

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE DE MEDICINA VETERINARIA

**Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina, y
animales persistentemente infectados con el virus, en
hatos productores de leche de la irrigación de Majes,
Arequipa**

TESIS

para optar el título de Médico Veterinario

AUTOR

Juan Carlos Huamán Gonzáles

Lima – Perú

2006

ÍNDICE DEL CONTENIDO

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE CUADROS.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. EL VIRUS DE LA DIARREAVIRAL BOVINA (VDVB).....	3
2.1.1. Morfología.....	3
2.1.2. Genoma y proteínas virales.....	3
2.1.3. Biotipos.....	5
2.1.4. Genotipos.....	5
2.1.5. Variabilidad.....	6
2.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	6
2.2.1. Prevalencia.....	6
2.2.2. Fuentes de infección.....	7
2.2.3. Formas de transmisión.....	7
2.2.3.1 Transmisión horizontal.....	7
2.2.3.2 Transmisión vertical.....	8
2.3. PATOGENIA Y DESARROLLO CLÍNICO.....	8
2.3.1. Infecciones subclínicas.....	9
2.3.2. VDVB, inmunosupresión y complejo respiratorio.....	9
2.3.3. Infecciones agudas.....	9
2.3.4. Diarrea viral severa.....	9
2.3.5. Infecciones en hembras gestantes.....	10
2.3.6. Inmunotolerancia e infecciones persistentes.....	11
2.3.7. Enfermedad de las mucosas (EM).....	11
2.4. RESPUESTA INMUNITARIA EN LAS INFECCIONES POR VDVB.....	12
2.5. DIAGNÓSTICO.....	13
2.5.1. Aislamiento en cultivo celular.....	13
2.5.2. Detección de antígenos virales.....	14
2.5.2.1. Inmunofluorescencia.....	14
2.5.2.2. Inmunoperoxidasa.....	14
2.5.2.3. ELISA de captura de antígenos.....	14
2.5.3. Detección de anticuerpos.....	14

2.5.3.1. Neutralización viral (VN).....	15
2.5.3.2. Inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA).....	15
2.5.3.3. Serología en leche.....	15
2.5.4. Detección del ácido nucleico viral.....	16
2.6. PREVENCIÓN Y CONTROL.....	16
2.6.1. Implementación de medidas de bioseguridad	17
2.6.2. Identificación y eliminación de animales persistentemente infectados (PI).....	17
2.6.3. Vacunación.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. LUGAR DE ESTUDIO.....	19
3.2. MATERIALES.....	20
3.2.1. Hatos y animales.....	19
3.2.2. Equipos.....	19
3.2.3. Materiales.....	20
3.2.4. Reactivos.....	20
3.3. MÉTODOS.....	20
3.3.1. Tamaño muestral.....	20
3.3.2. Diseño del estudio.....	21
3.3.3. Obtención de las muestras.....	22
3.3.4. Detección de anticuerpos en leche mediante de la prueba de ELISA indirecta.....	22
3.3.5. Detección de anticuerpos en suero sanguíneo mediante de la prueba de ELISA indirecta.....	23
3.3.6. Detección del antígeno viral mediante de la prueba de ELISA de captura.....	24
3.3.7. Análisis de datos.....	25
IV. RESULTADOS.....	26
V. DISCUSIÓN.....	30
VI. CONCLUSIONES.....	34
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	35
IX. APÉNDICE.....	44

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Detección de hatos con anticuerpos contra el VDVB en muestras de leche de la Irrigación de Majes mediante la prueba de ELISA indirecta, 2004.....27

Cuadro 2. Distribución de las DO de las muestras de leche (n=204) de la Irrigación de Majes mediante prueba de ELISA indirecta, 2004.....27

Cuadro 3. Detección de anticuerpos contra el VDVB, en muestras de suero de animales provenientes de 57 hatos que presentaron $DO \geq 0.900$ al examen de leche, mediante la prueba de ELISA indirecta, 2004.....28

Cuadro 4. Hatos positivos a anticuerpos contra VDVB en leche con altas DO en donde se detectaron animales PI, mediante la prueba de ELISA de captura, 2004.....28

Cuadro 5. Detección de animales PI, en el grupo de animales de 6 a 24 meses de edad (n=20) de los 3 hatos que tuvieron animales PI, mediante la prueba de ELISA de captura, 2004.....29

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) y de animales persistentemente infectados (PI), en bovinos productores de leche en la Irrigación de Majes, provincia de Caylloma, Arequipa. El estudio fue efectuado en tres fases consecutivas. En la primera, se colectaron 204 muestras de leche de tanque (uno por hato) en la planta de procesamiento de la empresa Gloria S.A., para la detección de anticuerpos contra el VDVB mediante la prueba de ELISA indirecta. En la segunda fase se seleccionaron de modo arbitrario 57 hatos positivos a anticuerpos contra el VDVB con densidades ópticas (DO) iguales o mayores a 0.900, de los animales de estos hatos se colectaron 286 muestras de suero sanguíneo, para conocer el status serológico de cada animal y la búsqueda de animales PI mediante ELISA indirecta y ELISA de captura respectivamente. En la tercera fase se obtuvieron muestras de suero de la totalidad de terneras y vaquillas ($n = 20$) de tres hatos que tuvieron animales PI en busca de más animales PI. El $98.04 \pm 1.90\%$ (200/204) de las muestras de leche resultaron positivas a anticuerpos contra el VDVB con DO que fluctuaron entre 0.300 a 2.350. De las 286 muestras de suero pertenecientes a los 57 hatos, el 47.20% (135/286) tuvieron anticuerpos contra el VDVB y 52.80% (151/286) no; además, dentro de este grupo de animales seronegativos se detectaron 4 (2.65%) animales PI que pertenecieron a 3 de los 57 hatos muestreados. En los animales ($n = 20$) del grupo riesgo de los tres hatos, se detectaron otros 2 animales PI, sumando un total de 6 (3.30%), además estos 6 animales PI no presentaron anticuerpos contra el VDVB. Los resultados muestran una amplia distribución del VDVB en la población bovina de los hatos de la Irrigación Majes. Las muestras que presentan altas DO evidencian la presencia de animales PI. La muestra de leche de tanque reemplaza al suero para detección de anticuerpos contra el VDVB en vacas en producción evitando el estrés por manipulación y reduciendo el costo de los análisis.

Palabras clave: bovinos, diarrea viral bovina, virus, anticuerpos, animales persistentemente infectados, suero, leche, hatos.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and persistently infected (PI) animals, in dairy herds located in Majes Arequipa, Peru. The study was carried out in three steps. In the first step, 204 bulk tank milk samples corresponding to 204 herds were taken at Gloria S.A. processing plant in Majes for detection of antibodies against BVDV by indirect ELISA test. In the second step, 286 blood samples were taken from 57 strong positive (Optical Density [OD] ≥ 0.900) herds for antibodies against BVDV and PI animals' detection by indirect and capture ELISAs respectively. In the third step, blood samples were taken from all the animals up to 6 to 24 months old from three herds that have at least one PI animal. The prevalence of BVDV in the 204 herds was $98.04 \pm 1.90\%$ (200/204), the levels of antibodies ranged from 0.300 to 2.350 OD. The $47.20 \pm 5.79\%$ (135/286) of serum samples had antibodies against BVDV, but 52.80% (151/286) were negative and in this group of negative animals, four ($2.65 \pm 2.56\%$) PI animals, belonged to three from the 57 herds, were detected. Two additional PI animals were detected in the young animals ($n = 20$) from these three herds. In total six ($3.30 \pm 3.12\%$) PI animals were found and they did not develop antibodies against BVDV. The results indicate that BVDV is widespread in dairy herds in Majes. The high level of antibodies suggests the presence of PI animals in the bovine population. Finally, the bulk tank milk samples are very useful for antibodies detection from milking cows reducing stress and the cost of the analysis.

Key words: bovine, bovine viral diarrhoea virus, antibodies, persistently animals (PI), serum, bulk tank milk, dairy herds.

I. INTRODUCCIÓN

La industria lechera del país está concentrada, principalmente, en tres cuencas: Arequipa, Lima y Cajamarca (MINAG, 1996). Actualmente, esta importante industria está extendiéndose hacia zonas como Trujillo en la Libertad y el valle del Mantaro en Junín, pero en el futuro posiblemente se expanda hacia otros valles interandinos con disponibilidad de recursos forrajeros.

La cuenca lechera de Arequipa es la principal del país, cuenta con una población aproximada de 50 000 vacas en producción y contribuye con el 22% de la producción lechera nacional (Andresen, 2001). La cuenca está conformada por varias irrigaciones, entre ellas Santa Rita, La Joya y Majes, estando más de la mitad de sus áreas cultivadas dedicadas al forraje. La producción lechera de estas irrigaciones, que representa más del 60% de la producción total de la cuenca (C. Ortiz, comunicación personal), se concentra principalmente entre los pequeños productores que colectan la leche en porongos que son recolectados y transportados hacia las plantas procesadoras de grandes empresas como Gloria S.A. y Laive S.A. Dicha producción asciende a unos 480 000 L/día (Olivera, 2001).

La industria lechera en el país afronta serios factores que limitan su desarrollo. Algunos de estos factores son las enfermedades infecciosas como la Neosporosis y Diarrea Viral Bovina (DVB), causados por el parásito *Neospora caninum* y el virus de la DVB (VDVB) respectivamente (Olivera, 2001). Son ampliamente conocidas las consecuencias de la infección transplacentaria del VDVB sobre todo en bovinos de hatos lecheros (Houe, 1999; Houe, 2003). El efecto de estas enfermedades sobre la

eficiencia productiva y reproductiva de los animales y el impacto económico para la industria lechera han permitido realizar numerosas investigaciones tendientes a conocer la epidemiología, patogénesis y biología del virus, conocimientos que están haciendo posible el control y erradicación de la enfermedad (Ståhl *et al.*, 2006).

Los resultados de los estudios que vienen efectuándose sobre la DVB, indican que el virus está ampliamente difundido en las principales cuencas lecheras del país. Estudios previos sobre la DVB en la cuenca de Arequipa, evidenciaron la infección en algunos establos de crianza intensiva principalmente en Santa Rita, pero no se había involucrado a las ganaderías de otras áreas como Majes. Estas están constituidas principalmente por pequeños ganaderos que en promedio poseen entre 5 a 10 vacas en producción y que son el sustento de sus familias. Por otro lado es conocido el alto costo de los estudios de prevalencia ya que requieren de mucho material y esfuerzo en el muestreo individual, además del estrés causado a las vacas en producción. En países como Dinamarca y Suecia, se utiliza la leche para detección de anticuerpos contra varias enfermedades virales entre ellas la DVB, ya que las inmunoglobulinas se encuentran también en la leche y pueden proporcionar valiosos datos epidemiológicos a nivel de hatos.

