

ARTÍCULO DE REVISIÓN

**EVOLUCIÓN DEL CONOCIMIENTO SOBRE LA ENFERMEDAD DE LA
DIARREA VIRAL BOVINA Y SU AGENTE ETIOLÓGICO**

**EVOLUTION OF THE UNDERSTANDING OF BOVINE VIRAL DIARRHEA AND ITS
ETIOLOGICAL AGENT**

Hermelinda Rivera G.^{1,2}

RESUMEN

La diarrea viral bovina (DVB), enfermedad enzoótica en la población bovina mundial, tiene importancia económica por las fallas reproductivas y por afectar la salud del hato en general. Las pérdidas económicas que ocasiona fueron observadas desde sus inicios cuando emergió como una enfermedad aguda. La importancia económica para la industria lechera y la biología del agente causal, el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), motivaron una intensa investigación sobre la epidemiología, fisiopatología y biología del virus que ha permitido el planteamiento de un nuevo concepto de control de esta enfermedad. El objetivo de esta revisión es proveer a la comunidad veterinaria de un resumen de los conocimientos sobre los eventos cronológicos más importantes del VDVB y de la enfermedad de la DVB desde su emergencia en la década del 40 hasta la actualidad. Además, se describen los aspectos más relevantes sobre la estructura genómica del virus, que está permitiendo conocer su gran variabilidad genética y su impacto en la elaboración de biológicos para el diagnóstico y control de la enfermedad.

Palabras clave: revisión, virus de la diarrea viral bovina, epidemiología, bovinos, Perú

ABSTRACT

The bovine viral diarrhoea (BVD), an enzootic disease in the world cattle population, has a tremendous economic impact due to its effect on reproductive failure and health of cows. The economic losses observed since its emergence in the '40s and the interesting biology of this virus had prompt an intensive research on the epidemiology, physiopathology and molecular biology of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) that have contributed to the evolution of the concept of control of the disease. The purpose of this review is to summarize the most important chronologic events of the BVD and the BVDV. It also describes how the actual knowledge of the structure of the virus genome is contributing to the development of biologic products and current diagnostic tests for controlling the disease.

Key words: review, bovine viral diarrhoea virus, epidemiology, bovine, Peru

¹ *Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima*

² *E-mail: hriverag2005@yahoo.es*

Introducción

La eficiencia reproductiva es un factor muy importante para la industria lechera y el virus de la diarrea viral bovina es uno de los patógenos que la afecta seriamente ocasionando importantes pérdidas económicas (Baker 1995; Houe 1999, 2003; Muñoz-Zanzi *et al.*, 2004). La enfermedad asociada a pérdidas económicas y la biología del virus de la diarrea viral bovina, sobre todo, relacionado a su variabilidad genética y su mecanismo de persistencia en la naturaleza, han motivado la realización de numerosas investigaciones sobre los diferentes aspectos de la enfermedad, pero sobre todo, del agente viral. Esta revisión pretende resumir algunos de estos hallazgos y ponerlos al alcance de los médicos veterinarios de campo, ganaderos y estudiantes.

Enfermedad

En 1940 fue descrita en Saskatchewan, Canadá, una enfermedad en bovinos caracterizada por una severa diarrea, depresión, anorexia, leucopenia y ulceración de las mucosas de la cavidad bucal que fue llamada «enfermedad X» por la dificultad en la identificación del agente causal y fallas en el intento de reproducirla experimentalmente (Childs, 1946). Un síndrome de similares características clínicas e histopatológicas fue descrita posteriormente en New York, EEUU (Olafson *et al.*, 1946) y se le denominó diarrea viral bovina (DVB).

En 1950 se presentaron casos más severos en Iowa, EEUU, caracterizados por descarga nasal mucopurulenta, hemorragias y erosiones en el tracto intestinal con mínima infiltración de células inflamatorias; sin embargo, los animales inoculados con sangre y machacados de tejidos de animales solo presentaban fiebre ligera y fue denominada enfermedad de las mucosas (EM) (Ramsey y Chivers, 1953).

