del impacto socio económico de la crianza ovina, solo un 30% de la población son criados con un nivel tecnológico adecuado y están en manos de empresas asociativas (CAPs y SAIS), mientras el 70% restante está en manos de comunidades campesinas y pequeños productores, constituyendo el sustento de numerosas familias.

El Perú llegó a tener más de 15 millones de ovinos (Gamarra, comunicación personal), pero en la actualidad varios son los factores que limitan su producción, no

solo en el Perú sino también en el mundo. Sin duda uno de estos factores, aunque no el más importante, es el aspecto sanitario. En empresas con sistemas de producción tecnificados, el aspecto sanitario, de origen parasitario, bacteriano y viral, ocasiona problemas respiratorios, gastroentéricos y reproductivos (Ameghino, E. 1985, 1988). Muchos de estos agentes infecciosos son abortogénicos por afectar la reproducción y producción como la *Neospora caninum*, *Brucella ovis*, *Brucella melitensis*, *Leptospira sp.*, *Salmonella sp.*, pestivirus de rumiantes (diarrea viral bovina y enfermedad de la frontera) (Kirkbride y Johnson, 1989).

Los pestivirus pueden ocasionar nacimientos prematuros o corderos débiles que mueren dentro de pocas horas o días después del nacimiento. Las borregas raramente muestran signos clínicos antes de abortar. Frecuentemente, la causa de aborto no logra ser determinada, pero el 50% se encuentra asociado con agentes infecciosos, los cuales pueden ser de origen bacteriano o viral (Rosadio y Ameghino, 1999). Los pestivirus, cuyo rol ha sido bien estudiado en otros rumiantes, están asociados a los problemas reproductivos debido a su capacidad de atravesar la placenta e infectar al feto. El feto afectado puede nacer débil y en alguno de ellos la fibra de lana es reemplazada por pelo (20% del total de corderos rechazados) (Rosadio y Ameghino, 1999; Gamarra, comunicación personal).

La habilidad de los pestivirus de cruzar la barrera interespecies es favorecida cuando el rebaño ovino se encuentra en estrecha relación con ganado bovino, como ocurre en sistemas de crianza mixto (Álvarez *et al.*, 2001), donde el ganado bovino infectado con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es la principal ruta para la infección en ovinos. (Waage, 1997)

El presente estudio de caso-control tuvo por objetivo determinar la asociación entre la presencia de anticuerpos contra el VDVB y la ocurrencia de problemas reproductivos caracterizados por abortos, borregas vacías por primera vez conocidas como vacía simple y borregas con dos pérdidas conocidas como vacía doble provenientes de una empresa ovejera de la sierra central durante la campaña 2003.

II. Revisión de Literatura

A. Características Pecuarías de la SAIS

La SAIS Túpac Amaru comprende las unidades de producción de Atocsaico, Casaracra, Cochabamba, Consac, Pachacayo, Pucará y Quiulla, en las jurisdicciones de las provincias de Jauja, Junín, Tarma y Yauli, del departamento de Junín. Los campos que son pastoreados se hallan entre los 3500 y los 4700 msnm y exhiben un relieve topográfico relativamente suave y variado con pendientes de 2 a 50%; y, en un menor grado, el cuadro topográfico se completa con la presencia de montañas, áreas nivales, escarpes y riberas lacustres (Villaroel y Gamarra, 1978).

En el calendario de actividades de la Empresa, el empadre es realizado entre los meses de Mayo y Junio, en la época de sequía; la parición ocurre 5 meses después cuando las lluvias recién comienzan, ocurriendo el 85% de los partos en el mes de Octubre y el 15% restante en el mes de Noviembre, en este mes también se realiza el perneo, y la marcación de los corderos. El perneo, que es el diagnóstico de gestación en masa, tiene por finalidad separar a las hembras que aún continúan preñadas 30 días después de iniciada la parición, para ello se coloca a la borrega sobre sus isquiones y se realiza una pequeña presión sobre el vientre (“baloteo”) con la finalidad de palpar al feto. La esquila se realiza en época de lluvias, entre los meses de Febrero y Marzo, esta actividad es anual y se realiza preferentemente en el mismo mes para que el vellón tenga un crecimiento uniforme en toda la población; es en estos meses donde también se

realiza el destete, cuando los corderos tienen una edad promedio de 5 meses. El programa de desparasitaciones consiste en dos dosificaciones antihelmínticas, una en época de lluvias y otra en época de sequía, una dosificación contra distomatosis y un baño de inmersión en Abril (Gamarra, comunicación personal 2003).

B. Pestivirus

El género pestivirus, perteneciente a la familia *Flaviviridae*, está conformado por el virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), el virus de la Fiebre Porcina Clásica (VFPC) y el virus de la Enfermedad de la Frontera (VEF), agentes relacionados estructural y antigénicamente, capaces de presentar reacciones cruzadas entre sí e infecciones interespecies (Carlsson, 1994; Paton, 1995; Sakoda *et al.*, 1999).

Los pestivirus son designados, tradicionalmente, según la especie afectada y la enfermedad que en ellos causa. Su éxito en los rumiantes se debe a su habilidad de cruzar la barrera placentaria, invadir el feto y generar una infección persistente, que continua clínicamente inaparente durante la vida postnatal, excretando el virus y diseminándolo a un amplio rango de hospederos de la familia *Artiodactyla* (Nettleton y Entrican, 1995; Meyers y Thiel, 1996; Becher *et al.*, 1997; Paton *et al.*, 1997).

Los pestivirus tienen unos 40 a 50 nm de diámetro, poseen una nucleocápside no helicoidal de simetría icosaédrica (Carlsson, 1994; Moenning, 1990). El genoma es una cadena simple de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 12.5kb de longitud, contando con un solo marco de lectura abierto (ORF) capaz de codificar 4000 aminoácidos, aproximadamente, procesado por enzimas virales y celulares.

Cuando el genoma viral se expresa, la primera proteína en ser codificada es una autoproteasa, una proteína no estructural (N^{pro}), la cual es seguida por la proteína estructural C de la nucleocápside y las glicoproteínas E^{ns} (ribonucleasa soluble), E1 y E2 que son glicoproteínas inmunodominantes y están presentes en la envoltura viral. Dentro de las proteínas no estructurales la NS2-3 la de mayor interés debido a su rol en la citopatogenicidad de los aislamientos pestivirales (Meyers y Thiel, 1996; Nettleton *et al.*, 1998).

1. *El Virus de la enfermedad de la Frontera (VEF)*

La Enfermedad de la Frontera (EF) fue descrita por Hughes *et al.* 1959, en ovinos de la región fronteriza de Inglaterra y Gales y registrada, posteriormente, por todo el mundo. Posee una amplia distribución en Europa, Australia y Norte América, en Israel y en el Norte de África (Nettleton *et al.* 1998). Es una enfermedad viral que afecta a ovinos, y ocasionalmente a caprinos, causante de infecciones agudas y persistentes, asociada a grandes pérdidas económicas debido a las fallas reproductivas que ocasiona y como predisponente a agentes secundarios (Carlsson, 1994). La enfermedad se caracteriza por hembras infértiles, abortos, fetos momificados e hipoplasia cerebral, mortinatos y el nacimiento de corderos pequeños y débiles, con desordenes nerviosos, deformidad e hipertriosis, corderos peludos o brichosos (Rosadio y Ameghino 1999; Nettleton *et al.*, 1998). Su prevalencia varía de 5 a 50% en ovinos adultos entre países y de región a región. La infección viral a sido identificada en borregos del Perú (Rosadio y Ameghino, 1999), con una prevalencia del 15.5% en ovinos de una comunidad de crianza mixta en Cusco (Álvarez *et al.*, 2001)

2. *El Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB)*

La p80 es la proteína más conservada en el género Pestivirus el cual determina el fenotipo citopatogénico del VDVB. Este polipéptido es muy estable en células infectadas y todos los animales infectados tienen altos niveles de anticuerpo contra esta proteína (Donis, 1995; Collins *et al.*, 1999)

3. *Biotipos*

Una propiedad de los pestivirus de rumiantes es la habilidad de replicarse en cultivos celulares con o sin efecto citopatogénico, particularmente en el VDVB se pueden distinguir dos biotipos: no citopatogénicos (NCP) y citopatogénicos (CP) (Baker, 1987; Houe, 1995). Los virus NCP presentan afinidad por células linfocitarias, mientras que los virus CP infectan de manera predominante células epiteliales (Rondón, I. 2006). Ambos biotipos producen la misma enfermedad.