El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de hatos seropositivos al VDVB en la Irrigación de Majes utilizando muestras de leche de porongos y suero de animales de 6 a 24 meses de edad de los mismos hatos. Adicionalmente, se determinó la presencia de animales portadores o persistentemente infectados (PI) por ser estos animales los principales diseminadores del virus.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB)

La diarrea viral bovina es una enfermedad que afecta a los animales ungulados domésticos y silvestres en el mundo (Nettleton y Etrican, 1995). Esta enfermedad de considerable importancia en el ganado vacuno es causada por el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) que pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae* (Francki *et al.*, 1991). El virus está antigénicamente relacionado con el virus de la peste porcina clásica o cólera porcino (VPPC, CP) y con el virus de la enfermedad de la frontera o border disease (VEF, BDV), presentando además un genoma homólogo al virus de la hepatitis C humana (VHC) (Brownlie *et al.*, 1998).

2.1.1. Morfología

El VDVB es una partícula de 40 – 60 nm de diámetro, constituida por una cápside icosaédrica de naturaleza proteica y una envoltura lipídica externa (Kobrak y Weber, 1997).

2.1.2. Genoma y proteínas virales

El genoma está constituido por una cadena simple de ARN de polaridad positiva que, al actuar como ARNm, hace que sea infectante a su ingreso a la célula. Consta de 4 400 nucleótidos con un peso molecular de 12.0 a 12.5 Kilodáltons (Sanjuán *et al.*, 1999).

El genoma codifica dos glicoproteínas asociadas a la envoltura, la E1 y la E2; además de una glicoproteína extra de envoltura, la E0^{ms}, una ARNasa que posee *in vitro* un efecto inmunosupresivo, citotóxico y apoptótico para los linfocitos bovinos (Bruschke *et al.*, 1997).

Las proteínas estructurales se codifican en el extremo 5' en el primer tercio del genoma, las no estructurales, a excepción de la proteína N^{pro}/p20 que se codifica también en el primer tercio, se codifican en los tercios restantes, hacia el extremo 3' (Donis, 1995; Potgieter, 1995).

Los principales productos de la codificación del genoma son los siguientes:

*N^{pro}/p20: Es la primera en ser traducida y cumple función de autoproteasa, generando el extremo N-terminal para la proteína C/p14 (Donis, 1995).

*C/p14: Es la segunda proteína generada y es la más abundante. Constituye la cápside y antígeno del grupo viral. Su función es empaquetar el ARN genómico y proveer las interacciones necesarias donde se anclará la envoltura del virión (Donis, 1995).

*E0^{ms}/gp48: Glicoproteína bien conservada que induce altos niveles de anticuerpos aunque con escasa capacidad neutralizante; es una ARNasa secretada al espacio extracelular por exocitosis durante la replicación viral (Donis, 1995), causando inmunosupresión y leucopenia (Bruschke *et al.*, 1997).

*E2/gp53: Es la glicoproteína más importante del virión y antígeno del serotipo. Esta glicoproteína es muy antigénica e induce la producción de anticuerpos neutralizantes luego de una infección o vacunación con vacunas vivas o muertas. Contiene una región hipervariable altamente mutable donde ocurren las mutaciones y cambios antigénicos que da lugar a la aparición de cepas variantes del VDVB (Donis, 1995; Paton, 1995).

*NS23/p125: Proteína no estructural que posee propiedades de elicasa y proteasa, indispensable en la replicación viral; cuenta con dos dominios que actúan por separado, NS2 y NS3, cada uno con distintas propiedades químicas. El ganado infectado o vacunado con virus vivo modificado desarrolla una fuerte respuesta humoral contra este polipéptido, mientras que, la vacuna a virus muerto produce una respuesta insignificante. Los anticuerpos contra NS23/p125 producen reacción cruzada entre VDVB, VPPC y VEF (Donis, 1995; Potgieter, 1995).

*NS3/p80: Proteína que surge a partir de la escisión de NS23/p125, determinando el fenotipo del VDVB. Al igual que NS23/p125, tiene actividad elicasa en el extremo carbono terminal y proteasa en el extremo amino terminal. Está presente únicamente en el biotipo citopatogénico del virus y se produce por mutaciones o recombinaciones entre ARN del VDVB y ARN celular o duplicaciones del ARN viral (Donis, 1995; Paton, 1995).

2.1.3. Biotipos

El VDVB presenta dos biotipos basados ambos en su actividad en cultivos celulares: biotipo citopatogénico (CP) y biotipo no citopatogénico (NCP), ambos causantes de la misma enfermedad con todos los signos característicos de la DVB (Paton, 1995; Vanroose *et al.*, 1998; Ridpath, 2003). Las diferencias de biotipo en antígenos expresados pueden ser detectados usando suero policlonal (serotipo), tropismo en el hospedero, y virulencia (Ridpath, 2003).

El biotipo NCP, que no causa daños observables *in vitro*, se aísla generalmente en casos de infección aguda y está presente en todos los animales persistentemente infectados (PI) (Deregt y Loewen, 1995; Paton, 1995; Ridpath, 2003).

El biotipo CP causa lesiones en cultivo celular y surge del biotipo NCP por recombinaciones con el ARN de la célula hospedadora o de otros virus. Debido a esto, ambos tipos de virus son molecularmente diferentes aunque inmunológicamente similares (Bolin, 1995). Mediante análisis serológicos y estudios de secuenciamiento se ha demostrado que el biotipo CP surge de la mutación del biotipo NCP, mientras que otros estudios revelan que la recombinación del ARN viral y celular es la responsable de la aparición del virus CP. Trabajos posteriores señalan además, que el biotipo CP puede originarse de las mutaciones puntuales del gen NS2 (Kümmerer *et al.*, 2000). Molecularmente el biotipo NCP posee sólo la proteína p125, mientras que el biotipo CP posee además la proteína p80, la cual le da el fenotipo citopatogénico al virus (Donis, 1995; Potgieter, 1995).

2.1.4. Genotipos

Mientras que el fenotipo se basa en diferencias de rasgos expresados como la citopatología en cultivo celular, el genotipo se refiere a diferencias en el genoma viral.

Existen dos genotipos: el VDVB 1 y el VDVB 2, pudiendo ambos existir como cualquiera de los dos biotipos.

En la práctica, la relevancia de los genotipos se basa en sus importantes diferencias biológicas. Aún cuando poseen muchas similitudes, haciendo que la infección aguda en adultos con cualquiera de ellos conlleve a una infección benigna o subclínica, hay diferencias significativas entre ambos, siendo lo más importante su diferenciación genómica. Los primeros VDVB 2 caracterizados fueron aislados de animales PI nacidos de madres que habían sido vacunadas con vacunas de VDVB 1. Los VDVB NCP aislados de ambos genotipos pueden originar infecciones persistentes (Ridpath, 2003).

2.1.5. Variabilidad

El genoma ARN del VDVB tiende a realizar un alto rango de mutaciones que lo llevan a la heterogeneidad, esta característica ayuda al VDVB y otros *Pestivirus* a adaptarse y evadir los sistemas inmunológicos de sus hospederos favoreciendo su supervivencia. La región más variable del genoma codifica la proteína E2 que posee epítomos que son reconocidos por el sistema inmunitario del hospedero, los cambios en estos epítomos permiten al virus evadir la neutralización (Donis, 1995; Ridpath, 2003).

Mediante el análisis de la región no traducida 5' (5'UTR) y el segmento N^{pro} del genoma del virus, se ha demostrado que existen al menos 11 subtipos del VDVB genotipo 1, pudiendo existir aún más tipos virales (Vilček *et al.*, 2001). Estos resultados indican además, que la distribución en el mundo de estos subgenotipos, no guardan relación con su origen geográfico. Hasta el momento, sólo se han descrito de 2 a 4 grupos del VDVB 2 (Vilček *et al.*, 2005).

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

2.2.1. Prevalencia

El VDVB se encuentra ampliamente distribuido en el mundo entero; sin embargo, la considerable variación de las prevalencias, tanto de animales seropositivos como de animales portadores o PI, se debería a las diferencias entre los sistemas de manejo y al tamaño de los hatos de cada localización (Lindberg y Alenius, 1999). Aquellos lugares donde las explotaciones presentan altas densidades poblacionales, suelen presentar las mayores prevalencias (Houe, 1999; Solís-Calderón *et al.*, 2005).

En el Perú, estudios realizados por investigadores de la FMV-UNMSM han determinado una amplia distribución del VDVB en las cuencas lecheras, con prevalencias superiores al 70% (Rivera *et al.*, 2003). Contreras *et al.* (2000) reportaron una prevalencia de 72.4% en el valle del Mantaro, mientras que Jayashi *et al.* (2005) encontraron 80.2% en un establo de crianza intensiva de la provincia de Arequipa. Otros estudios encontraron 73.7% en la provincia de Canchis, Cuzco (Álvarez *et al.*, 2001) y 85.3% en Parinacochas, Ayacucho (Rivera *et al.*, 2001).

2.2.2. Fuentes de infección

Los animales PI son considerados la principal fuente de infección y diseminación del VDVB. Esto se debe a que estos animales eliminan constante y abundantemente el virus durante toda su vida a través de sus secreciones y excreciones (descarga nasal, saliva, lágrimas, leche, orina, heces y semen), al grado tal que en solo 3 ó 4 meses pueden infectar al 90% del ganado en contacto con ellos (Houe, 1995; Houe, 1999). Las infecciones agudas son también una fuente de infección aunque de menor importancia, debido al corto periodo de duración de la misma (unos 6 días), como a la menor cantidad de virus excretado (Houe, 1995; Lindberg y Alenius, 1999).

Adicionalmente a los bovinos, el VDVB podría estar presente en algunas otras especies como ovinos, caprinos, camélidos, búfalos de agua y rumiantes silvestres, puesto que los *Pestivirus* cruzan la barrera de especies (Nettleton y Etrican, 1995).