Aislamiento del Virus de la DVB

El virus de la DVB (VDBV) fue aislado en 1957 en cultivos celulares de un caso de EM. El virus aislado, una cepa citopática (cp), producía cambios morfológicos en los cultivos celulares. Los intentos de reproducir experimentalmente la EM con el virus aislado fueron infructuosos (Underdahl *et al.*, 1957). Casi al mismo tiempo, se aisló un virus que no inducía cambios morfológicos en los cultivos celulares de casos crónicos de EM (una cepa no citopática [ncp]), sin que se llegara a relacionar las cepas de virus cp y ncp (Lee y Gillespie, 1957). En la actualidad, los fenotipos cp y ncp de las cepas se les reconoce como biotipos y se refiere únicamente a la presencia o ausencia de cambios morfológicos que inducen en cultivos celulares (Baker, 1995).

Gilliespie *et al.* (1960) aislaron en cultivos celulares una cepa cp de un bovino con DVB en Oregon. Este virus fue denominado Oregon C24V, presente hasta hoy como una de las cepas de referencia descrita ampliamente en la literatura (Flores *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2001); la misma que luego del pasaje 32 en cultivos celulares fue incapaz de inducir signos clínicos en un animal inoculado pero mantenía la capacidad de inducir anticuerpos contra el virus. Con esta cepa atenuada, a virus vivo, se fabricó la primera vacuna comercial contra la DVB (Coggins *et al.*, 1961) que fue utilizada ampliamente para el control de la enfermedad; sin embargo, surgieron efectos post vacunales como fallas reproductivas, defectos congénitos y hasta casos de EM (McKercher *et al.*, 1968; Bolin, 1995).

Patogénesis de la DVB y de la EM

Al inicio de la década del 60 se llegó a la conclusión que la DVB era una enfermedad mayormente enzoótica de elevada morbilidad y baja mortalidad en animales jóvenes y adultos, y por el contrario, la EM afectaba animales jóvenes, con baja

morbilidad pero con una mortalidad del 100%. Posteriores estudios experimentales en vacas preñadas resultaron en abortos, malformaciones congénitas, terneros congénitamente infectados y que usualmente morían en los primeros meses de vida, así como observaciones de algunos animales con presentación crónica de la EM, que no presentaban anticuerpos específicos contra el virus de la DVB (Thomson y Savan, 1963; Malmquist, 1968).

Vacas seropositivas y seronegativas que fueron experimentalmente inoculadas entre los 42 y 125 días de gestación parieron terneros clínicamente normales pero con infección persistente (PI) y negativos a anticuerpos contra el VDVB. Estos terneros, sin embargo, fueron capaces de desarrollar anticuerpos contra otros agentes virales, determinándose que el feto desarrollaba una tolerancia específica al VDVB si la infección ocurría antes de los 125 días del desarrollo fetal. Los estudios experimentales también demostraron la gran capacidad de ambos biotipos del VDVB de atravesar la placenta y ocasionar la pérdida fetal, pero solo la cepa ncp fue asociada con la inducción de la inmunotolerancia (McClurkin, *et al.*, 1984; Brownlie *et al.*, 1989). Además, se evidenció que los anticuerpos presentes en la madre no garantizaban la protección fetal ya que vacas seropositivas también parieron terneros PI.

Si bien la EM fue descrita en 1953 (Ramsey y Chivers, 1953), no fue hasta 1984 en que los investigadores lograron reproducirla experimentalmente mediante la inoculación de una cepa cp en un bovino PI (Brownlie *et al.*, 1984; Roeder y Drew, 1984; Bolin *et al.*, 1985). Con aislamiento simultáneos de los biotipos cp y ncp de tejidos de bovinos naturalmente infectados y muertos por EM, se pudo validar el concepto de que la EM es producto de una superinfección con una cepa de biotipo cp antigénicamente similar al biotipo ncp presente en el animal PI (McClurkin *et al.*, 1984).

Clasificación Viral

La manipulación del VDVB en el laboratorio permitió establecer la relación morfológica y antigénica con el virus de la peste porcina clásica (VPPC), endémico en USA (Darbyshire, 1960), por lo que el término de Pestivirus fue acuñado por Horzinek (1973) para agrupar inicialmente al VDVB y VPPC, y después al agente aislado del ovino conocido como virus de la Enfermedad de la Frontera (VEF) (Plant *et al.*, 1973; Purchio *et al.*, 1984; Collet *et al.*, 1989). Los avances en el conocimiento de la estructura molecular y el producto de los genes de los pestivirus fueron algunos criterios para su posterior clasificación como género de la Familia Togaviridae (Terpstra, 1985; Westaway *et al.*, 1985; Donis y Dubovi, 1987; Moormann y Hulst, 1988); pero estudios moleculares posteriores, centrados en la organización y secuenciamiento genómico, producción génica y estrategia de replicación, permitió reclasificar a los pestivirus dentro de la nueva Familia Flaviviridae con sus géneros: flavivirus, pestivirus y hepacivirus (virus de la hepatitis C) (Collett *et al.*, 1988; Mayo y Pringle, 1997).