El biotipo no citopatogénico (NCP) es la forma original del virus, no causa daños visibles en cultivos celulares siendo comúnmente aislado de los casos de campo (Netleton y Entrican, 1995), considerado el más importante porque al afectar a vacas gestantes durante el primer tercio de gestación, cuando el sistema inmune del feto es inmaduro, el feto no reconoce al virus y lo asume como propio naciendo el ternero inmunotolerante al virus estableciendo una infección permanente (Donis, 1995; Potgieter, 1995).

El biotipo citopatogénico (CP) causa una lesión y surge del biotipo NCP por procesos de recombinaciones con ARN celular o viral en animales PI (Netleton y Entrican, 1995). Las lesiones causadas a nivel celular se presentan en forma de vacuolización citoplasmática mediante un mecanismo apoptótico (Rondón, I. 2006). La diferencia entre ambos biotipos es sólo a nivel molecular, ya que en células infectadas con el biotipo CP poseen una proteína adicional la p80, que al parecer es la proteína que le confiere la citopatogenicidad generando por la separación proteolítico de la proteína no estructural 125 (Potgieter, 1995)

En un estudio realizado han hallado en algunos pestivirus CP que tienen inserciones de secuencias celulares en su genoma, duplicación del genoma viral o la presencia de partículas de interferencia defectuosa, como en el caso de algunos CP del virus del cólera porcina (VCP) (Sakoda *et al.*, 1998). Si un animal persistentemente infectado con cepa NCP es coinfectado con una cepa CP, puede desarrollar Enfermedad de la Mucosas (EM) de carácter fatal y ocurre generalmente en animales menores de 2 años (Meyer y Thiel, 1996).

En general, casi todos lo aislado pestivirales de ovinos y cabras, así como la mayoría de aislados del VCP son considerados no citopatogénicos (NCP) en cultivo celular (Becher *et al.*, 1994; Netleton *et al.*, 1998; Sakoda *et al.*, 1998). Interesantemente, aislados de rumiantes salvajes afectados son citopatogénicos (CP) incluyendo los aislados de ciervo NZ2 y Jirafa-1 (Becher *et al.*, 1997). Asumiendo una similar situación para rumiantes salvajes, el aislamiento de pestivirus CP en animales enfermos con características semejantes a la EM, indicaría la existencia de infecciones

persistente en el ciervo y otras especies de rumiantes de vida libre (Becher *et al.*, 1997; 1999a)

4. Genotipos

Durante la última década se han realizado estudios de secuenciación genética pestiviral, sosteniendo por investigaciones serológicas con anticuerpos monoclonales, pruebas de ensayo de neutralización cruzada con suero policlonal y análisis filogenéticos de secuencias genómicas con los términos 5'-NC, Npro, C y E2, los cuales mediante acuerdos realizados sobre las regiones codónicas emergen cuatro importantes genotipos pestivirales: BVDV-1, BVDV-2, BDV y CSF (Paton, 1995; Becher *et al.* 1995; Nettleton *et al.*, 1998).

Estudios posteriores incluyeron pestivirus de rumiantes salvajes como búfalo, ciervo y jirafa, interesantemente éste último no pertenece a ninguno de estos cuatro genotipos pestivirales establecidos, pudiéndose concluir que el pestivirus de jirafa representa un nuevo genotipo pestiviral (Becher *et al.* 1997).

Los resultados de un nuevo análisis permitió la detección de nuevos subgrupos dentro de los genotipos BVDV-1 y BVDV-2, así como adicionales grupos genéticos realizado con las secuencias codónicas Npro y E2 determinados en 16 aislados pestivirales de bovino, porcino y otras especies de rumiantes no domésticos incluyéndose bisonte, reno, ciervo y caprino; calculándose además el porcentaje de divergencias genómicas mediante pares genéticos correspondientes a tres categorías cuyos rangos fueron: <14.2% entre aislados virales de un subgrupo, 16.2%-28.8% entre subgrupos y 36.2-55.9% entre especies (Becher *et al.*, 1999b). La clasificación es la siguiente:

- Genotipo 1 (BVDV-1): Comprende 5 subgrupos, cuatro de los cuales han sido descritos previamente (Becher *et al.*, 1997; 1999b):
 - a) Pertenecen las cepas vacunales bovinas NADL, SD-1 y C86, cepa de campo ovina R2727, cepa porcina V360, cepa de cabra NZ1 perteneciente de un

caso de aborto y cepa de ciervo NZ2 cuyo aislado estuvo asociado con lesiones en la cavidad oral y ruminal.

- b) Cepas vacunales bovinas RIT, Solos y CP7, cepa de caprino (V2486-Krefeld) perteneciente a un feto abortado y la cepa de cabra G1 aislado de un animal que presento diarrea aguda y esofagitis erosiva.
 - c) Cepa de campo bovina 519 de un animal con Enfermedad de las Mucosas (EM), cepa de cabra A1 obtenido de pulmón neumónico de un cabrito, cepa de ciervo NZ1 y el aislado de suero fetal de búfalo A1.
 - d) Nuevo subgrupo, comprende los aislados bovinos 871, 721 que presentaron EM y la cepa de ciervo (SH9).
 - e) Aislado de ciervo GB1 (Becher *et al.*, 1997; 1999b).
- Genotipo 2 (BVDV-2): Comprende 2 subgrupos:
- a) Cepas bovinas 890, Gi-1, Gi-3 aislado de un animal con fiebre y trombocitopenia, cepas ovinas SCP, BD-78, 59386 aisladas y analizadas en EEUU, Canadá, Europa y Alemania (Ridpath *et al.*, 2000)
 - b) Cepas bovinas Gi-4, Gi-5, Gi-6, aisladas de suero fetal en Panamá (Becher *et al.*, 1997; 1999b).
- Genotipo 3 (BDV): Comprende 2 subgrupos (Vilcek y Belak, 1996)
- a) Cepas ovinas aislados de campo X818, BD-31 y L83-84, cepa bovina V-TOB aislado de un caso con EM y la cepa porcina "Frijters" aislado de un gorrino infectado congénitamente
 - b) Cepa ovina 137-4 y la cepa porcina 87-6.
- Genotipo 4 (CSFV): Comprende 2 subgrupos exclusivamente aislados de porcinos (Vilcek *et al.*, 1994)
- a) Pertenecen las cepas Rimes, C-strain, Brescia y Glentorf.
 - b) Pertenecen las cepas Schweinf y Alfort-T aislado de sueros y fetos.

El Genotipo 5 estaría representado por la cepa de jirafa (H138) aislado en Kenya, cuyos resultados confirman un nuevo tipo pestiviral (Becher *et al.*, 1997). Así mismo los aislado de Bisonte y Reno resultaron distintos a esta nueva clasificación genotípica, donde el análisis en sus secuencias Npro, resultaría ser más similares al VEF, sugiriéndose que ambas especies representen un sexto grupo dentro del género pestivirus (Becher *et al.*, 1999b).

C. Patogénesis

La patogenia de las enfermedades pestivirales en rumiantes muestra algunas similitudes como la frecuencia de la viremia, capacidad del virus para comprometer el sistema inmunológico, frecuencia de infección transplacentaria, inducción de inmunotolerancia y la aparición de una infección persistente (Brownlie *et al.*, 1998).