2.2.3. Formas de transmisión

2.2.3.1 Transmisión horizontal

La principal vía de transmisión horizontal es la directa. Esto ocurre por contacto, generalmente oronasal, de un animal susceptible con otro infectado, a través de secreciones y excreciones como saliva, orina, heces, descarga oculonasal, secreción vaginal, fetos abortados y placentas (Tremblay, 1996). También puede ocurrir por el semen de toros que se encuentren en la fase aguda de la infección o que sean PI, tanto por monta natural como por inseminación artificial (Baker, 1995; Vanroose *et al.*, 1998).

La vía indirecta ocurre a través de la ropa del personal involucrado en el manejo de los animales o instrumentos de uso veterinario contaminados y por algunas moscas picadoras (Bitsch y Ronsholt, 1995). Además, experimentalmente se demostró que el

VDVB puede transmitirse incluso por vía aerógena desde un bovino PI hacia uno susceptible en un plazo aproximado de una semana (Mars *et al.*, 1999).

2.2.3.2 Transmisión vertical

Esta vía de transmisión ocurre cuando una madre PI le pasa el virus a su cría, o cuando la madre sana se infecta horizontalmente y origina un feto PI (Houe, 1995). De esta manera, se pueden originar generaciones familiares sucesivas de animales PI, los que al ir llegando a la madurez sexual se reproducen y continúan con el círculo de transmisión del virus (Houe y Meyling, 1991).

La transferencia de embriones de una hembra donante PI es también una forma de transmisión vertical (Corrales *et al.*, 1999).

2.3. PATOGENIA Y DESARROLLO CLÍNICO

Las infecciones por VDVB abarcan cuadros que van desde una infección aguda transitoria que puede ser inaparente o ligera, hasta la enfermedad de las mucosas, inevitablemente fatal. Es probable que el sitio de replicación inicial sea la mucosa oronasal, particularmente la tonsila palatina, y luego, desde allí se disemine a todo el sistema. La rápida replicación del virus en las células epiteliales puede ser responsable de la ulceración y subsiguiente salivación o descarga nasal. La diseminación sistémica se puede dar por virus libres en el suero o por virus asociados a leucocitos circulantes (Brownlie, 1991).

El VDVB posee un tropismo universal por diferentes tejidos del cuerpo del animal induciendo a una variedad de signos clínicos (Brownlie *et al.*, 1998). Las manifestaciones clínicas de las infecciones por *Pestivirus* dependen del estado de salud del hospedero y su estado reproductivo, cepa del virus, y la presencia de patógenos secundarios. Los síntomas involucran los sistemas respiratorio y gastrointestinal, además del reproductivo, inmunitario y sistema nervioso central, siendo estos últimos los más importantes; esto conlleva a cuadros que van desde una infección subclínica a otro altamente fatal con mortalidad en animales adultos mayor al 50% (Brownlie *et al.*, 1998; Ridpath, 2003). Las infecciones por VDVB frecuentemente no se diagnostican clínicamente debido al amplio rango de severidad y variedad de síndromes que presentan (Nettleton y Etrican, 1995), como los que siguen a continuación:

2.3.1. Infecciones subclínicas

La mayoría de las infecciones son subclínicas o de carácter moderado, con leves signos, elevada morbilidad y baja mortalidad (Baker, 1995). Clínicamente, la infección aguda por VDVB, puede ser inaparente, aún cuando se reconoce al virus como el principal componente de enfermedades respiratorias, particularmente en terneros (Brownlie *et al.*, 1998).

2.3.2. VDVB, inmunosupresión y complejo respiratorio

Las infecciones por VDVB inmunosuprimen al hospedero, pudiendo potenciar la patogenicidad de agentes concomitantes y ampliar el rango de manifestaciones clínicas asociadas al virus. El VDVB tiene una fuerte afinidad por el tejido linforreticular, ocasionando necrosis y atrofia de dichos tejidos (Baker, 1995), además, la glicoproteína E0^{ms} tendría un efecto inmunosupresor ya que se ha demostrado que causa citotoxicidad y apoptosis en linfocitos bovinos (Bruschke *et al.*, 1997).

Dentro de este espectro inmunosupresor, el VDVB puede quebrantar la inmunidad pulmonar y del tracto respiratorio, pudiéndose asociar con agentes virales y bacterianos tales como Parainfluenza tipo 3 (PI 3), Virus Herpes Bovino tipo 1 (BHV 1, IBR), Virus Respiratorio Sincitial (RSV), y principalmente a *Pasteurella haemolytica*, llevando a un cuadro conocido como complejo respiratorio bovino, causal de grandes pérdidas económicas (Baker, 1995; Fulton *et al.*, 2000).

2.3.3. Infecciones agudas

La mayoría son causadas por cepas NCP (Baker, 1995); clínicamente se caracterizan por depresión, inapetencia, descarga oculonasal, estomatitis erosiva, gastroenteritis y diarrea. También puede haber ooforitis e infertilidad temporal (Vanroose *et al.*, 1998). En hatos susceptibles se observa elevada morbilidad con escasa o nula mortalidad. Los anticuerpos neutralizantes se generan a las 3 ó 4 semanas, prevaleciendo probablemente por años (Baker, 1995; Vanroose *et al.*, 1998; Fredriksen *et al.*, 1999).

2.3.4. Diarrea viral severa

Mientras la infección aguda con la mayoría de cepas del VDVB termina en una enfermedad leve o subclínica, la infección con algún VDVB 2 NCP causa una severa enfermedad clínica que en un principio fue llamada Síndrome Hemorrágico debido al

sangrado observado en algunos casos. Esta forma de DVB es llamada ahora DVB Severa Aguda (DVB SA) que se caracteriza por una prolongada pirexia ($>41^{\circ}\text{C}$ por tres o más días y temperaturas basales frecuentemente excediendo los 40°C), anorexia, diarrea sanguinolenta, hemorragias petequiales y equimóticas, hemorragias en varios sistemas, epistaxis, anemia, leucopenia, trombocitopenia y muerte tanto de animales adultos como jóvenes (Bolin y Ridpath, 1992; Ridpath, 2003). Estos signos se deberían a una acción del virus contra la función plaquetaria, la que resultaría alterada (Walz *et al.*, 1999).

Todas las cepas DVB SA aisladas han pertenecido al biotipo NCP (Ridpath, 2003).

2.3.5. Infecciones en hembras gestantes

Las infecciones en las vacas preñadas susceptibles son usualmente subclínicas aunque hay una alta probabilidad de difusión transplacentaria del virus hacia el feto. Esto lleva a una variedad de respuestas que van desde el aborto y nacimiento de terneros débiles y pequeños con o sin malformaciones congénitas, hasta el nacimiento de terneros clínicamente normales. El principal determinante del caso, es la edad del feto al momento en que ocurre el desafío viral, aunque el estado inmunológico de la madre también puede ser determinante (Murray, 1991).

Una vaca que se infecta poco después de la fertilización generalmente presenta muerte embrionaria y repetición del celo (Mc Gowan *et al.*, 2003). El virus no afecta al embrión sino hasta el momento en que pierde su zona pelúcida y el daño puede ser citolítico o no, en este último caso, podría haber un daño cromosómico que origine malformaciones futuras. La replicación viral en el oviducto altera la función de soporte del desarrollo embrionario (Vanroose *et al.*, 2000).

El feto se hace inmunocompetente hacia el día 125 de la gestación, una infección ocurrida antes de este tiempo, resulta en muerte fetal, momificación y aborto meses después. Si el virus pertenece al biotipo NCP se puede originar un ternero PI inmunotolerante (Moennig y Liess, 1995).

En el periodo posterior, hasta los 175 días de gestación se suelen presentar defectos congénitos tales como hipoplasia cerebelar, microencefalia, hipomielogénesis, hidro e hidranencefalia, atrofia de timo, cataratas, microftalmia, degeneración de retina, alopecias, hipotricosis, hipoplasia pulmonar, retraso general del crecimiento y deformidades esqueléticas (Murray, 1991). Es posible que esto se deba al daño celular

directo por parte del virus o a la destrucción celular indirecta producida por el propio sistema inmune fetal (Dubovi, 1994; Moennig y Liess, 1995).

Las infecciones del día 175 en adelante terminan en el nacimiento de terneros seropositivos. Se ha reportado abortos en la preñez tardía durante brotes de campo del VDVB, aunque frecuentemente acompañados de evidencia de reciente desafío con otros agentes infecciosos tales como *Leptospira hardjo*, *Coxiella burnetti*, *Corynebacterium pyogenes*, estafilococos y estreptococos hemolíticos (Murray, 1991).

2.3.6. Inmunotolerancia e infecciones persistentes

Un animal es PI si es que se puede aislar virus de su sangre o tejidos en dos pruebas sucesivas con un espacio no menor a dos semanas. El ternero PI se origina cuando la madre se infecta con un virus NCP entre los días 18 y 125 de gestación; en este periodo el virus es reconocido como propio generándose la inmunotolerancia y persistencia (Grooms, 2004). No se conoce el periodo exacto en que se produce la persistencia, aunque experimentalmente se produjeron terneros PI en el 86% de los que nacieron de vacas infectadas a los 18 días, y en el 100% de los que nacieron de vacas infectadas a los 30 y a los 75 días. Luego del día 100 de gestación es rara la presentación de terneros PI aunque se ha reportado hasta el día 125 (Baker, 1995).

En el feto temprano, todos los tejidos son altamente permisibles a la infección, estos terneros quedarán infectados por el resto de sus vidas convirtiéndose en los principales reservorios del virus y serán responsables de nuevos brotes de la enfermedad (Brownlie *et al.*, 1998).

2.3.7. Enfermedad de las mucosas (EM)

Esta forma de DVB se presenta en animales PI que son infectados con un virus CP homólogo al NCP que poseen. Es probable que el virus NCP propio del animal PI sea la fuente del CP, resultado de mutaciones espontáneas dentro del mismo animal PI; estas mutaciones fueron identificadas primariamente como recombinaciones del ARN celular del hospedero con el ARN viral, y como combinaciones del ARN viral consigo mismo; en este último caso se encontraron fragmentos de ARN adicionales en el genoma viral y se expresaron proteínas con características de VDVB CP (Bolin, 1995).

Cuando un feto bovino se infecta con un VDVB NCP durante los primeros cuatro meses nace como un ternero PI inmunotolerante al VDVB. Luego, en algún momento

de su vida, el animal es infectado horizontalmente con un virus CP u ocurre un evento mutacional del ARN del virus NCP creando un virus CP. Entonces, el sistema inmune del hospedero no reacciona en contra del virus CP ya que sus proteínas estructurales son antigénicamente similares al virus NCP residente; el virus CP se propaga en el hospedero causando una depleción progresiva del tejido linfoide asociado al intestino (GAL) y necrosis de la mucosa sobreyacente. El animal presenta diarrea, se deshidrata y muere por EM. Si el nuevo VDVB CP se diseminara a otro animal PI en el hato, es probable que este también desarrolle EM (Bolin, 1995).