Organización del Genoma Pestiviral

El VDVB y demás pestivirus están constituidos por una molécula de ARN de polaridad positiva de 12.5 kb de longitud. El virus posee un solo marco de lectura abierta (ORF), presentando en ambos extremos 5' y 3' regiones no traducidas (UTR). La región UTR del extremo 5' es importante para la iniciación de la traducción del ORF; es una región altamente conservada y contiene el Sitio de Entrada Interno al Ribosoma (IRES) que promueve la iniciación de la traducción de la poliproteína viral, de manera similar al virus de la hepatitis C (Myers *et al.*, 2001). El IRES es un complejo de elementos utilizado por la célula eucariota, como un mecanismo alternativo para el inicio de la traducción de proteínas reclutando la maquinaria de traducción celular al codón de ini-

ciación (AUG) en el ARNm como respuesta a un agudo estrés celular (Oh *et al.*, 1992; Martínez-Salas *et al.*, 2001).

Al parecer, el virus ha evolucionado para utilizar la maquinaria sintética de la célula en la cual se replica, desarrollando diversas y eficientes maneras de competir con la célula infectada por los substratos. La presencia de los IRES en el genoma fue reconocido inicialmente en los virus de la familia Picornaviridae (Jang *et al.*, 1988; Pelletier y Sonenberg, 1988) y desde entonces, los IRES están siendo reconocidos en muchos virus ARN de cadena simple de polaridad positiva como son los del género pestivirus (VDVB, VPPC, VEF), hepacivirus (virus de la hepatitis C) (Myers *et al.*, 2001) e incluso en virus ADN como los virus herpes (Bielecki y Talbot, 2001).

El ORF del ARNm pestiviral codifica una poliproteína de 450 kDa (aproximadamente de 4000 aminoácidos) que está sujeta a 11 ó 12 cortaduras proteolíticas durante co y post traducción para producir las proteínas del virus en el orden que sigue: NH₂-N^{Pro} (proteína no estructural con actividad de proteasa), proteínas estructurales C (cápside), E^{ms} (proteína con actividad ribonucleasa), E1 y E2 (glicoproteínas asociadas a la envoltura viral) y las no estructurales p7, NS2-NS3, NS4, NS4B, NS5A, NS5B-COOH (Akkina, 1991; Brock *et al.*, 1992; Donis, 1995; Meyers y Thiel, 1996).

El análisis molecular de los dos biotipos del VDVB indican que las cepas cp son productos de mutaciones de las cepas ncp por procesos recombinantes que resultan de inserciones de ARNm celulares entre ellas, secuencias celulares que codifican la proteína ubiquitina, duplicaciones de secuencias virales que codifican la proteína N^{Pro}, o por rearrreglos o supresiones de secuencias del genoma viral que pueden generar partículas defectivas (Meyers y Thiel, 1996; Tautz *et al.*, 1998; Kummerer *et al.*, 2000). El fenotipo cp está asociado con la expresión de la proteína no estructural NS3 (p80) que se encuen-

tra en abundancia en el sobrenadante del cultivo de cepas cp pero está ausente en las cepas ncp, existiendo en estas últimas solo la proteína NS2-3 (p125). La aparición del biotipo cp por algunos de estos mecanismos dentro de un animal PI, trae consigo la ocurrencia de la EM de carácter fatal, el animal afectado no desarrolla anticuerpos contra la nueva cepa porque las proteínas E1 y E2 que inducen los anticuerpos neutralizantes no son afectados, por tanto el sistema inmunitario del animal no reconoce a la nueva cepa viral.