La transmisión puede ser por inhalación o ingestión de saliva infectada, descarga oculonasal, orina y heces infectadas, leche, secreciones uterinas, fluido amniótico, placenta y semen de toros infectados, cada una de las cuales permite una gran diseminación del mismo (Baker, 1987) siendo la mayoría de los casos de transmisión horizontal directa o indirecta entre animales susceptibles y animales con infección aguda o persistentemente infectados (PI), siendo este último la principal fuente de difusión del virus para los animales no inmunes, el cual proviene de la transmisión vertical (Houe, 1995).

El virus presenta tropismo por células mitóticamente activas como: linfocitos, fagocitos, mononucleares y células epiteliales. Después del contacto con membranas mucosas, la replicación ocurre en células epiteliales. Para luego diseminarse libremente a través del suero o mediante leucocitos infectados, particularmente linfocitos, monocitos, linfoblastos circundantes y células precursoras de macrófagos (Rondón, 2006)

La enfermedad pestiviral puede ser de tipo aguda, subclínica y crónica, y las tres formas pueden ser causadas por cualquiera de los biotipos CP y NCP (Baker, 1995).

1. Infección aguda

La forma aguda puede ser causada por ambos biotipos, CP y NCP aunque la cepa NCP es la más frecuente (Mc Gowan y Kirkland, 1995). El periodo de incubación en el bovino es de aproximadamente 5 a 7 días (Baker, 1995) ingresando el virus a la mucosa orofaríngea por infección nasal u oral, continuando su replicación dentro de las células epiteliales de la mucosa oronasal luego distribuido por el sistema hematolinfático sobre todo en las tonsilas palatinas continuando la fase de viremia (Fiedler y Reinhardt, 1986) la cual ocurre de 4 a 5 días post-infección, pudiendo persistir por mas de 15 días (Baker, 1995), luego alcanza la mucosa del tracto digestivo causando alteraciones severas en ella.

La enfermedad clínica en el bovino se va a caracterizar por pérdida de peso, depresión anorexia, descarga oculonasal, erosión de la mucosa oral, diarrea y fiebre (Nettleton y Entrican 1995). Así mismo la DVB puede asociarse con trombocitopenia y hemorragias petequiales y equimóticas de las mucosas (Baker, 1995; Nettleton *et al*, 1998).

En ovinos adultos y recién nacidos sanos expuestos al Virus de la Enfermedad de la Frontera (VEF) es característico la presencia de fiebre y leucopenia moderada asociados con una viremia de vida corta detectado a los 4 y 11 días post-infección luego del cual aparecen los anticuerpos neutralizantes en el suero. Ocasionalmente se han observado, en aislados del VEF, la producción de fiebre alta, leucopenia prolongada y profunda, anorexia, conjuntivitis, descarga nasal, disnea, diarrea y 50% de mortalidad en corderos (Nettleton *et al.*, 1998).

2. Infección Subclínica

Es el tipo más frecuente de infección en bovinos con el VDVB, caracterizada por presentar síntomas clínicos inaparente o muy leves, de alta morbilidad y baja mortalidad, aunque en muchos animales es posible notar fiebre moderada, leucopenia transitoria, inapetencia y diarrea leve, todo ello seguido de una rápida recuperación debido a la producción de anticuerpos neutralizantes (Potgieter, 1995).

El aspecto de mayor relevancia en las infecciones subclínicas es el desarrollo de la infección en animales gestantes susceptibles. El resultado de la infección fetal depende de las propiedades del virus y el periodo de gestación en el cual la madre está infectada y solo el biotipo NCP ha sido reportado en establecer una infección persistente en el feto (Straub, 1994; Fredriksen *et al.*, 1999). Los efectos de la infección vírica por cepas NCP recaen sobre tres entidades: oveja gestante, el feto y/o cordero recién nacido.

El virus cruza la placenta rápidamente e infecta el feto con un 100% de efectividad (Baker, 1995; Brownlie *et al.*, 1998), considerándose a la placenta el órgano de preferencia para la replicación del virus, y en células epiteliales maternas y fetales del útero, placentomas, y membrana fetal intercotidionaria han sido demostradas estar infectadas en vaquilla persistentemente infectadas (Fredriksen *et al.*, 1999). Los factores más importantes, para el desarrollo de las lesiones, son la etapa de gestación en la que toma lugar la infección, la cepa viral infectante y tal vez de la raza afectada. Los signos más notorios durante un brote clínico de EF, son abortos, fetos momificados, mortinatos, temblor y/o cambios en el vellón, algunas veces con pigmentaciones excesivas. Los cambios en el vellón se producen por pelos largos que se elevan por encima del vellón normal formando un halo especialmente a lo largo del cuello y dorso. Este efecto es mucho más notorio en razas de lana fina. Los corderos afectados reciben el nombre de corderos peludos o corderos con pelusa. Los corderos pueden nacer débiles y con peso y tamaño reducido. El defecto de la lana en el recién nacido se deriva de impedimentos provocados por el virus en la formación de los folículos pilosos, pero, sólo si la infección ocurre antes del octogésimo día de gestación y en razas con lana de fibras de pequeño y mediano calibre. (Blood, 1992; Carlsson, 1994; Nettleton, 1995).

En el ovino el VEF puede cruzar la placenta e infectar el feto en una semana durante una infección intranasal experimental. La consecuencia de la infección fetal en el ovino son similares a las observadas en el bovino aunque el feto bovino no parece fácilmente a la infección pestiviral (Nettleton y Entrican, 1995).

El feto es sensible al VEF entre los 18 y 130 días de gestación, siendo el periodo de los 50-100 días de edad fetal el de mayor susceptibilidad y el más favorable para la acción patógena del virus sobre el feto. Aparentemente, la implantación embrionaria es

inaccesible para el virus, el cual llega al feto por vía hemática a través de la placenta. La infección durante el primer mes de gestación puede desembocar en reabsorción fetal o en aborto. Cuando se produce durante el segundo mes de preñez puede causar momificación fetal, aborto o mortinato con lesiones teratógenas. Cuando la infección ocurre durante el tercer mes, generalmente, no se observan cambios macroscópicos, aunque pueden existir lesiones histológicas como periarteritis o cambios en el SNC. Las infecciones entre los 65 y 80 días pueden resultar en descendencia inmunotolerante y animales persistentemente infectados (PI). Si ocurre después de los 90 días de gestación la enfermedad afecta a los corderos vivos que nacen un 20% más pequeños de lo normal, presentando alteraciones en el vellón y malformaciones corporales, un 30% de los corderos neonatos afectados mueren, pero otros consiguen vivir y pierden gradualmente las anomalías con las que nacieron, pero se convierten en animales portadores-transmisores, tienen un 25% menos de desarrollo corporal y se venden un 25% menos de corderos que en rebaños no infectados. (Blood 1992; Carlsson 1994).

La principal patología encontrada en corderos recién nacidos es la hipomielinización y células anormales del SNC causando temblores clónicos rítmicos los cuales desaparecen a los 3 a 6 meses de edad y pueden reaparecer en un periodo de stress. El defecto está presente en varios grados en todas las partes del cerebro y cordón espinal, el cual es severamente afectado. Las deformidades esqueléticas, incluyen artrogriposis y cifoscoliosis, son de origen neurógeno. La necrosis de las capas germinales del SNC y la infiltración por células inflamatorias son la causa de graves alteraciones en el SNC. Aunque las neuronas, astrositos y oligodendrocitos pueden ser infectadas con el virus, no existe evidencia directa que estas células sean disfuncionales. El vellón hirsuto, especialmente en el cuello y espalda, es atribuido a la hipertrofia de los folículos primarios y a la medulación de las fibras de lana, además puede observarse pigmentación marrón o negra anormal en el vellón en los corderos afectados, pero muchos mueren alrededor del destete (Nettleton *et al.*, 1998).