En forma aguda esta enfermedad afecta a los animales de entre 6 meses y 2 años, afectando a menos del 5% del hato. La forma clínica se caracteriza por pirexia, depresión, debilidad, anorexia, emaciación y deshidratación, además de extensas erosiones en la mucosa gastrointestinal. La muerte del animal ocurre usualmente dentro de las 2 semanas luego de iniciados los signos clínicos (Baker, 1987). Es posible que ocurra también una forma crónica en la que se observan signos similares a la forma aguda, sin embargo, se puede observar además hiperqueratosis en la zona del cuello, lesiones erosivas en el hocico, región perianal, vulva, prepucio y espacios interdigitales; laminitis y deformación de los cascos. Los animales afectados pueden llegar a sobrevivir hasta 8 meses, muriendo por debilidad (Brownlie, 1991; Baker, 1995).

2.4. RESPUESTA INMUNITARIA EN LAS INFECCIONES POR VDVB

Los virus en general poseen dos estrategias diferentes para permanecer en sus hospederos: infecciones transitorias de corta duración y rápida diseminación (rabia, viruela), e infecciones prolongadas con persistencia en las que el virus posee todo un mecanismo de evasión inmunitaria (VIH, herpes). El VDVB es un caso excepcional que usa ambos sistemas de supervivencia; el primero en las infecciones agudas, que produce una respuesta humoral que puede durar por toda la vida del animal, y el segundo cuando se generan los PI que, aún cuando pueden responder ante otros agresores, son tolerantes al virus invasor específico (Peterhans *et al.*, 2003). En ambos casos, las infecciones por VDVB predisponen al animal a infecciones secundarias por diversos agentes patógenos por mecanismos inmunosupresores aún no definidos (Potgieter, 1995), aunque se ha demostrado que la glicoproteína E0^{ms} formaría parte de este efecto inmunosupresor al producir citotoxicidad y apoptosis de los linfocitos (Bruschke *et al.*, 1997).

El VDVB NCP es capaz de inhibir la expresión de INF-I y en consecuencia la apoptosis de las células infectadas, de esta manera, el virus suprime un elemento clave en la respuesta antiviral del sistema inmunitario innato, lo que es esencial para su persistencia en el hospedero (Peterhans *et al.*, 2003).

En las infecciones agudas por VDVB se obtienen respuestas CD4⁺ y CD8⁺, aunque la respuesta linfoproliferativa en los virus CP es más rápida que en los NCP y hay reacción cruzada entre los virus serológicamente distintos. Pese a esto, se sugiere que las células CD4⁺ juegan un papel primordial en la resolución de la infección aguda por VDVB. Los anticuerpos maternos neutralizantes pueden reducir la viremia temporalmente pero no eliminan la infección en animales PI, esto demuestra que la respuesta humoral es insuficiente para la eliminación de células infectadas. La depleción *in vivo* de CD4⁺ pero no de CD8⁺ ni Tγδ⁺, prolonga el periodo de diseminación viral en terneros infectados agudamente (Collen y Morrison, 2000).

Los terneros que tienen anticuerpos calostrales circulantes contra el VDVB, que se exponen a vacunas de virus vivo modificado o a cepas del virus, producen respuestas celulares tipo T cooperadora (CD4⁺), T citotóxica (CD8⁺) y Tγδ⁺, además de B de memoria, todo esto en ausencia de respuesta humoral. Estos animales al hacerse seronegativos pueden ser resistentes a la infección aguda por VDVB mediante la respuesta celular (Endsley *et al.*, 2003).

Las proteínas que determinan la respuesta CD4⁺ son las de envoltura E0^{ms} y E2, la no estructural NS23 y las C y/o N^{pro} (Collen y Morrison, 2000).

2.5. DIAGNÓSTICO

2.5.1. Aislamiento en cultivo celular

Es la prueba estándar teniendo como ventaja el tener una alta especificidad. Sin embargo, es un método muy laborioso y costoso al depender de cultivos celulares permanentes, equipos especiales y personal calificado; además, esta prueba no puede diferenciar entre infecciones agudas y animales PI, ni virus endógeno que pudiera encontrarse en los cultivos celulares (Dubovi, 1996).

2.5.2. Detección de antígenos virales

2.5.2.1. Inmunofluorescencia

Esta prueba inmunohistoquímica usada sólo para tejidos en fresco, emplea anticuerpos contra el VDVB marcados con fluorocromos, los que a través del microscopio de fluorescencia, permiten la observación del antígeno viral. La sensibilidad de esta prueba es del 77%, mientras que su especificidad es del 83% (Lértora, 2003).

2.5.2.2. Inmunoperoxidasa

Esta es también una prueba inmunohistoquímica usada con tejidos frescos o fijados en formol en la que se emplea un anticuerpo monoclonal o policlonal marcado con la enzima peroxidasa, pudiéndose observar además del antígeno, la arquitectura del tejido y con ello las lesiones histológicas presentes en la muestra (Baszler *et al.*, 1995). La prueba tiene una sensibilidad y especificidad, ambas del 97% (Lértora, 2003).

2.5.2.3. ELISA de captura de antígenos

Existe una variedad de kits comerciales de ELISA de captura para la detección de antígeno viral. Estos se basan en el uso de anticuerpos monoclonales (Mabs) que reconocen la proteína NS23/p125, pudiéndose detectar diferentes cepas del VDVB en sangre entera; o la proteína E0^{ns} que puede detectarse además en suero o plasma (Mars y Van Maanen, 2005; Sandvik, 2005). En general, estas pruebas presentan sensibilidades y especificidades de entre 95 y 100% (Sandvik y Krogsrud, 1995; Sandvik, 2005).

2.5.3. Detección de anticuerpos

Las pruebas más usadas para la detección de anticuerpos contra el VDVB son las de neutralización viral (VN) y las de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) (Sandvik, 2005). La utilidad de estas pruebas se basa en detectar infecciones de DVB en hatos o poblaciones. Títulos altos de anticuerpos (VN), o densidades ópticas elevadas (ELISA), indican una infección activa dentro de un hato (Niskanen, 1993).

2.5.3.1. Neutralización viral (VN)

Es un sistema *in vitro* que cuantifica el efecto inhibitorio de los anticuerpos específicos sobre la capacidad infectiva, replicación y efecto citopatogénico del virus en los cultivos celulares (Rivera, 1993). Estos anticuerpos son predominantemente contra la glicoproteína E2, pudiéndose obtener distintos títulos dependiendo de la cepa viral usada en la prueba. Hecha con propiedad, esta prueba es muy sensible y específica, aunque es laboriosa, requiere de personal experimentado y un laboratorio bien equipado, y toma entre 5 a 6 días para su realización (Sandvik, 2005).

2.5.3.2. Inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA)

Cuando es necesario diagnosticar un gran número de muestras, las pruebas de ELISA tienen una serie de ventajas sobre la VN. Estas pruebas pueden detectar casi cualquier molécula inmunorreactiva y han ganado popularidad en la serología por varias razones: no dependen de cultivos celulares, pueden ser fácilmente empleadas en pruebas tamiz masivas, los resultados pueden leerse a las pocas horas, y en el caso del VDVB se pueden obtener resultados confiables a partir de la leche como material de prueba (Niskanen *et al.*, 1989). Los dos tipos principales de ELISA para la detección de anticuerpos son el indirecto y el de bloqueo. En la prueba indirecta, el color desarrollado por la unión enzima - sustrato es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en las muestras; en el tipo de bloqueo, estos anticuerpos evitan la formación del color, por lo que una muestra tendrá más anticuerpos cuanto más inhiba dicha coloración (Niskanen, 1993; Sandvik, 2005).

2.5.3.3. Serología en leche

Desde mediados de la década de los 80, las pruebas de búsqueda de anticuerpos en leche han jugado un rol significativo en los programas de control y erradicación de enfermedades en muchos países, particularmente en Europa central y Escandinavia. En Gran Bretaña, las pruebas para anticuerpos en pools de leche constituyen parte importante de los programas de control de enfermedades y de los esquemas formales de salud ganadera en casos de brucelosis, leucosis enzoótica bovina, DVB, IBR y *Leptospira hardjo*. Se ha reportado una buena correlación entre las concentraciones de anticuerpos en suero y leche. Además se han desarrollado kits de ELISA indirecta para el diagnóstico de DVB e IBR en leche y/o suero (Pritchard, 2001).

Ståhl *et al.* (2002) corrigieron la sensibilidad y la especificidad del ELISA indirecta para VDVB en pools de leche a partir de datos para muestras individuales, obteniendo 96 y 97% respectivamente.

2.5.4. Detección del ácido nucleico viral

El ARN viral puede detectarse mediante algunas técnicas moleculares entre las que se encuentran las denominadas sondas de ADN; estas consisten en copias clonadas a partir de un segmento del genoma del VDVB y marcadas con una molécula radiactiva o un grupo químico que puede ser revelado con una sustancia cromógena. Cuando esta pieza marcada se añade a un espécimen que contiene el VDVB, se une con su porción complementaria del virus a lo que se llama hibridación (Rivera, 1993).

A pesar que se han aplicado varios métodos para la detección del ARN pestiviral, solo la Transcripción Reversa de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), parece haberse adaptado para fines de diagnóstico. Es posible incluso diferenciar los genotipos 1 y 2 si se usan los primers específicos (Letellier y Kerkhofs, 2003).

Las principales ventajas del RT-PCR son su alta sensibilidad y su independencia de anticuerpos neutralizantes y sustancias citotóxicas presentes en las muestras; esta elevada sensibilidad también le hace indicado para monitorear materiales biológicos tales como vacunas, antisueros, semen, y materiales usados en transferencias de embriones. Sin embargo, el alto costo de los equipos y la necesidad de personal calificado, hacen que la prueba esté indicada para trabajar de preferencia con pools de leche o de sangre (Muñoz-Zanzi *et al.*, 2000; Givens *et al.*, 2002).