Variación Antigénica y Molecular

Paneles de anticuerpos monoclonales (mAbs) utilizados en los diferentes pestivirus aislados de bovinos, porcinos y ovinos, así como el grado de reacción cruzada en la prueba de neutralización viral, secuenciamiento y comparación genómica de la región 5' UTR demuestran un 76% de similitud entre los aislados, indicando especies diferentes, por lo que estos virus se agrupan en cuatro grupos o especies: VDVB, VPPC, VEF y los pestivirus atípicos, constituidos por cepas que reaccionan pobremente con los mAbs del VDVB y VPPC (Itoh *et al.*, 1984; Shimizu *et al.*, 1989; Meyers *et al.*, 1989; Moening, 1990; Ridpath y Bolin, 1991; Paton *et al.*, 1995).

Posteriormente, Ridpath *et al.* (1994) comparando las secuencias de las regiones 5' UTR del genoma de más de 140 aislados del VDVB, consideraron agruparlas en genotipos 1 y 2, donde ambos están conformados por cepas del VDVB ncp y cp. El genotipo 1, corresponde al que fue reconocido por décadas, y está constituido por cepas de VDVB de referencia, utilizadas en preparación de vacunas, como antígeno en pruebas diagnósticas e investigación. El genotipo 2 corresponde al VDVB que fue identificado a fines de la década del 80 en EEUU y Canadá asociado a un síndrome hemorrágico agudo y hasta fatal, pero también por cepas aisladas de animales PI nacidos de madres vacunadas contra el VDVB y cepas aisladas de sueros fetales (Pellerin *et al.*, 1994;

Ridpath *et al.*, 1994). Cepas del genotipo 2 han sido reconocidas esporádicamente en algunos países europeos (Wolfmeyer *et al.*, 1997; Nagai *et al.*, 1998; Letellier *et al.*, 1999; Falcone *et al.*, 2001) y en países de América Latina como Brasil, Argentina y Chile (Canal *et al.*, 1998; Flores *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2001). Recientemente, estudios preliminares de secuenciamiento genético en pocas cepas del VDVB aisladas en Perú resultaron pertenecer al genotipo 1 (Ståhl *et al.*, 2006).

Estudios de relación filogenética han determinado que la homología entre las cepas del VDVB del mismo genotipo es más del 93%, mientras que entre el genotipo 1 y 2 es solo de 74%, indicando que son antigénica y molecularmente diferentes (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994). Los genotipos 1 y 2 fueron posteriormente agrupados en subgenotipos 1a y 1b, y 2a y 2b (Ridpath y Bolin, 1998; Ridpath *et al.*, 2000); sin embargo, resultados de otros estudios señalan que habría al menos 11 subgenotipos del VDVB (Vilcek *et al.*, 2001). El alto grado de mutación del genoma pestiviral y la disponibilidad de animales susceptibles en el mundo, resulta, sin duda, en una alta tasa de evolución genética que es expresada en una amplia variabilidad antigénica que permite al virus escapar de la respuesta inmunitaria, resultando, por un lado, en una incompleta protección del animal y, por otro lado, en capacidad del virus para sobrevivir en la naturaleza (Fulton *et al.*, 2005; Ridpath, 2005).

Fisiopatología de la DVB

La infección en un animal inmunocompetente resulta en una sólida respuesta inmunitaria y protección fetal en futuras gestaciones (Moerman *et al.*, 1993; Fredriksen *et al.*, 1999); sin embargo, el grado de protección fetal contra cepas distintas al virus desafiante puede depender del genotipo. Se ha observado que en ovejas, los anticuerpos contra el genotipo 1 inducen buena protección cruzada, mientras que la infección con el genotipo 2 no tiene un amplio es-

pectro de protección (Paton *et al.*, 1999). La fisiopatología de la DVB, especialmente en lo concernientes a las fallas reproductivas, se describe brevemente:

a) En animales no gestantes y susceptibles

Se estima que el 70-90% de los animales seronegativos, inmunocompetentes y no gestantes pueden desarrollar una infección subclínica o ligera denominada infección aguda leve, ya que en el examen clínico y análisis de laboratorio puede detectarse una ligera depresión y fiebre, leucopenia transitoria y viremia durante la primera semana post infección, pudiendo persistir la viremia por más de 15 días (Houe, 1995). Sin embargo, dependiendo del genotipo y grado de virulencia de la cepa puede ocasionar una enfermedad aguda, severa, e incluso mortal (Pellerin *et al.*, 1994; Hamers *et al.*, 1999). Ciertas cepas del genotipo 2 pueden causar leucopenia y trombocitopenia, fiebre, inapetencia y lesiones en las mucosas, muchas veces asociado a problemas respiratorios y digestivos debido a infecciones secundarias (Potgieter, 1997; Brusckhe *et al.*, 1997; Ridpath *et al.*, 2000). El primer tejido de replicación viral son las células epiteliales de la mucosa oronasal, así como monocitos, macrófagos y células dendríticas que constituyen la primera línea de defensa innata ocasionando úlceras discretas en las mucosas y la subsiguiente salivación o secreción ocular-nasal (Baker, 1995).