El VEF puede persistir en el sistema nervioso central, líquido cefalorraquídeo y leucocitos periféricos hasta 12 meses después del nacimiento. Algunos ovinos virémicos sobreviven a la madurez sexual y los corderos nacidos de las hembras infectadas también estarán infectados de forma persistente por el virus (Carlsson, 1994). Las

ovejas adultas, después de recuperarse de la infección vírica, no tienen virus detectables en los leucocitos, aunque sí anticuerpos neutralizantes en el suero (Nettleton y Entrican, 1995). Las viremias persistentes de VEF en ovinos, son mantenidas durante la vida posnatal por más de 5.5 años, pero a diferencia de los bovinos, los ovinos PI en ocasiones muy raras eliminan el virus luego de la seroconversión (Carlsson, 1994).

D. Control

Conforme a los nuevos estudios referentes a la patogénesis y epidemiología de los pestivirus en rumiantes, los métodos de control y erradicación están diseñados por estrategias según las condiciones de un área geográfica definida para la aplicación de un correcto sistema de control, basado principalmente en la prevención de la enfermedad a través de:

1. *Identificación y eliminación de animales persistentemente infectados (PI)*

Los animales persistentemente infectados son la principal ruta de transmisión del virus y los diseminadores constantes del virus al medio ambiente (Brock *et al.*, 1998) cuya frecuencia está fuertemente influenciada por las condiciones de manejo (Celedon *et al.*, 1998). Los animales PI alcanzan un nivel máximo de prevalencia de 1-2% y el 60-85% de bovinos tienen anticuerpos positivos (Houe, 1999), los animales negativos deben ser considerados sospechosos y eliminados del hato. La otra medida a tomar sería la vacunación a todos los animales mayores de 6 meses con vacunas inactivadas seguida por una revacunación después del tiempo recomendado, determinando los títulos de anticuerpos y descubrir los bovinos sospechosos si permanecen seronegativos o con bajos títulos de anticuerpos para su eliminación dentro del rebaño (Ferrari *et al.*, 1999).

2. *Manejo Sanitario*

El manejo sanitario debe ser regido por un buen sistema de monitoreo permanente para evitar el ingreso del virus en el hato o su reintroducción en él. Entre las medidas de control se recomienda restringir el movimiento del ganado evitando el ingreso de nuevos animales sin conocer su estado sanitario pues el comercio del ganado

vivo debe estar regido por un sistema de certificación a los animales libres de enfermedad, así mismo en el caso del semen importado o nacional (Waage *et al.*, 1994; Lindberg y Alenius, 1999; Mainar y Vásquez, 1999).

Evitar el contacto con otros rumiantes que pueden ser portadores del virus, sobre todo en pasturas comunes, ya que la infección rara vez ocurre en de ovinos que no tenido estrecho contacto con ganado infectado con el VDVB (Carlsson, 1991; Waage, 1997).

La higiene, otra medida importante pues el VDVB ha sido diseminada por personas o equipos, recomendándose el uso de ropa, botas, instrumentos y vehículos desinfectados, uso de agujas descartables y guantes obstétricos por cada animal (Houe, 1999), evitar la monta natural, no utilizar vacunas a virus vivo en animales gestantes, evitar el estrés en los animales puesto que el VDVB causa inmunosupresión predisponiendo a infecciones secundarias (Tremblay, 1996; Celedón *et al.*, 1998).

3. Vacunación

La vacunación deberá determinarse de manera individual en cada hato, con una previa evaluación del status de infección y productividad y sin previa evaluación de sus características (Kelling, 1996). En el mercado se disponen dos tipos de vacunas:

- *Vacunas a virus vivo modificado.* La vacuna contra la DVB a virus-vivo modificado rápidamente induce a los anticuerpos neutralizantes y una respuesta inmunitaria a largo plazo con una sola dosis. Sus desventajas es que pueden pasar la barrera placentaria e infectar el feto que subsecuentemente puede desarrollar signos clínicos severos, inducir a la inmunodepresión, fortalecer las infecciones secundarias, no protegen a todo el ganado de la infección congénita y su posible contaminación con agentes extraños (Bolin, 1995; Oirschot *et al.*, 1999).
- *Vacunas Inactivadas.* Este tipo de inmunización puede llevar a una corta protección con espectro antigénico reducido, requiriendo administrar una dosis

de refuerzo 3 a 4 semanas después de la primera vacunación, se recomienda su uso en animales de crianza intensiva (Tremblay, 1996), no producen abortos pero pueden inducir reacción local en el lugar de su aplicación dependiendo del tipo de adyuvante incluido, y pueden tener infectividad residual si la inactivación no ha sido correctamente ejecutada (Oirschot *et al.*, 1999)

En el caso de EF sólo hay una vacuna comercial disponible, es una vacuna inactivada con adyuvante el cual contiene cepas representativas del VEF y VDVB-1 (Nettleton *et al.*, 1998).

E. Diagnóstico

Actualmente en todos los programas de control y erradicación el objetivo principal es la identificación de los animales PI en los hatos afectados. En el laboratorio se puede realizar lo siguiente:

1. *Aislamiento Viral.*

El aislamiento viral es muy sensible y específico pero demora varios días o semanas. Requiere como muestra sangre entera, suero y órganos como bazo, tiroides, timo, riñón, cerebro, intestino y nódulos linfáticos, entre los mejores para el aislamiento del virus (Nettleton y Entrican, 1995). El semen puede ser examinado para la presencia del VEF en semen de carnero PI, pero debe ser diluido en un medio de cultivo por ser muy citotóxico.

El crecimiento del VEF en líneas celulares ovinas es raro y comercialmente no son obtenidas. Las líneas celulares semi-continuas derivadas de músculo fetal de cordero o del plexo coroideo ovino pueden ser útiles, pero en líneas diferentes varían considerablemente la susceptibilidad del virus (Nettleton *et al.*, 1998).

El aislamiento del virus requiere de células especialmente susceptibles como las células renales de feto bovino o cornete nasal de feto bovino y libre del VDVB endógeno (Nettleton y Entrican, 1995). Luego se identifican los pestivirus mediante

pruebas inmunohistoquímicas como son inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa empelando anticuerpo monoclonal o policlonal, ya que la mayoría del virus de campo son NCP (Dinter, 1989; Rivera, 1993).

2. *Detección de Antígeno Viral.*

Esta técnica es rápida y consisten en la detección del antígeno viral en tejidos frescos, a través del uso de anticuerpos policlonales o monoclonales, mediante la técnica de inmunofluorescencia (IF), o en muestras de suero o plasma mediante ELISA de captura útil para el diagnóstico de una infección persistente y aguda (Sandvik, 1999) o en muestras fijadas en formol pero en este caso se usa la técnica de inmunoperoxidasa (Rivera, 1993) que aparentemente son los polipéptidos p125 y p80 los que reaccionan a esta prueba (Bolin *et al.*, 1991).

3. *Detección de Anticuerpos.*

La detección de anticuerpos es otra de las formas diagnósticas más empeladas para el control y prevención de una enfermedad pestiviral. Las de mayor uso son las pruebas de Virus Neutralización y ELISA.

- *Virus Neutralización (VN)*. La prueba de virus neutralización es 100% específica aunque menos sensible, y por su alta especificidad es considerada una prueba estándar (Rivera, 1993). Su fundamento radica en la capacidad que tiene el anticuerpo para neutralizar la citopatogenicidad o la capacidad del virus de infectar a las células *in vivo* o *in vitro* (OIE, 1996). La prueba es llevada a cabo en microplacas de 96 hoyos, donde el suero es diluido seriadamente e incubado con una cepa CP, antes son añadidos las células bovinas susceptibles e incubado con el virus neutralizado por 4 días (Sandvik, 1999).

La prueba requiere una substancial inversión en la selección y monitoreo de cultivos celulares y medios para dar satisfactorios resultados (Rivera, 1993; Risco *et al.*, 1998), así mismo no es adecuado para la examinación de pocas o esporádicas muestras a diagnosticar.

Como título neutralizante del suero se define la recíproca dilución del suero, expresado en Log10, que protege una monocapa celular como consecuencia de la neutralización de pro lo menos 100 DI50 de virus (Risco *et al.*, 1998).