2.6. PREVENCIÓN Y CONTROL

Existen distintas experiencias alrededor del mundo sobre control de la enfermedad, sin embargo todas coinciden en la erradicación de los PI en caso de existir estos animales. Las estrategias a tomarse en este punto dependerán del estado sanitario de cada hato, ya sea que esté infectado, no infectado, en situación desconocida, o con vacunación (García *et al.*, 1999).

En aquellas explotaciones no infectadas, sin animales seropositivos, lo más importante es evitar el ingreso del virus a través de un estricto programa de bioseguridad, mientras que en condiciones de alto riesgo podría recurrirse a la vacunación (Van Oirschot *et al.*, 1999).

En las explotaciones infectadas el primer objetivo es identificar y eliminar los animales PI, rompiendo de esta manera el ciclo de vida del virus; con este método pueden lograrse hatos libres de enfermedad aunque es difícil mantener este estado (Sanjuán *et al.*, 1999).

En los Países Bajos se ha implementado un programa de monitoreo que incluye el uso simultáneo de RT-PCR en pool de leche y ELISA de captura en sangre completa y suero, con lo que han mejorado los costos y seguridad de los diagnósticos. El programa cuenta también con el llamado “Quick scan” que consiste en la combinación de tres pruebas: RT-PCR y ELISA indirecta en pool de leche, y ELISA indirecta en cinco terneros de 8 a 12 meses de edad, con lo que obtienen una indicación de la prevalencia de la enfermedad en el hato y la posible presencia de animales PI (Mars y Van Maanen, 2005).

2.6.1. Implementación de medidas de bioseguridad

Con estas medidas se busca evitar el ingreso del virus al hato. Para ello se debe hacer un control estricto de los animales que se incorporen, estos deben ser seronegativos al virus antes y después de un periodo de cuarentena. Las hembras gestantes recién adquiridas deben aislarse examinándose la cría al nacer. Debe evitarse el contacto de los animales con explotaciones vecinas y con otras especies que puedan actuar como reservorios del VDVB. Evitar el uso de semen y embriones sin certificación de ser libres de VDVB. Es necesario también desinfectar correctamente materiales y vestimenta de trabajo de profesionales y otros visitantes que tengan contacto con otros establos. Por último, se debe limitar al máximo el movimiento de animales dentro y fuera del establo, en especial las hembras gestantes (Bitsch y Ronsholt, 1995; Brownlie *et al.*, 1997; Lindberg y Alenius, 1999).

2.6.2. Identificación y eliminación de animales persistentemente infectados (PI)

Los animales PI constituyen la fuente más importante de infección viral por lo que su detección temprana y eliminación es el dogma central del control del VDVB (Bitsch y Ronsholt, 1995); detectarlos antes de su nacimiento podría dar una real ventaja en cualquier hato, incluso en planes de control nacional (Brownlie *et al.*, 1998).

Respecto a la DVB, a los animales entre 6 a 24 meses de edad se les denomina grupo en riesgo por ser los más susceptibles y por la mayor probabilidad de encontrar en este grupo a los animales portadores del virus o persistentemente infectados (PI).

2.6.3. Vacunación

Por largo tiempo la vacunación contra VDVB no fue específica para combatir la infección uterina, sino para mejorar la salud de los animales y prevenir la forma clínica. La implementación de vacunas que inducen protección fetal es relativamente reciente; sin embargo, la duración de la inmunidad y la posibilidad de protección cruzada contra las distintas cepas del virus, aun no son satisfactorias. La vacunación sin remoción de los animales PI no produce mejora alguna sobre la situación epidemiológica de un hatos. Un programa de vacunación solo será exitoso en la medida en que se aplique consistentemente y a escala regional o nacional en lugar de en hatos individuales (Moennig *et al.*, 2005).

Actualmente se viene implementando en Alemania un programa de vacunación a dos pasos. Se usa en primera instancia una vacuna a virus tipo 1 inactivado, seguido de una vacuna a virus vivo atenuado cuatro semanas después. Este sistema ha producido una respuesta inmune prolongada y protección fetal contra el desafío de VDVB 1 y 2 a partir del quinto mes luego de la vacunación. Este sistema sería efectivo conjuntamente con el monitoreo y erradicación de animales PI de los hatos (Moennig *et al.*, 2005).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en la Irrigación de Majes, en el departamento de Arequipa, situada a una altura de entre 1000 a 1500 m.s.n.m.; y en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Hatos y animales

Se consideraron 204 hatos, cada uno constituido por un promedio de 5 a 15 animales. Aquellos involucrados en el estudio fueron las vacas en producción y las terneras y vaquillas de 6 a 24 meses de edad.

3.2.2. Equipos

Para la elaboración de las pruebas en el laboratorio se emplearon los siguientes equipos:

*Centrífuga (Selecta®).

*Agitador de microplaca (Denley Wellwarm 1®).

*Espectrofotómetro (Labsystems Multiskan Plus®).

*Incubadora de 37° C.

*Refrigeradora.

*Congeladora.

3.2.3. Materiales

*Tubos al vacío (sistema Vacutainer®) de dos tipos: los primeros sin aditivos para la obtención de suero sanguíneo, y los segundos con anticoagulante EDTA para extracción de sangre entera.

*Agujas Vacutainer®.

*Portagujas Vacutainer®.

*Pipetas Pasteur.

*Viales.

*Micropipetas simples y multicanales de 5 a 50 µL, 50 a 200 µL, y 200 a 1000 µL.

*Microplacas estériles de 96 hoyos.

*Tips descartables.

*Papel de parafina.

*Agua destilada.

3.2.4. Reactivos

*Kit de ELISA indirecta de procedencia comercial (Svanova Biotech AB®, Suecia) para detección de anticuerpos contra VDVB, tanto en leche como en suero.

*Kit de ELISA de captura de procedencia comercial (Moredun Diagnostics®, Reino Unido) para la detección de antígenos del VDVB en suero o sangre entera.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Tamaño muestral

El cálculo del tamaño muestral se obtuvo mediante la fórmula (Daniel, 1996):

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{E^2}$$

Donde:

p = 0.85 Prevalencia referencial (H. Rivera, datos sin publicar).

q = 0.15 Complemento de prevalencia referencial.

Z = 1.96 Nivel de confianza al 95%.

E = 0.05 Error máximo permisible.

n = Número mínimo de hatos.

El tamaño muestral mínimo para hatos fue 196, aunque se dispuso de 204.

3.3.2. Diseño del estudio

El estudio se llevó a cabo en tres fases consecutivas. En la primera se trabajaron muestras de leche de porongo, representativas de los 204 hatos seleccionados, con el fin de determinar la prevalencia de anticuerpos contra el VDVB. En la segunda se trabajó con sueros sanguíneos de 286 animales, provenientes de 57 de los hatos con alta concentración de anticuerpos, para determinar el estado serológico y la presencia de animales PI. En la tercera fase se trabajó con sangre entera y suero sanguíneo de 20 animales pertenecientes a los grupos en riesgo de los hatos que tuvieron al menos 1 animal PI en la segunda fase.

Las fases se describen a continuación:

A) Primera fase:

Cada hato colecta el producto de sus ordeños en un porongo individual, siendo este último, representativo del hato. Estos porongos son recogidos diariamente por Gloria S.A. y trasladados a su planta de procesamiento en Majes.

Previo coordinación con la empresa Gloria S.A. en Arequipa, se procedió a coleccionar muestras de leche de los porongos escogidos al azar (un porongo por hato), en la planta de Gloria S.A. en Majes. Estas muestras de leche, bien identificadas y rotuladas fueron transportadas a la FMV-UNMSM, donde se procesaron mediante centrifugación a 2000 r.p.m. por 15 minutos para remover la fracción de lípidos. Luego se guardaron congeladas a -20°C hasta el momento de la realización del ELISA indirecta para la detección de anticuerpos contra el VDVB.

B) Segunda fase:

Dentro de los hatos con altos niveles de anticuerpos contra el VDVB (Densidad Óptica [DO] ≥ 0.900), se muestrearon 57, principalmente en función a las facilidades logísticas, obteniéndose muestras de sangre de animales escogidos al azar ($n = 5/\text{hato}$) de 6 a 24 meses de edad (grupo en riesgo). Estas muestras sumaron un total de 286, en las que se determinó la presencia de anticuerpos contra el VDVB mediante ELISA indirecta.

En el grupo de animales que resultaron negativos a anticuerpos, se realizó la búsqueda de antígeno viral mediante ELISA de captura para identificar a los animales portadores o PI.

C) Tercera fase:

En aquellos hatos donde se detectaron uno o más animales PI, se procedió a muestrear todos sus animales pertenecientes al grupo en riesgo (6 a 24 meses) ante la posibilidad de que existieran más animales PI en estos hatos. Los PI se identificaron mediante ELISA de captura.

3.3.3. Obtención de las muestras

A) Leche

Las muestras de leche se obtuvieron directamente de los porongos elegidos al azar en viales descartables de 10 mL, en la planta de procesamiento de la empresa Gloria S.A. en Majes. Estas luego fueron adecuadamente identificadas y transportadas a la FMV-UNMSM para su procesamiento.

B) Sangre

Las muestras de sangre se tomaron mediante punción de la vena caudal media en tubos al vacío, utilizando el sistema Vacutainer®, con y sin anticoagulante.

3.3.4. Detección de anticuerpos en leche mediante la prueba de ELISA indirecta

La detección de anticuerpos se realizó siguiendo las instrucciones del protocolo del kit comercial. (Svanova Biotech AB®, Suecia) Éste, brevemente consistió:

A) Preparación del PBS - Tween Buffer:

- a) Se pusieron todos los reactivos a temperatura ambiente, entre 18 y 25°C.*
- b) Se diluyó la solución concentrada de PBS - Tween Buffer en una proporción de 1/20 en agua destilada, preparando 500 mL por cada placa usada (25 mL de PBS-TB con 475 mL de agua destilada).*

B) Detección de anticuerpos contra el VDVB:

- a) Se descongelaron las muestras de leche previamente procesadas.*
- b) Se adicionaron 100 µL de los controles positivo y negativo para leche (reactivo C y D respectivamente) en los pocillos previamente determinados de la microplaca.*
- c) Se adicionaron 100 µL de las muestras individuales de leche en los pocillos restantes.*
- d) Se agitó la placa cuidadosamente y se llevó a incubación por espacio de 1 hora a 37°C.*

- e)* Terminada la incubación se procedió a eliminar el contenido de los pocillos y a enjuagar tres veces con 300 μ L de PBS-TB cada vez.
- f)* Se reconstituyó el Conjugado HRP anti-IgG bovino liofilizado adicionando 11.5 mL de PBS-TB por cada pélet utilizado.
- g)* Se adicionó 100 μ L de Conjugado HRP en cada pocillo y se incubó por 1 hora a 37°C.
- h)* Se eliminó el contenido de la placa y enjuagó otras tres veces con el PBS-TB.
- i)* Se adicionó 100 μ L de la solución sustrato a cada pocillo, incubando luego a temperatura ambiente por 10 minutos en la oscuridad.
- j)* Se adicionó 50 μ L de la solución de parada a cada pocillo en el mismo orden en que se adicionó el sustrato.
- k)* Se procedió a leer en el espectrofotómetro con filtro de 450 nm de absorbancia.