La distribución sistémica del virus es vía sanguínea, en forma libre o asociada a linfocitos y monocitos/macrófagos, multiplicándose en diversas células pero principalmente en las del sistema fagocito-mononuclear (Confer *et al.*, 2005). La infección de linfocitos *in vivo* e *in vitro* con el VDVB ocasiona disminución de la población de linfocitos B y T y de la actividad blastogénesis en respuesta a fitohemaglutinina, concavalin A y pokeweed (*Phytolacea americana*) (Brown *et al.*, 1991), pero ambas alteraciones suelen ser transitorias (Brownlie, 1991).

Se ha observado que el VDVB modula el nivel de metabolitos del ácido araquidónico como el Leucotrieno B4 (LTB4) y la Prostaglandina E2 (PGE₂), pues en los macrófagos alveolares infectados induce una disminución de la síntesis de LTB4 ocasionando una alteración en la respuesta inmunitaria en el lecho pulmonar, caracterizado por una pobre proliferación de linfocitos y de la actividad quimiotáctica de los neutrófilos (Atluru *et al.*, 1992), e incremento del nivel de PGE₂, induciendo inmunosupresión de las células presentadoras de antígeno (Peterhans *et al.*, 2003). Esta inmunosupresión, aunque pasajera, es el sustento para explicar la patogénesis de infecciones mixtas secundarias neumotrópicas o digestivas de origen viral o bacteriano, sobre todo en animales jóvenes, que frecuentemente son concomitantes a la infección por el VDVB (Potgieter, 1988, 1997; Baker, 1995).

La infección aguda en toros adultos puede afectar transitoriamente la calidad del semen (Kirkland *et al.*, 1997). También hay evidencias de que el virus puede replicarse en el tejido testicular por más de 6 meses aunque el aislamiento viral del semen no siempre es exitoso (Givens *et al.*, 2002). En la actualidad, existe un solo caso reportado donde el virus era eliminado constantemente en semen de un toro que tenía anticuerpos contra el VDVB (Voges *et al.*, 1998), por lo que el diagnóstico de DVB en un toro reproductor debe ser mediante la búsqueda del virus en suero o semen y no debe basarse solamente en la detección de anticuerpos.

b) *En bovinos gestantes*

Estudios experimentales han demostrado que el VDVB atraviesa fácilmente el tejido placentario (Baker, 1995); sin embargo, el efecto de la infección en la vaca gestante depende del biotipo viral y de la edad fetal. El virus puede desencadenar fallas en la implantación, muerte y reabsorción embrionaria, momificación, aborto, malformación congénita, nacido muerto, nacido débil y PI, hasta la ocurrencia de terneros normales pero con

anticuerpos contra el virus, evidenciando infección pre-natal (McGowan y Kirkland, 1995; Grooms, 2004).

La infección del útero y del feto, al parecer, está restringida a animales PI o vacas seronegativas infectadas en forma aguda durante los dos primeros trimestres de gestación. La vaca seronegativa, aunque pierde al feto, desarrolla una sólida y duradera respuesta inmunitaria, evitando el acceso del virus al feto en posteriores campañas reproductivas (Brownlie *et al.*, 1998).

La infección natural y experimental con el VDVB alrededor del servicio con monta natural o inseminación artificial, disminuye la tasa de concepción, y las vacas que no preñan retornan en celo a los 20-21 días del servicio infértil (Virakul *et al.*, 1988). Así mismo, las vacas que pierden el embrión o feto, retornan en celo en tiempo variable, pero, generalmente, 30 días después del servicio (McGowan *et al.*, 1993). La presencia de niveles elevados del VDVB en el fluido folicular del ovario y oviducto evidencia el tropismo del virus por estos tejidos y sus efectos en el proceso reproductivo, sobre todo, en la tasa de concepción/gestación (McGowan *et al.*, 1993; Booth *et al.*, 1995; Brownlie *et al.*, 1997).