- *Prueba de Inmunoabsorbsorción Ligada a Enzima (ELISA).*

La prueba de ELISA indirecta posee alta sensibilidad y especificidad: 99 y 96 % respectivamente, (Dinter, 1989) cuyo principio es determinar la presencia de anticuerpos en el suero, leche u otro fluido, mediante el uso de una antiinmunoglobulina G dirigida contra la IG G bovina marcada con una enzima como la peroxidasa que se une al complejo antígeno-anticuerpo (Niskanen *et al.*, 1989; Sandvik, 1999).

Existen muchos estudios que utilizan ELISA para la detección de anticuerpos contra pestivirus, comúnmente empleado para identificar animales persistentemente infectados, pero usualmente no es muy sensible para la detección de infecciones agudas con el VEF en muestras de sangre (Nettleton *et al.*, 1998). La prueba de ELISA es más efectiva que el aislamiento del virus en la presencia de anticuerpos, pero puede dar falsos negativos en corderos virémicos menores de dos meses de edad.

Los diversos métodos de ELISA han sido utilizados en estudios epidemiológicos y programas de erradicación (Waage *et al.*, 1996; Lindeberg y Alenius, 1999), principalmente con muestras de leche por su fácil obtención y sin provocar estrés al animal (Niskanen *et al.*, 1989). En un estudio realizado en bovinos lecheros del Valle del Mantaro se detectó una prevalencia de 72.4% con VDVB mediante la prueba de ELISA indirecta en leche (Contreras *et al.*, 2000).

4. *Reacción en Cadena por la Polimerasa (PCR).*

La reacción en cadena es un método que ha sido usado para la clasificación virológica de pestivirus en rumiantes relacionados estrechamente (Lettellier *et al.*, 1999;

Sandvik, 1999) basándose en la amplificación in vitro de secuencias específicas de nucleótidos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. Ciclos repetitivos de desnaturalización, anelación y extensión son usados para generar múltiples copias del DNA promotor (Primer), el mismo que puede ser detectado en un gel de poliacrilamida y el uso de colorantes como el bromuro de etidio.

La técnica es capaz de sintetizar más de un millón de copias de DNA blanco en unas pocas horas, ofrece una alta sensibilidad y la posibilidad de usar numerosas muestras, puede utilizarse para la detección de animales persistentemente infectados empleando primers que contengan la secuencia de la región conservada del virus (Schroeder *et al.*, 1990; Alenius *et al.*, 1994).

La óptima sensibilidad de la prueba, la convierte en una herramienta valorable para detectar bajos niveles de contaminación viral como constituyentes en cultivo celular o vacunal (Nettleton *et al.*, 1998).

III. Materiales y Métodos

A. Materiales

1. *Lugar*

El estudio fue realizado en las zonas de Consac y Casaracra ubicadas a 3900 y 4200 msnm, respectivamente, pertenecientes a la jurisdicción de Pachacayo del distrito de Canchayllo-Jauja en el departamento de Junín de la Sierra Central.

2. *Animales*

El estudio fue realizado en 440 borregas de la raza Junín, aparentemente sanas, con un promedio de edad de 4 años, en etapa reproductiva, criadas en forma semiextensiva con niveles de tecnología media.

3. *Muestreo*

El muestreo fue realizado en el mes de noviembre del 2003 durante la actividad del perneo, que es el diagnóstico de gestación mediante el “baloteo” de las borregas, para ello las ovejas fueron traídas a Consac y Casaracra. Una vez finalizado el mismo se obtuvieron muestras de sangre de la vena cefálica de las borregas con problemas reproductivos (abortos y hembras vacías) y borregas preñadas.

4. Grupos

Las muestras de suero obtenidas fueron separadas en dos grupos. El grupo Caso compuesto por borregas que abortaron, que quedaron vacías después del empadre por primera vez (vacías simples) y borregas que quedaron vacías después de su segundo empadre (vacías dobles); el grupo Control se compone por hembras que no presentaron problemas reproductivos durante la campaña del 2003: hembras preñadas en la última semana de gestación, paridas recientemente y forradas, es decir hembras que culminaron exitosamente pero perdieron a sus crías a causas de un depredador, el clima, etc.

5. Reactivos y Cultivos Celulares

Se utilizó cultivos primarios de células de cornete nasal de feto bovino (CNB) libres de VDVB y VEF como sistema indicador de prueba de neutralización viral. Las células fueron cultivadas empleando medios de cultivo MEN (Minimal Essential Medium) y L-15 (Liebowitz) (SIGMA, USA), en una proporción 50:50 suplementados con el 0% de suero fetal bovino libre de VDVB (SIGMA, USA) y antibióticos.

6. Cepas del VDVB

Las cepa de virus utilizada fue la cepa Singer prototipo del biotipo CP, genotipo I del VDVB con título de 10^{-5} DI₅₀ CC/50µl.

B. Métodos

1. Colección y procesamiento de muestras

La muestra de sangre se obtuvo por punción de la vena cefálica utilizando el sistema vacutainer, identificadas y transportadas al laboratorio de Virología de la UNMSM en Lima. Para la obtención del suero, se usó una centrífuga a 2000 RPM por 5 minutos, luego fueron transferidas a viales y conservadas a -20° C hasta su utilización para las pruebas de virus neutralización.

2. *Detección de Anticuerpos Pestivirales*

La detección de los anticuerpos contra el virus de la DVB fue realizada mediante la prueba de virus neutralización, en placas descartables de 96 hoyos, según la técnica descrita por la OIE (1996) y disponible en el laboratorio de virología de la FMV-UNMSM que consiste en realizar diluciones crecientes del suero y enfrentarlos a cantidades constantes de virus conteniendo 100 dosis infectantes₅₀ en cultivo celular (100 DI₅₀ CC/50µl) incubándolo por una hora a 37° C, añadiendo luego una concentración de células CNB e incubándolas en estufa de CO₂ por 3 a 4 días antes de hacer la lectura.

Prueba de Virus Neutralización

Antes de efectuar la prueba los sueros fueron inactivados a 56° C por 30 minutos en Baño María para destruir los anticuerpos inespecíficos del suero. La prueba fue realizada de la siguiente manera:

1. Se colocó 50µl de diluyente (MEM + antibiótico) en una microplaca de 96 hoyos para cultivo celular.
2. Se añadió 50µl de suero en la primera hilera de la microplaca (12 diferentes sueros, uno por hoyo).
3. Con una micropipeta multicanal se realizó las diluciones dobles empezando por 1:2 hasta 1:256 eliminándose de esta última hilera 50µl de la mezcla suero-diluyente.
4. Se añadió a toda la microplaca 50µl de virus de la diarrea viral bovina conteniendo 100 DI₅₀ CC/50µl.
5. En otra microplaca se realizó los controles de 100, 10 y 1 dosis del virus y de células CNB utilizadas.
6. Se incubaron todas las placas en estufa a 37° C por una hora.
7. Luego de la incubación, se procedió a añadir 100µl de una suspensión de células de CNB (3×10^3 /hoyo) y se incubó en estufa a 37° C y 5% de CO₂ por 4 días.

Lectura: La dilución más alta, capaz de neutralizar las 100 DI₅₀ CC/50µl del virus, fue el título del suero, esto es evidenciado por la ausencia de lesión celular.

3. *Tamaño Muestral*

El tamaño muestral fue calculado usando el programa WIN EPISCOPE 2.0, el cual toma como base el método de Schlesselman (Schlesselman, 1982), utilizado en estudios de Caso-Control no pareado, en los que se intenta determinar la relación entre la exposición a un factor y la enfermedad:

$$n = \frac{\left(Z(a) \cdot \sqrt{\left(1 + \frac{1}{c}\right) \cdot p_m \cdot (1 - p_m)} + Z(b) \cdot \sqrt{p_1 \cdot (1 - p_1) + \frac{p_0 \cdot (1 - p_0)}{c}} \right)^2}{(p_1 - p_0)^2}$$

Siendo:

$$p_1 = \frac{p_0 \cdot OR}{1 + p_0 \cdot (OR - 1)} \quad p_m = \frac{p_1 + c \cdot p_0}{1 + c}$$

Donde:

Z (a) = valor de la t de Student para un nivel de confianza del 95%.