De acuerdo al protocolo del kit, se consideró una muestra como positiva a anticuerpos contra VDVB en leche, si presentaba una DO > 0.300; las muestras con densidades inferiores fueron consideradas como negativas.

3.3.5. Detección de anticuerpos en suero sanguíneo mediante la prueba de ELISA indirecta

El protocolo seguido en esta prueba fue similar al realizado en la búsqueda de anticuerpos en leche, para esto se preparó el PBS- Tween Buffer de la forma antes descrita y se procedió a la preparación de las muestras de suero de la siguiente manera:

- a)* Se adicionaron 100 μ L del buffer diluido a cada uno de los pocillos que se usaron, tanto para las muestras como para los controles.
- b)* Se adicionaron 4 μ L de suero control positivo (reactivo A) y 4 μ L de suero control negativo (reactivo B) a los pocillos predeterminados.
- c)* Se adicionaron 4 μ L de cada muestra en los pocillos restantes.
- d)* Se incubó al igual que para las muestras de leche y luego se procedió a seguir el resto del protocolo hasta su lectura final con el mismo nivel de absorbancia.

Una muestra fue considerada como positiva a anticuerpos contra VDVB en suero sanguíneo si presentaba una DO > 0.250, las DO menores fueron consideradas como negativas.

3.3.6. Detección del antígeno viral mediante la prueba de ELISA de captura

La detección de antígeno viral fue realizado siguiendo el protocolo del kit comercial (Moredun Diagnostics®, Reino Unido). Este kit permite la búsqueda de antígeno tanto en la fracción de células blancas sanguíneas (buffy coat), como en sangre entera. En el presente estudio se trabajó con sangre entera y suero, siendo el protocolo el siguiente:

A) Preparación de las muestras de sangre:

- a) Se llevaron todos los reactivos a temperatura ambiente.
- b) Se colocaron en los pocillos de una microplaca limpia 50 μ L de buffer de extracción C.
- c) Se adicionaron 50 μ L de las muestras de sangre sobre el buffer, agitando luego con cuidado hasta lograr mezclar completamente.

B) Detección del antígeno viral:

- a) Se colocaron 100 μ L de los controles (C1-C4) en los pocillos predeterminados de la microplaca, en los demás se colocaron 100 μ L de las muestras diluidas obtenidas en el paso anterior.
- b) Se colocó a incubación en cámara húmeda a 37°C por espacio de 2 horas.
- c) Al finalizar la incubación se eliminó el contenido y se lavaron los pocillos tres veces usando 300 μ L de buffer de lavado cada vez.
- d) Se adicionaron 100 μ L de conjugado HRP en cada pocillo y se incubó en cámara húmeda a 37°C por espacio de 1 hora.
- e) Se eliminó el contenido y se enjuagó nuevamente como la vez anterior.
- f) Se colocaron 100 μ L de solución sustrato en cada pocillo y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
- g) Se adicionaron 50 μ L de solución de parada en cada pocillo y se llevó la placa a lectura en el espectrofotómetro con filtro de 450 nm de absorbancia.

De acuerdo al kit, se consideraron positivas al antígeno del VDVB, las muestras que presentaron $DO > 0.400$; las DO menores fueron consideradas negativas.

3.3.7. Análisis de datos

a) La prevalencia (Pa) de hatos positivos a anticuerpos en leche se obtuvo mediante la fórmula (Thrusfield, 1990):

$$Pa = \frac{\text{n}^\circ \text{ de hatos positivos}}{\text{n}^\circ \text{ total de hatos}} \times 100$$

El intervalo de confianza al 95% se obtuvo por la fórmula (Daniel, 1996):

$$IC = p \pm Z \cdot \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$$

Donde:

p = Prevalencia.

q = Complemento de prevalencia.

Z = 1.96 Nivel de confianza 95%.

n = Número de muestras.

b) El número de animales positivos a anticuerpos en suero, durante la segunda fase, se representó mediante porcentaje:

$$\%(+) = \frac{\text{n}^\circ \text{ de muestras positivas}}{\text{n}^\circ \text{ total de muestras}} \times 100$$

El intervalo de confianza se determinó por la fórmula antes mencionada.

c) Las muestras positivas a antígeno viral se presentaron también en forma de porcentaje, hallándose además su intervalo de confianza.

$$\%(+) = \frac{\text{n}^\circ \text{ de muestras positivas}}{\text{n}^\circ \text{ total de muestras}} \times 100$$

IV. RESULTADOS

De los 204 hatos muestreados en la primera fase, 200 resultaron positivos a anticuerpos contra el VDVB, representando una prevalencia de $98.04 \pm 1.90\%$ (Cuadro 1). El Cuadro 2 muestra la distribución de los niveles de anticuerpos medidos en densidades ópticas (DO) de las muestras de leche detectadas mediante la prueba de ELISA indirecta.

De las 286 muestras de suero obtenidas de los animales del grupo en riesgo, en los 57 hatos durante la segunda fase, 135 ($47.20 \pm 5.79\%$) resultaron positivas a anticuerpos contra el VDVB y 151 (52.80%) negativas (Cuadro 3). En estas 151 muestras negativas se encontraron 4 ($2.65 \pm 2.56\%$) animales PI, correspondientes a 3 de los 57 hatos (Cuadro 4).

En la tercera fase se colectaron el total ($n = 20$) de las terneras y vaquillas (animales del grupo en riesgo) de los 3 hatos donde se detectaron los primeros PI. El ELISA de captura confirmó los 4 primeros PI hallados, encontrándose otros 2 animales PI (Cuadro 5). En estos 6 ($3.97 \pm 3.12\%$) animales PI se determinó la presencia de un caso donde madre e hija fueron PI (Apéndice 1). Adicionalmente se midieron los títulos de anticuerpos neutralizantes contra el VDVB de los 20 animales, observándose la ausencia de anticuerpos en los 6 animales PI (Apéndice 1).

Cuadro 1. Detección de hatos con anticuerpos contra el VDVB en muestras de leche de la Irrigación de Majes mediante la prueba de ELISA indirecta, 2004.

Número de hatos muestreados	Hatos positivos a anticuerpos		Hatos negativos a anticuerpos	
	Nº	%	Nº	%
204	200	98.04	4	1.96

Cuadro 2. Distribución de las DO de las muestras de leche (n=204) de la Irrigación de Majes mediante la prueba de ELISA indirecta, 2004.

Densidad óptica	Número de muestras	% del total
-0.013 – 0.300	4	1.96
0.301 – 0.600	6	2.94
0.601 – 0.900	19	9.31
0.901 – 1.200	39	19.12
1.201 – 1.500	60	29.41
1.501 – 1.800	52	25.49
1.801 – 2.100	21	10.29
2.101 – 2.350	3	1.47
TOTAL	204	100%

Cuadro 3. Detección de anticuerpos contra el VDVB, en muestras de suero de animales provenientes de 57 hatos que presentaron $DO \geq 0.900$ al examen de leche, mediante la prueba de ELISA indirecta, 2004.

Número de animales muestreados	Animales positivos a anticuerpos		Animales negativos a anticuerpos	
	Nº	%	Nº	%
286	135	47.20 ± 5.79	151	52.80 ± 5.79

Cuadro 4. Hatos positivos a anticuerpos contra el VDVB en leche con altas DO en donde se detectaron animales PI, mediante la prueba de ELISA de captura, 2004.

Hato Nº	Anticuerpos en leche de tanque (DO)	Nº de sueros colectados	Anticuerpos en suero		Antígeno en suero	
			Positivo (n=135)	Negativo (n=151)	Positivo (n=4)	Negativo (n=147)
4	1.38	5	2	3	2	1
56	1.76	5	4	1	1	0
73	0.94	5	4	1	1	0

Cuadro 5. Detección de animales PI, en el grupo de animales de 6 a 24 meses de edad (n=20) de los 3 hatos que tuvieron animales PI, mediante la prueba de ELISA de captura, 2004.

Hato N°	N° de sueros obtenidos	Positivos al antígeno del VDVB	Negativos al antígeno del VDVB
4	10	3	7
56	2	1	1
73	8	2	6
TOTAL	20	6	14

V. DISCUSIÓN

Estudios anteriores reportan que el VDVB se encuentra ampliamente difundido en las principales cuencas lecheras y valles interandinos del país (Contreras *et al.*, 2000; Chacón *et al.*, 2003; Morales *et al.*, 2003; Rivera *et al.*, 2003; Jayashi *et al.*, 2005), sin embargo, en algunas zonas ganaderas como la Irrigación de Majes en Arequipa, la prevalencia del VDVB no había sido establecida a pesar de existir reportes de que la infertilidad es uno de los principales problemas en el ganado bovino de Majes (Olivera, 2001).

El 98.04% (200/204) de los hatos muestreados presentaron evidencia de infección viral (Cuadro 1), confirmándose la amplia distribución del VDVB en la población bovina productora de leche de la Irrigación Majes. Los anticuerpos detectados indican la exposición de los animales al virus de campo, ya que la mayoría de ganaderos no utilizan la vacunación para prevenir la ocurrencia de la DVB. Al analizar los resultados de las muestras de leche se observó que la mayoría poseía altas DO, estas variaban entre 0.900 y 1.800, llegando incluso a 2.350 (Cuadro 2). Cada tanque contenía la leche de todas o de un grupo de vacas en producción del hato y al presentar altas DO significa que si no todas, al menos algunas vacas presentan altos títulos de anticuerpos que fueron detectados en la prueba. La alta prevalencia de la DVB en estos hatos así como los altos títulos detectados, evidencian la existencia de fuentes de infección en la zona. Estas fuentes serían los animales PI (Lindberg y Alenius, 1999) y los animales con infecciones agudas, en ambos casos, favorecido por la cercanía entre hatos y la ausencia de bioseguridad. Los animales con infecciones agudas se recuperan rápidamente y los

anticuerpos pueden persistir por largo tiempo descendiendo eventualmente en forma lenta (Fredriksen *et al.*, 1999).