La pérdida temprana del embrión puede ser consecuencia de una disfunción ovárica, inflamación uterina y daño directo (Ssentongo *et al.*, 1980; Brock y Stringfellow, 1993). Aunque los mecanismos de disfunción ovárica inducido por el VDVB no están completamente esclarecidos, posiblemente debido a la compleja fisiología ovárica, en una ooforitis crónica se ha detectado antígeno y ARN del VDVB en las diferentes capas celulares del ovario y del folículo en desarrollo (Fray *et al.*, 1998; Grooms *et al.*, 1998). La presencia del virus en el tejido ovárico sugiere una posible desregulación citocínica a nivel tisular que conlleva a una disfunción ovárica (Adashi, 1990; Fray *et al.*, 1999; Jasper *et al.*, 2000; Ruijin *et al.*, 2004).

Los diversos estudios *in vitro* realizados para esclarecer los efectos del virus sobre el ovocito y el óvulo fecundado han demostrado que la zona pelúcida intacta protege al óvulo del efecto viral. La remoción de la zona pelúcida disminuye la viabilidad del ovocito al contacto con el VDVB cp, pero este efecto no es evidente o es más retardado con el VDVB ncp (Potter *et al.*, 1984; Bielanski y Hare, 1988; Brock y Stringfellow, 1993).

Luego de la implantación del embrión, la infección transplacentar del feto puede ocurrir en cualquier momento y por cualquiera de los biotipos. El resultado de la infección dependerá del tiempo de desarrollo fetal, de la inmunocompetencia fetal, del biotipo infectante y de su grado de virulencia. La infección fetal durante el primer y segundo trimestre de su desarrollo en hatos de bovinos susceptibles conlleva a más del 30% de aborto o momificación fetal, pero en hatos con infección endémica, inclusive con vacunación, la tasa de aborto puede ser alrededor del 7% (Roeder *et al.*, 1986; Brownlie *et al.*, 1989; Rufenacht *et al.*, 2001).

Ambos biotipos (cp y ncp) pueden ocasionar la pérdida fetal, pero se sabe que solamente el biotipo ncp es capaz de ocasionar infección persistente en el feto cuando el sistema inmunitario fetal no es suficientemente inmunocompetente para reconocer al virus, causando inmunotolerancia que involucra a las células B y T y persistencia viral (Brownlie *et al.*, 1989). Si bien la inmunotolerancia al VDVB ocurre en ausencia de la respuesta inmunitaria adquirida, el VDVB también tiene la habilidad de evadir la respuesta inmunitaria innata. Al parecer, la llave central de este mecanismo es la capacidad del VDVB ncp para evitar la inducción del interferón 1 (IFN- α/β) que es de vital importancia para desencadenar la respuesta inmunitaria adaptativa. Estudios recientes indican que la proteína no estructural N^{pro} (con actividad de proteasa) del virus es la responsable de este complejo mecanismo (Hilton *et al.*, 2006; Bauhofer *et al.*, 2007).

La infección en el periodo de 100 a 150 días de gestación puede resultar en defectos congénitos, pues este periodo corresponde a los estadios finales de organogénesis del sistema nervioso central y desarrollo del sistema inmunitario fetal, pudiendo afectar el crecimiento y diferenciación celular o causar lisis celular. Los terneros pueden nacer con una variedad de síntomas y signos clínicos y hasta de apariencia normal; pero si las lesiones son muy severas, el feto muere y es expulsado (Baker, 1995). Infección fetal posterior a los 125-150 días de gestación puede también ocasionar el aborto o terneros débiles al nacer; pero a partir de esta edad, el feto es inmunológicamente capaz de controlar y eliminar la infección viral, y en estos casos, los terneros nacen con anticuerpos contra el VDVB (McGowan y Kirkland, 1995).

Distribución de la Diarrea Viral Bovina

La DVB es una de las enfermedades de mayor distribución en la población bovina y su prevalencia depende del tipo de ganado, densidad poblacional, tipo de manejo, comercio de animales, manejo de las pasturas, etc. Houe (1995, 1999) considera una prevalencia mundial de DVB de 60-85% y de 1-2% de animales PI; por otro lado, en los países escandinavos se determinó que la prevalencia viral estuvo asociada a la densidad de la población de bovinos y el tamaño del hato (Alenius *et al.*, 1986; Houe y Meyling, 1991; Loken *et al.*, 1991). El rol de los animales PI en la magnitud de la prevalencia viral es muy importante, ya que un PI puede infectar a más del 90% de los animales del hato antes de los 3-4 meses de edad en un sistema de crianza estabulada (Houe *et al.*, 1995), y usualmente un PI es identificado y eliminado entre los 4 a 6 meses de edad.