Z (b) = valor de la t de Student para una potencia del 80%.

p₀ = proporción esperada de exposición entre los sanos (controles): 15% (Álvarez *et al.*, 2001)

p₁ = proporción esperada de exposición entre los enfermos (casos).

p_m = proporción esperada de exposición en la población (enfermos y sanos)

1- p_m = proporción esperada de no expuestos en la población.

c = relación esperada entre enfermos y sanos: 1 a 1.

OR = Odds Ratio estimado de suficiente importancia: 2

Reemplazando:

$$p_1 = \frac{0.15 \times 2}{1 + 0.15 (2-1)} = 0.26$$

$$p_m = \frac{0.26 + 1 \times 0.15}{1 + 1} = 0.21$$

Se obtuvo un total de 207 muestras para el grupo caso y 207 muestras para el grupo control.

4. *Análisis de Datos*

Los datos fueron analizados utilizando el programa WINEPISCOPE 2.0. Primero se estandarizo la edad de los animales para determinar si existe diferencia estadística significativa. Segundo, las variables fueron sometidas a un análisis mediante la prueba de Chi cuadrado, y finalmente se aplicó una regresión logística para determinar si existe asociación entre las variables en estudio.

IV. Resultados

El $69.5 \pm 4.4\%$ (306/440) de los animales fueron seropositivos al VDVB. El $73.6 \pm 6.1\%$ (162/220) corresponde al grupo Caso y el $65.5 \pm 6.5\%$ (144/220) corresponde al grupo Control (Cuadro 1).

Cuadro 1. Presencia de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en borregas según grupo de estudio. 2003

Grupo de Estudio	N° de Animales		Porcentaje según grupo de estudio
	Muestreados	Seropositivos	
Control	220	144	$65.5 \pm 6.5\%$
Caso	220	162	$73.6 \pm 6.1\%$
Total	440	306	$69.5 \pm 4.4\%$

De los 306 animales seropositivos el $47.7 \pm 6.3\%$ (146/306) son animales procedentes de la zona de Casaracra y el $52.3 \pm 5.7\%$ (160/306) de la zona de Consac (Cuadro 2).

Cuadro 2. Presencia de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en borregas según la zona de estudio. 2003

Zona de Estudio	Animales seropositivos al VDVB		Porcentaje según zonas de estudio
	Caso	Control	
Consac	87	73	$66.1 \pm 6.2\%$ (160/242)
Casaracra	75	71	$73.7 \pm 6.5\%$ (146/198)
Total	162	144	$69.5 \pm 4.4\%$ (306/440)

El promedio de edad de los animales en estudio fue de 4 ± 1.7 años para los animales del grupo Control y 4.2 ± 1.9 años para los animales del grupo Caso, no existiendo diferencia estadística significativa entre la edad de los animales en estudio.

El análisis de los resultados mediante la prueba de Chi cuadrado indicó que no existe asociación entre las variables presencia de anticuerpos (animales expuestos y no expuestos) y presentación de problemas reproductivos (grupos caso y control) Así mismo el análisis de regresión logística indicó que no existe asociación entre las variables estudiadas (seropositividad, edad y lugar de procedencia) y la presencia de problemas reproductivos.

Del total de animales positivos a anticuerpos contra el VDVB en el grupo Caso, el 47.7% (105/220) abortaron, el 8.2% (18/220) fueron hembras vacías simple y el 17.7% (39/220) fueron hembras vacías dobles (Cuadro 3).

Cuadro 3. Presencia de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en borregas con problemas reproductivos (grupo caso) según zona de estudio. 2003

Problema Reproductivo	N° Animales	Animales seropositivos al VDVB		Porcentaje de seropositivos
		Consac	Casaracra	
Aborto	135	46	59	47.7% (105 /220)
Vacía Simple	34	14	4	8.2% (18/220)
Vacía Doble	51	27	12	17.7% (39/220)
Total	220	87	75	73.6% (162/220)

Los niveles de anticuerpos contra el VDVB variaron entre 2 hasta mayores a 256. La distribución de los títulos de anticuerpos contra el virus de la DVB en las borregas del grupo Caso y Control se muestran en las Cuadro 4 y 5 según la zona de estudio

Cuadro 4. Título de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en borregos del grupo CASO (n= 162) según zona de estudio. 2003

Título de Anticuerpos	Zona de Estudio		TOTAL
	Consac	Casaracra	
2 a 8	38	39	77
16 a 64	34	24	58
128 a >256	15	12	27
TOTAL	87	75	162

Cuadro 5. Título de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en borregos del grupo CONTROL (n= 144) según zona de estudio. 2003

Título de Anticuerpos	Zona de Estudio		TOTAL
	Consac	Casaracra	
2 a 8	41	28	69
16 a 64	20	28	48
128 a >256	12	15	27
TOTAL	73	71	144

V. Discusión

Los anticuerpos contra el VDVB detectados en las borregas de los grupos Caso y Control, indican exposición de los animales al virus de campo. Los anticuerpos detectados podrían haber sido inducidos por el VDVB o por el virus de la enfermedad de la frontera (VEF) o ambos a la vez, ya que los dos pestivirus comparten estructura antigénica y por tanto reacciones cruzadas *in Vitro* entre ambos agentes (Sullivan *et al.*, 1994; Paton *et al.*, 1997) y por tanto los anticuerpos no pueden ser diferenciados por la prueba de neutralización viral sobre todo en los títulos bajos. El VDVB afecta principalmente al bovino y el VEF al ovino, pero ambos pueden cruzar la barrera de especie, por otro lado la estrecha relación antigénica entre los dos virus hace que pueda usarse como antígeno al VDVB o VEF.

Sin embargo la reacción antígeno – anticuerpo será más fuerte y con altos títulos con el antígeno específico (Tizard, 1995). Habiéndose utilizado como antígeno únicamente el VDVB podría ser que las borregas con títulos mayores a 256 sean inducidos por el VDVB por tener estos anticuerpos un mayor grado de afinidad por el antígeno específico.

El 69.5% de las borregas con anticuerpos contra el VDVB indica una alta prevalencia de infección pestiviral en la zona de influencia de la SAIS, sugiriendo fallas en el sistema de manejo, como por ejemplo uso de pasturas comunes entre los ovinos y bovinos o cercanía entre los bovinos y ovinos de la misma SAIS que podría favorecer las infecciones interespecies. No se dispone de información sobre la prevalencia del

VDVB en bovinos de la SAIS, pero es probable que también la infección esté difundida en el ganado bovino, pudiendo ser fuente de infección mutua si hubiese falla en el manejo. Estudios realizados en bovinos del valle del Mantaro se detectaron prevalencias mayores a 70% en bovinos en producción de leche (Contreras *et al.*, 2002) por lo que el valle podría ser considerada endémica de la infección por el VDVB.

La falta de asociación estadística entre las variables presencia de anticuerpos contra el VDVB y los problemas reproductivos, así como entre las variables: seropositividad, edad y lugar de procedencia con los problemas reproductivos, indican que el VDVB no fue la causa de los problemas reproductivos durante la campaña 2003 (Cuadros 2 y 3). Los abortos y las pérdidas del embrión o fetos (vacías) pudieron ser causados por otros agentes infecciosos o por causas no infecciosas. Un estudio realizado en los mismos animales detectó anticuerpos contra *Leptospira sp.*, aunque igualmente no se observó asociación entre la seropositividad y los problemas reproductivos, se observaron mayores prevalencias y títulos altos de anticuerpos contra algunas serovariedades de *Leptospira sp.*, en borregas del grupo Caso frente al grupo Control (Flores, 2007).