Para la detección de los animales PI que fue el segundo objetivo del trabajo, se obtuvieron muestras de suero de animales de entre 6 a 24 meses de edad (grupo en riesgo) de 57 hatos cuyas muestras de leche presentaron DO mayores a 0.900 (decisión tomada de modo arbitrario) y en función al apoyo logístico. El 47.20% (135/286) de las muestras de suero obtenidas de animales de los 57 hatos seleccionados para la segunda fase del estudio presentaron anticuerpos contra el VDVB y el 52.80% (151/286) resultaron negativas (Cuadro 3). La diferencia en el porcentaje de positividad con respecto a lo obtenido con la leche, indica que en un hato la presencia de un solo animal seropositivo es suficiente para que la muestra de leche resulte positiva aun si el resto de animales son seronegativos (Niskanen, 1993). Además, cuando se analizaron las muestras de leche, sólo se consideraron las vacas en producción, cuyas edades por lo general son superiores a los 2 años y la probabilidad de que hubieran sufrido un desafío es mayor que en animales de menor edad.

En el 52.80% (151/286) de las muestras negativas a anticuerpos se encontraron 4 animales PI (2.65%) en 3 de los 57 hatos estudiados (Cuadro 4). Ante la posibilidad de que hubiera más animales PI en el resto de animales de los 3 hatos, se procedió al muestreo de la totalidad de los animales en riesgo detectándose otros 2 animales PI (Cuadro 5). En el estudio se encontró una relación madre - hija PI en uno de los hatos (Apéndice 1), confirmándose que una vaca PI al alcanzar la etapa reproductiva puede tener crías igualmente PI (Baker, 1987).

La búsqueda de los animales PI en las muestras que resultaron seronegativas, se hizo bajo el concepto de que los animales PI son incapaces de seroconvertir en anticuerpos por ser inmunotolerantes al VDVB presente en su organismo (Houe, 1995; Grooms, 2004) por lo que permanecen seronegativos pero eliminando virus en forma constante a través de sus secreciones. No se supo con exactitud la edad de los 4 animales PI, pero estuvieron dentro del grupo de animales en riesgo. Los animales PI usualmente mueren dentro del primer año de vida por infecciones secundarias (Houe, 1995) o son eliminadas por su pobre condición física, aunque en algunos casos pueden tener

condición normal y llegar a la etapa reproductiva y sin duda, la cría que generen tendrá igualmente la condición de PI (Duffel y Harkness, 1985). Los animales de pobre condición física constituyen un problema para el ganadero por lo que son eliminados tempranamente, en la mayoría de las veces, sin saber que fueron PI.

La detección de animales PI en solo 5.26% (3/57) de los hatos estudiados en la segunda fase podría deberse a varios factores que evitaron la detección de estos PI, tales como: su eliminación temprana del hato o muerte por infecciones secundarias, no fueron tomados al ser el muestro aleatorio, pertenecían al grupo de animales menores a 6 meses, o que no fueron detectados por la prueba utilizada. Si bien, la prueba de ELISA de captura tiene un alta sensibilidad (97%) y especificidad (98%), no garantiza la detección de todos los animales PI si durante la toma de muestra no hubiera suficiente antígeno o virus circulante (Mars y Van Maanen, 2005). Cabe la posibilidad de que hubiera más animales PI, ya que los datos, sobre la presencia de estos animales mostrados en el presente estudio, son solo referenciales y demostrativos.

Existen reportes que indican que los animales PI pueden generar anticuerpos si se exponen a virus antigénicamente diferentes a la cepa viral que dio origen al animal PI ya que la inmunotolerancia en los *Pestivirus* es específica (Bruschke *et al.*, 1998). Los animales PI detectados en este estudio no presentaron anticuerpos contra el virus (Apéndice 1) sugiriendo que no fueron re infectados con cepas diferentes o que las cepas circulantes en la zona son homólogas a la cepa de laboratorio que se utiliza en la prueba de neutralización viral. Similares resultados se han obtenido en otros animales PI (H. Rivera, comunicación personal). Algunos animales normales (no PI), presentaron títulos bajos (1:4), e incluso uno fue negativo a anticuerpos, esto significa que un animal seronegativo no es necesariamente PI, sino que quizá no se expuso al virus y por lo tanto no generó anticuerpos.

La amplia distribución del VDVB en los animales de Majes puede deberse a varios factores como la cercanía de los animales durante el pastoreo, introducción al hato de animales sin un análisis previo, falta de información de los ganaderos acerca de la enfermedad, existencia de animales PI, entre otros (Valle *et al.*, 1999). Los resultados encontrados concuerdan con los reportes que indican que la presencia de animales PI es

determinante para la diseminación y mantenimiento del VDVB en las poblaciones bovinas (Houe, 1995). Debido a este concepto, la identificación y eliminación del animal PI del hato conjuntamente con rígidas medidas de bioseguridad representa la estrategia principal en el control y erradicación de la enfermedad DVB en varios países nórdicos (Lindberg y Alenius, 1999).

Dinamarca, Finlandia y Suecia, entre otros están llevando a cabo exitosos programas gubernamentales de control de la DVB (Lindberg y Alenius, 1999). Estos programas van de la mano con métodos de diagnóstico como el ELISA en leche, por la facilidad de colección, la importancia de la información que proporciona, su menor costo, etc. Por ello su uso en los programas de control - erradicación de la DVB ha sido recomendado (Pritchard, 2001; Ståhl *et al.*, 2002; Mars y Van Maanen, 2005).

En el presente trabajo se utilizó leche de porongo como alternativa al suero sanguíneo debido a dos razones fundamentales. La primera, que existe buena correlación entre las concentraciones de anticuerpos presentes en el suero y la leche con respecto a infecciones por VDVB y otros agentes (Pritchard, 2001), al ser la IgG la principal inmunoglobulina presente en leche y calostro (Tizard, 2002). La segunda, que la obtención de muestras de leche de porongo es una alternativa de muestreo muy ventajosa ya que se hace a menor costo, evita el estrés de manejo, promueve la bioseguridad del hato al restringir el muestreo individual de los animales, etc. (Pritchard, 2001). El muestreo de leche permite también realizar la vigilancia epidemiológica de la DVB a nivel de hato. Por ejemplo los cuatro hatos que resultaron negativos a anticuerpos contra el VDVB indican que estos hatos no estuvieron expuestos al virus, información que es obtenida con rapidez y sin la necesidad de muestrear los animales individualmente.

VI. CONCLUSIONES

1. El 98.04% (200/204) de prevalencia de hatos seropositivos demuestra que el VDVB se encuentra ampliamente diseminado entre los hatos de bovinos productores de leche de la Irrigación de Majes, Arequipa.
2. El 3.97% (6/151) de animales PI, fue detectado en hatos donde los animales tuvieron altos títulos de anticuerpos contra el VDVB y se encontró un caso de madre - hija PI.
3. Adicionalmente la leche puede ser utilizada con mayor frecuencia para detección de anticuerpos contra el VDVB y otros agentes en animales en producción de leche.

VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Álvarez S.; H. Rivera; D. Pezo; R. Rosadio. 2001. Diarrea viral bovina en rumiantes de una comunidad campesina de la provincia de Canchis, Cusco. *Rev Inv Vet Perú* (Suplemento 1): 382-384.
2. Andresen, H. 2001. Lechería en la región andina: algunos aspectos de producción y salud pública. <http://capra.iespana.es/capra/datos/andes.html>. En línea: 01-09-06.
3. Baker, J. 1987. Bovine viral diarrhoea virus: A review. *JAVMA* 190: 1449-1458.
4. Baker, J. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *In: Bovine viral diarrhoea virus. Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 11 (3): 425-445.
5. Baszler, T.; J. Evermann; P. Kaylor; T. Byington; P. Dilbeck. 1995. Diagnosis of naturally occurring bovine viral diarrhoea virus infection in ruminants using monoclonal antibody-based immunohistochemistry. *Vet Pathol* 32: 609-618.
6. Bitsch, V.; L. Ronshold. 1995. Control of bovine viral diarrhoea virus infections without vaccines. *In: Bovine viral diarrhoea virus. Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 11 (3): 627-640.
7. Bolin, S. 1995. The pathogenesis of mucosal disease. *In: Bovine viral diarrhoea virus. Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 11 (3): 489-500.

8. Bolin, S.; J. Ridpath. 1992. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in calves. *Am J Vet Res* 53: 2157-2163.
9. Brownlie, J. 1991. The pathways for bovine diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch Virol (Suppl. 3)*: 79-96.
10. Brownlie, J.; D. Booth; M. Stevens; M. Collins. 1997. Expression of non-cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in oocytes and follicles of persistently infected cattle. *Vet Rec* 141: 335-337.
11. Brownlie, J.; L. Hooper; I. Thompson; M. Collins. 1998. Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV)-the bovine pestivirus. *Clin Diagn Virol* 10: 141-150.
12. Brusckhe, C.; M. Hulst; R. Moormann; P. Van Rijn; J. Van Oirschot. 1997. Glycoprotein E^{ms} of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J Virol* 71 (9): 6692-6696.
13. Brusckhe, C.; A. Haghparast; A. Hoek; V. Rutten; G. Wentink; P. Van Rijn; J. Van Oirschot. 1998. The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-homologous cytopathic BVDV. *Vet Immunol Immunopathol* 62: 37-50.
14. Collen, T.; W. Morrison. 2000. CD4⁺ T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Res* 67: 67-80.
15. Contreras, G.; K. Ståhl; C. Arana; H. Rivera. 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.
16. Corrales, J.; M. Sanjuán; C. García. 1999. Epidemiología e importancia económica de la diarrea vírica bovina. *In*: Yus E. y M. Sanjuán. eds. *Diarrea vírica bovina*. Consejo general de médicos veterinarios de España. 24: 9-24.