El perfil de los títulos de anticuerpos contra el VDVB en las borregas del grupo Caso y Control procedentes de Consac como de Casaraca fueron similares y variaron entre 2 a mayores a 256 y, como ya fue mencionado, los altos títulos podrían corresponder a anticuerpos contra el VDVB (Figuras 1 y 2). Así mismo respecto a la edad de las borregas se observa una similitud en su distribución en los tres grupos divididos de modo arbitrario (figuras 3 y 4). Usualmente cuando los animales son expuestos al VDVB desarrollan una buena respuesta inmunitaria, tanto humoral como celular, los anticuerpos alcanzan la meseta y pueden tener larga duración antes de su lenta declinación (Brownlie, 1990). Los diversos niveles de anticuerpos detectados sugieren actividad viral en las borregas, indicando que los bajos títulos podrían ser anticuerpos que estén en ascenso o en declinación y los altos títulos corresponder a la meseta (Fredriksen *et al.*, 1999).

Si bien el sistema de producción de los ovinos en la SAIS cuenta con adecuada tecnología, los animales de cada punta se encuentran en contacto con el ganado

“Huaccha”, compuesto usualmente por 2 bovinos y sus terneros y 2 a 3 equinos que sirven para el sustento y transporte diario del pastor (Gamarra, comunicación personal). Esta cercanía del bovino con el ovino podría explicar la presencia del VDVB en los animales en estudio (Baker, 1995; Brownie *et al.*, 1998). La transmisión del virus de la diarrea viral bovina a ovejas ha sido demostrada bajo condiciones naturales y experimentales, produciendo enfermedad de la frontera (Carlsson, 1991, Paton *et al.*, 1997).

La infección pestiviral ha sido descrita en el país asociada principalmente a problemas reproductivos y respiratorios en bovinos lecheros y de engorde (Rivera *et al.*, 1993). Las fallas reproductivas asociadas a pestivirus en borregas no han sido determinadas, pero su presencia en ovinos de la zona Junín fue reportada por Rosadio *et al* (1984) quienes determinaron una seroprevalencia de 5.9%. Las tasas de prevalencia en ovinos van del 5 al 50% según los países (Nettleton *et al.*, 1998), con un 1 al 2% en Suecia (Lunden *et al.*, 1992), del 27 al 31% en Egipto (Zaghawa, 1998), y cerca del 18% en España (Mainar y Vazquez, 1999), aunque se describen rebaños con problemas reproductivos con prevalencias del 79 al 96% (Loken *et al.* 1991); en Chile se reporta una prevalencia promedio del 8.5% sin reportes de casos clínicos de la enfermedad (Tadich *et al.*, 1998). Se reporta que uno de los efectos de la infección pestiviral en ovinos es el nacimiento de corderos con defectos en el vellón (Baker, 1987; Brownlie *et al.*, 1998) y en los registros de producción de la SAIS se reporta que del total de corderos descartados, alrededor del 20% son corderos con defectos en el vellón. La asociación entre la seropositividad y la infección pestiviral podría tal vez darse si se tomaran muestras de borregas que paren corderos con problemas de deformación del vellón y corderos débiles.

VI. Conclusiones

No existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia de anticuerpos contra pestivirus y los problemas reproductivos en las borregas estudiadas.

La frecuencia de anticuerpos contra el VDVB en las borregas estudiadas fue de $69.5 \pm 4.4\%$.

I. Literatura Citada

1. Alenius, S; Larsson, B; Olsson, So; Jacobson, L and Ehvander, M. 1994. A voluntary control programme in Sweden against Bovine Virus Diarrhea Virus infections in cattle. Proceedings of 18th. World Buijiatrics Congress. 741-744.
2. Álvarez, S; Rivera, H; Pezo, D; Rosadio, R. 2001. Diarrea viral bovina en rumiantes de una comunidad campesina de la provincia de Canchis, Cusco. Rev. Inv. Vet. Perú (Suplemento 1):382 – 384.
3. Ameghino, E. 1985. Mortalidad Perinatal en Corderos de la Sierra Central. Bol. Div. 20. FMV – IVITA:15
4. Ameghino, E. 1988. Avances sobre Investigación en Salud Animal – Ovinos. Bol. Div. 21. Lima: UNMSM-IVITA.
5. Baker, J. 1987. Bovine Viral Diarrhea virus: A rewiew. JAVMA. 190(11):1449-1456.
6. Baker, J. 1995. The Clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *In*: Bovine viral diarrhoea virus. Vet Clin North Am: Food Animal Pract 11 (3):425-445.

7. Becher, P; Shanon, A; Tautz, N; Thiel, H. 1994. Molecular Characterization of Border Disease Virus, a Pestivirus from Sheep. *Virology* 198:42-551.
8. Becher, P; Konig, M; Paton, D; Thiel, H. 1995. Further Characterization of Border Disease Virus Isolates: Evidence for the Presence of More than Three Species within the Genus Pestivirus. *Virology* 209:200-206
9. Becher, P; Orlich, M; Shannon, A; Horner, G; Konig, M. 1997. Phylogenetic analysis of pestivirus from domestic and wild ruminants. *Journal of General Virology* 78:1357-1366.
10. Becher, P; Orlich, M; Konig, M; Thiel, H. 1999a. Nonhomologous RNA Recombination in Bovine Viral Diarrhea Virus: Molecular Characterization of a Variety of Subgenomic RNAs Isolated during an Outbreak of Fatal Mucosal Disease. *Journal Virology*. 73(7):5646-5653
11. Becher, P; Orlich, M; Kosmiduo, A; König, M; Baroth, M; Thiel, H. 1999b. Genetic Diversity of Pestiviruses: Identification of Novel Goups and Implications for Classification. *Virology* 262:64-71.
12. Blood D, Hendeson, J, Radostis, D. 1992. *Medicina Veterinaria. España. Editorial Interamericana*. 2:909-922.
13. Bolin, S; Matthews, P; Ridpath, J. 1991. Methods for and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3(1):9-203
14. Bolin, S. 1995. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. *In: Bovine viral diarrhoea virus. Vet Clin North Am: Food Animal Pract* 11 (3):615-635.
15. Brock, K; Grooms, D; Ridpath, J; Bolin, S. 1998. Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Journal Vet. Diagn. Invest* 10:22-26.

16. Brownlie, J; Hooper, L; Thompson, I; Collins, M. 1998. Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) – the bovine pestivirus. *Clinical and Diagnostic Virology* 10:141-150.
17. Carlsson, U. 1991. Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Record* 128:145-147
18. Carlsson, U. 1994. Pestivirus infections in pregnant sheep and cattle. 1a. Ed., p. 11-49. Sveriges Lantbruksuniversitet Uppsala, Sweden.
19. Celedón, M; Carbonell, M; Ibarra, M. 1998. Detección de bovinos portadores e inmunotolerantes al virus de la diarrea viral bovina en predios lecheros de la región Metropolitana de Chile. *Arch. Med. Vet.* 20(1):125-132.
20. Collins, M; Desport, M; Brownlie, J. 1999. Bovine viral diarrhoea virus quasispecies during persistent infection. *Virology* 259:85-98.
21. Contreras, G; Stahl, K; Arana, C; Rivera, H. 2000. Anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en muestras de leche de bovinos del Valle del Mantaro (Jauja, Concepción y Huancayo) *Rev. Inv. Vet. Perú* 11(1):58 – 65.
22. Dinter, Z. 1989. *Diagnostic Virology. A Review of methods at the National Veterinary Institute.* Uppsala Sweden. 24-27; 61-67.
23. Dirección General de Información Agraria (DGIA), 2002. Situación Actual de la Crianza de Ovinos en el Perú. Ministerio de Agricultura. Disponible en: www.minag.gob.pe/portaagrario.
24. Donis, R. 1995. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 11(3):393-423.