17. Chacón, J.; A. Benito; H. Rivera. 2003. Detección de animales portadores del virus de la diarrea viral bovina en un establo vacunado y en otro sin vacunar del valle de Lima. *Rev Acad peru cienc vet* 3 (1): 14-23.
18. Daniel, W. 1996. *Bioestadística: Base para el análisis de la ciencias de la salud*. 3^a ed. p 198-206. Ed. Limusa. México.
19. Deregt, D.; K. Loewen. 1995. Bovine viral diarrhoea virus: biotypes and disease. *Can Vet J* 36: 371-377.
20. Donis, R. 1995. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *In: Bovine viral diarrhoea virus*. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 11 (3): 393-423.
21. Dubovi, E. 1994. Impact of bovine viral diarrhoea virus on reproductive performance in cattle. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 10: 503-514.
22. Dubovi, E. 1996. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet Med* 91: 867-872.
23. Duffel, S.; J. Harkness. 1985. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet Rec* 117:240-245.
24. Endsley, J.; J. Roth; J. Ridpath; J. Neill. 2003. Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals* 31: 123-125.
25. Francki, R.; M. Fauquet; D. Knudson; F. Brown. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee on the taxonomy of virus. *Arch Virol (Suppl 2)*: 223-233.
26. Fredriksen, B.; T. Sandvick; T. Løken; S. Odegaard. 1999. Level and duration of serum antibodies in the cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec* 144: 111-114.

27. Fulton, R.; C. Purdy; A. Confer; J. Saliki; R. Loan; R. Briggs; L. Burge. 2000. Bovine viral diarrhoea viral infections in feeder calves with respiratory disease: Interactions with *Pasteurella spp.*, parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res* 64: 151-159.
28. García C.; J. Corrales; M. Sanjuán. 1999. Medidas de prevención y control frente a la diarrea viral bovina. *In: Yus E. y M. Sanjuán. eds. Diarrea vírica bovina. Consejo general de médicos veterinarios de España. 24: 67-86.*
29. Givens, M.; K. Riddell; P. Galik; D. Stringfellow; K. Brock; N. Loskutoff. 2002. Diagnostic dilemma encountered when detecting bovine viral diarrhoea virus in IVF embryo production. *Theriogenology* 58: 1399–1407.
30. Grooms, D. 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 20: 5-19.
31. Houe, H.; A. Meyling. 1991. Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Prev Vet Med* 11: 9-16.
32. Houe, H. 1995. Epidemiology of bovine virus diarrhoea. *In: Bovine viral diarrhoea virus. Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 11 (3): 521-548.
33. Houe, H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol* 64: 89-107.
34. Houe, H. 2003. Economic impact of BVDV infection in diaries. *Biologicals* 31: 137-143.
35. Jayashi, C.; C. Gavidia; M. Araínga; A. Manchego; H. Rivera. 2005. Dinámica de seroconversión en hembras bovinas post eliminación de animales portadores del virus de la diarrea viral bovina. *Rev Inv Vet Perú* 16 (1): 56-64

36. Kobrak, A.; E. Weber. 1997. Bovine diarrhoea virus: an update. *Rev Argent Microbiol* 29: 47-61.
37. Kümmerer, B.; N. Taus; P. Becher; H. Thiel; G. Meyers. 2000. The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet Microbiol* 77: 117-128.
38. Lértora, W. 2003. Diarrea viral bovina: actualización. *Rev Vet* 14 (1): 42-51.
39. Letellier, C.; P. Kerkhofs. 2003. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. *J Virol Meth* 114: 21-27.
40. Lindberg, A.; A. Alenius. 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle populations. *Vet Microbiol* 64: 197-222.
41. Mars, M.; C. Brusckhe; J. Van Oirschot. 1999. Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Vet Microbiol* 66: 197-207.
42. Mars, M.; C. Van Maanen. 2005. Diagnostic assays applied in BVDV control in the Netherlands. *Prev Vet Med* 72: 43-48.
43. Mc Gowan, M.; P. Kirkland; B. Rodwell; D. Kerr; C. Carroll. 1993. A field investigation of the effects of bovine viral diarrhoea virus around the time of insemination on the reproductive performance of cattle. *Theriogenology* 39: 443-449.
44. Ministerio de Agricultura, Perú (MINAG). 1996. Producción pecuaria e industria avícola. Presidencia de la República. Documento de consulta.
45. Moennig, V.; K. Eicken; U. Flebbe, H. Frey; B. Grummer; L. Haas; I. Greiser-Wilke; B. Liess. 2005. Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Prev Vet Med* 72: 109-114.

46. Moenning, V.; B. Liess. 1995. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *In: Bovine viral diarrhoea virus. Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 11 (3): 477-487.
47. Morales, S.; A. Benito; H. Rivera. 2003. Terneros persistentemente infectados con el virus de la diarrea viral bovina en dos hatos lecheros de la provincia de Arequipa. *Rev Acad peru cienc vet* 3 (1): 8-13.
48. Muñoz-Zanzi, C.; W. Johnson; M. Thurmond; Sh. Hietala. 2000. Pooled-sample testing as a herd screening tool for detection of bovine viral diarrhoea virus in persistently infected cattle. *J Vet Diagn Invest* 12 (3): 195-2003.
49. Murray, R. 1991. Lesions in aborted bovine fetuses and placenta associated with bovine viral diarrhoea virus infection. *Arch Virol (Suppl. 3)*: 217-224.
50. Nettleton, P.; G. Etrican. 1995. Ruminant pestiviruses. *Br Vet J* 151:615-642.
51. Niskanen, R.; S. Alenius; B. Larson; N. Juntti. 1989. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine virus diarrhoea in milk. *J Vet Med B* 36: 113-118.
52. 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.
53. Olivera, L. 2001. Sanidad del ganado lechero de la cuenca del sur. *Rev Inv Vet Perú* 12 (2): 78-86.
54. Paton, D. 1995. Pestivirus diversity. *J Comp Path* 112: 215-236.
55. Peterhans, E.; T. Jungi; M. Schweizer. 2003. BVDV and innate immunity. *Biologicals* 31: 107-111.

56. Potgieter, L. 1995. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *In: Bovine viral diarrhoea virus. Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 11 (3): 501-520.
57. Pritchard, G. 2001. Milk antibody testing in cattle. *In Pract*, October 2001: 542-549.
58. Ridpath, J. 2003. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals* 31: 127-131.
59. Rivera, H.; L. Valdivia; A. Benito. 2001. Diarrea viral bovina en bovinos lecheros de crianza semiintensiva de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. *Rev Inv Vet Perú* (Suplemento 1): 380-381.
60. Rivera, H. 1993. El virus de la diarrea viral bovina (BVD). *Rev Inv Vet Perú* 6 (1): 1-6.
61. Rivera; H.; K. Huamán; A. Benito; A. Díaz; C. Arana. 2003. Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina y animales portadores del virus en un hato lechero del valle del Mantaro. *Rev Acad peru cienc vet* 3 (1): 1-7.
62. Sandvik, T.; J. Krogsrud. 1995. Evaluation of an antigen-capture ELISA for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle blood samples. *J Vet Diagn Invest* 7: 65-71.
63. Sandvick, T. 2005. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Prev Vet Med* 72: 3-16.
64. Sanjuán, M.; C. García; J. Corrales. 1999. Etiopatogenia de la diarrea vírica bovina: aspectos de interés. *In: Yus E. y M. Sanjuán. eds. Diarrea vírica bovina. Consejo general de médicos veterinarios de España.* 24: 9-24.
65. Solís-Calderón, J.; V. Segura-Correa; J. Segura-Correa. 2005. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors. *Prev Vet Med* 72: 253-262.

66. Ståhl, K.; C. Björkman; U. Emanuelson, H. Rivera; A. Zelada; J. Moreno-López. 2006. A prospective study of *Neospora caninum* and BVDV infections on bovine abortions in a dairy herd in Arequipa, Peru. *Prev Vet Med.* 75: 177-188.
67. Ståhl, K.; H. Rivera; J. Vågsholm; J. Moreno-López. 2002. Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. *Prev Vet Med* 56: 193-202.
68. Thrusfield, M. 1990. *Epidemiología veterinaria.* p 228-230. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
69. Tizard. I. 2002. *Inmunología veterinaria.* 6ª ed. p 517. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México.
70. Tremblay, R. 1996. Transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Med* 9: 858-866.
71. Valle, P.; S. Martin; R. Tremblay; K. Bateman. 1999. Factors associated with being a bovine-virus diarrhoea (BVD) seropositive dairy herd in the More and Romsdal County of Norway. *Prev Vet Med* 40: 165-177.
72. Van Oirschot, J.; C. Brusckhe; P. Van Rijn. 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol* 64: 169-183.
73. Vanroose, G.; A De Kruif; A. Van Soom. 2000. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Anim Reprod Sci* 60-61: 131-143.
74. Vanroose, G.; H. Nauwynck; A. Van Soom; E. Vanopdenbosch; A. De Kruif. 1998. Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in zona-free and zona-intact in vitro-produced bovine embryos and the effect on embryo quality. *Biol Repro* 58: 857-866.

75. Vilček, Š.; B. Ďurkovič; M. Kolesarova; D. Paton. 2005. Genetic diversity of BVDV: Consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev Vet Med* 72: 31-35.

76. Vilček, Š.; D. Paton; B. Ďurkovič; L. Strojny; G. Ibata; A. Moussa; A. Loitsch; W. Rossmann; S. Vega; M. Scicluna; V. Palfi. 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol* 146: 99-115.

77. Walz P.; B. Stefcik; J. Baker. 1999. Effect of experimentally induced type 2 bovine viral diarrhoea virus infection on platelet function in calves. *Am J Vet Res* 60: 1396-1401.

IX. APÉNDICE

Apéndice 1. Determinación del virus de la DVB y título de anticuerpos mediante la prueba de ELISA de captura y neutralización viral respectivamente en el total de animales del grupo riesgo de los tres hatos con presencia de PI, 2004.

Identificación del animal	Hato N°	Presencia de antígeno del VDV B	Presencia de anticuerpos contra el VDV B
África	4	Negativo	1 : 32
Cayma		Negativo	1 : 16
Cuba		Negativo	1 : 64
Holanda		Negativo	1 : 32
Laura*		Positivo	< 1 : 2
Laura 43*		Positivo	< 1 : 2
Malta		Negativo	1 : 8
Milán		Negativo	1 : 128
Ottawa		Positivo	< 1 : 2
Sama		Negativo	1 : 4
Pocha		56	Negativo
Pochita	Positivo		< 1 : 2
Alicia	73	Positivo	< 1 : 2
Carola		Negativo	1 : 32
Cecilia		Negativo	1 : 4
Chiquivieja		Positivo	< 1 : 2
Elsa		Negativo	< 1 : 2
Gringa		Negativo	1 : 16
Negra		Negativo	1 : 4
Yaqui		Negativo	1 : 4

*Madre e hija.