25. Ferrari, G; Scicluna, M; Bonvicini, D; Gobbi, C; Verita, F; Valentini, A; Autorino, G. 1999. Bovine virus diarrhea (BVD) control programme in an area in the Rome province (Italy). *Veterinary Microbiology* 64:237-245.
26. Fiedler, H; Reinhardt, G. 1986. Modo de infección patogénesis de la enfermedad mucosa/Diarrea viral bovina. (BVD/MD). *Arch. Med. Vet* 18(2):79-86.
27. Flores, A. 2007. Asociación entre la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* interrogans y problemas reproductivos en borregas de una SAIS en Junín durante la Campaña 2003. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 47p.
28. Fredriksen, B; Sandvikt, T; Loken, T; Odejarrd, S. 1999. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Record* 114:111-114.
29. Houe, H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 11(13):521-547.
30. Houe, H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology* 64:89-107.
31. Hughes, L; Kershow, G; Shaw, I. 1959. "B" or Border Disease and undescribed disease of sheep. *Vet. Rec.* 71:313-317.
32. INEI. 1994. III Censo Nacional Agropecuario (CENAGRO). Disponible en: <http://www.inei.gob.pe/>
33. Kelling, C. 1996. Planning bovine Viral Diarrhea Virus Vaccination of Programs. In symposium on BDVD virus. *Vet. Med.* 873-877.

34. Kirkbride, C; Johnson, M. 1989. Serologic examination of aborted ovine and bovine fetal fluids for the diagnosis of border disease, bluetongue, bovine viral diarrhoea, and leptospiral infections. *J Vet Diagn Invest* 1(2): 132-138
35. Letellier, C; Kerkhofs, G; Wellemans, E; Vanopdenbosh, E. 1999. Detection and genotyping of bovine diarrhoea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. *Veterinary Microbiology* 64:155-167.
36. Lindberg, A; Alenius, S. 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Veterinary Microbiology* 64: 197-222.
37. Loken, T.; Krogsrud, J.; Bjerkas, I., 1991. Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus-contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *J Comp Pathol*, 104 (2), 195-209.
38. Lunden, A.; Carlsson, U.; Naslund, K., 1992. Toxoplasmosis and border disease in 54 Swedish sheep flocks. Seroprevalence and incidence during one gestation period. *Acta Vet Scand*, 33 (2), 175-184.
39. Mainar, R; Vásquez-Boland, J. 1999. Associations of veterinary services and farm characteristics with prevalences of brucellosis and border disease in small ruminants in Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 40:193-205.
40. McGowan, M; Kirkland, P. 1995. Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *Br. Vet. J.* 151:263-270.
41. Meyers, G & Thiel, H. 1996. Molecular Characterization of Pestivirus. *Advances in Virus Research* 47:53-118.
42. Moenning, V. 1990. Pestivirus: a review. *Veterinary Microbiology*. 23:35-54.
43. Nettleton, P & Entrican, G. 1995. Ruminant Pestivirus. *Br. Vet. J* 151(6):615-642.

44. Nettleton, P; Gilray, J; Russo, P; Dlissi, E. 1998. Border disease of sheep and goats. *Vet. Res.* 29:327-340.
45. Ninasken, R; Alenius, S, Larsson, B; Juntti, N. 1989. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine virus diarrhea virus in milk. *Zentralbl Veterinarmed Mar*, 36(2):113-118.
46. Organismo Internacional de Epizootias. OIE. 2006. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.10.5. Enfermedad de la Frontera. Disponible en: <http://www.oie.int/>
47. Oirschot, J; Brusckhe, C; Van Rijn, P. 1999. vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Veterinary Microbiology* 64:169-183.
48. Paton, D. 1995. Pestivirus diversity. *J. Comp. Path.* 112:215-236.
49. Paton, D; Gunn, M; Sands, J; Yapp, F; Drew, T; Vilcek, S; Edwards, S. 1997. Establishment of serial persistent infections with bovine viral diarrhoea virus in cattle and sheep and changes in epitope expression related to host species. *Arch. Virol.* 142:929-938.
50. Potgieter, L. 1995. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of north Amreica: Food Animal Practice* 11(3):501-519.
51. Ridpath, J; Neill, J; Frey, M; Landgraf, J. 2000 Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDVD from North America. *Vet. Microbiol* 77:145-155.
52. Risco, V; Rivera, H; Pezo, D; Garcia, W; Rosadio, R. 1998. Detección de anticuerpos y virus de la DVB en alpacas durante una campaña reproductiva. *Rev. Inv. Pec. IVITA (Perú)* 9(2):59-64.

53. Rivera, H. 1993. El Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVD). Rev. Inv. Pec. IVITA. 6(1):1-37.
54. Rondón, I. 2006. Diarrea Viral Bovina: Patogénesis e Immunopatología. Rev. MVZ Córdoba 11(1):694-704.
55. Rosadio, R; Everman, J; DeMartini, J. 1984. A preliminary serological survey of viral antibodies in peruvian sheep. Vet. Microb. 10(1):91-96
56. Rosadio, R; Ameghino, E. 1999. Enfermedades en Ovinos en el Perú. Pub. Tec. N° 40. FMV - UNMSM: 54-81
57. Sakoda, Y; Yamaguchi, O; Fukusho, A. 1998. A new assay for classical swine fever virus base don cytopathogenicity in porcine kidney cell line FS-L3. Journal of Virological Methods 70:93-101.
58. Sakoda, Y; Ozawa, S; Damrong-watanapokin, S; Sato, M; Ishikawa, K; Fukusho, A. 1999. Genetic heterogeneity of porcine and ruminant pestivirus mainly isolated in Japan. Veterinary Microbiology 65: 75-86.
59. Sandvik, T. 1999. Laboratory diagnostic investigation for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. Veterinary Microbiology 64:123-134.
60. Schlesselman JJ. 1982. Case-Control Studies: Design, Conduct, Analysis. New York: Oxford University Press.
61. Schroeder, Balassu-Chan, T. 1990. Specific sequence amplification of Bovine viral diarrhoea virus nucleid acid. Arch. Viral. 111:239-246.
62. Straub, O. 1994. Agentes víricos como causa de transtornos en la reproducción bovina. MV Rev. De Ciencias Veterinarias. 10(2):15-21.

63. Sullivan, D; Chang, G; Trent, D; Akkina, R. 1994. Nucleotide sequence analysis of the structural gene coding region of the pestivirus border disease virus. *Virus Research* 33:219-228.
64. Tadich, N; Nettleton, P; Morgan, J; Hodgson, A; Macaulay, R; Reinhardt, G; Riedemann, S. 1998. Seroprevalencia de Border Disease en 22 ovejerías del sur de Chile. *Arch. Med. Vet.* 30(2):191-196.
65. Tizard, I. 1995. *Inmunología veterinaria*. 4a ed. p 245-249. Ed. Interamericana. México.
66. Tremblay, R. 1996. Transmission of bovine viral diarrhoea. *Vet. Med* 9: 858 - 866.
67. Vilcek, S; Herring, A; Nettleton, P, Lowings, J; Paton, D. 1994. Pestivirus isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol* 136:309-323.
68. Vilcek, S; Belak, S. 1996. Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. *J Virol Methods* 60:103-108.
69. Villarroel, J y Gamarra, M. 1978. *El Ovino Raza Junín*. Sociedad Agrícola de Interés Social Tupac Amaru Limitada N° 1. Pachacayo, Perú .Pp. 33.
70. Waage, S; Krogsrud, J; Nyberg, O. 1994. The Norwegian programme for eradication of bovine viral diarrhoea/mucosal disease. *Proceedings XVIII World Buiatrics Congress, August 29 – September 02, Bologna-Italy.* 773-776.
71. Waage, S; Krogsrud, J; Nyberg, O. 1996. Assesment of results of the Norwegian programme for the eradication of bovine virus diarrhoea. *Proceedings XIX World Buiatrics Congress, 8-12 July, Edinburgh.* 600-602.
72. Waage, S. 1997. Prevalence of sheep flocks in Norway with animals with antibodies to Ruminant Pestivirus. *European Symposium on control of BVD-virus infection in*

cattle, 3-5 sept. Lillehammer. Poster session. Section 4. Epidemiology and economy.

73. Zaghawa, A. 1998. Prevalence of antibodies to Bovine Viral Diarrhoea and/or Border Disease Virus in Domestic Ruminants. *J. Vet. Med* 45:345-351.