La DVB fue introducida al Perú en la década del 60 con la importación de vaquillas de un país donde la enfermedad es endémica (Rivera, 1993). Estudios epidemiológicos posteriores demostraron que la DVB se encuentra difundida en la población bovina del país. Así, se encontró una prevalencia de 95% en

hatos lecheros pequeños (5-10 animales) de la irrigación de Majes, Arequipa (Huamán *et al.*, 2007), de 85 y 48% en bovinos criollos de las provincias de Parinacochas (Ayacucho) y Melgar (Puno), respectivamente (Rivera *et al.*, 2001, Quispe *et al.*, en prensa), y de 96 y 35% en los valles de Huancayo y Lima, respectivamente (Ståhl *et al.*, 2002; Aguilar *et al.*, 2006). En las últimas décadas el VDVB ha sido un agente causal substancial de abortos (Rivera, 2001) y se le considera un importante componente del complejo respiratorio bovino (Rivera *et al.*, 1994; Zanabria *et al.*, 2000). La DVB no es restrictiva para el tránsito interno de los animales lo cual explica su amplia difusión en el país, no solo en la población bovina, sino también en otras especies como los camélidos sudamericanos (Alvarez *et al.*, 2002, Victorio *et al.*, 2004).

En países como Brasil, Argentina, Colombia y Chile se reportan prevalencias con variaciones entre regiones, pero con tasas superiores al 70% (Rweyemamu *et al.*, 1990; Wageck *et al.*, 1998; Lértora, 2003).

La DVB en Alpacas y Otras Especies

Una de las características de los pestivirus es su habilidad de cruzar la barrera de la especie. El VDVB ha sido detectado serológicamente y por aislamiento viral en otros ungulados domésticos y silvestres como ovinos, porcinos, alpacas, llamas, alces, ciervos, venados y jirafas. Es probable que los animales silvestres, en la mayoría de los casos, adquieran la infección de los animales domésticos. Al parecer, la seroprevalencia en animales silvestres es baja, indicando que son susceptibles, pero no constituyen una fuente de virus para rumiantes domésticos (Nielsen *et al.*, 2000).

La seroprevalencia en alpacas de crianza mixta y en hatos criados con tecnología adecuada en el sur del Perú se encuentra entre 11 y 20% (Rivera *et al.*, 1987; Manchego *et al.*, 1998; Alvarez *et al.*, 2002;

Cabello *et al.*, 2006), mientras que no hubo evidencia de infección por el VDVB en hatos con tecnología moderna (Risco *et al.*, 1998), sugiriendo que el bovino es la principal fuente de contagio para ellos. A la fecha, no se ha detectado animales PI en el país (Rivera H., comunicación personal), ni se ha establecido una evidente asociación con problemas reproductivos, respiratorios o gastroentéricos, mientras que en países como Chile, EEU y Canadá, no solo se reportan animales seropositivos, sino también signos clínicos de DVB y hasta animales PI (Belknap *et al.*, 2000; Goyal *et al.*, 2002; Carman *et al.*, 2005; Celedón *et al.*, 2006).

La presencia de anticuerpos en los camélidos indica que son susceptibles a la infección por el VDVB. La ausencia clínica de la DVB en alpacas y llamas del Perú, podría deberse a la presencia de cepas de baja virulencia circulando entre la población de rumiantes domésticos en las zonas altonadinas; pues en crianzas mixtas, se ha observado prevalencias superiores al 70% en bovinos y no más del 20% en alpacas del mismo rebaño (Manchego *et al.*, 1998; Alvarez *et al.*, 2002). Si una alpaca se infecta con el VDVB durante el primer tercio de la gestación, el virus podría infectar al feto y nacer un animal PI, pero las posibilidades de supervivencia podrían ser mínimas por las pobres condiciones de manejo, siendo esa una de las razones de la no detección de animales PI en el sur del país. Por otro lado, en países con alta densidad de población bovina y con un sistema de manejo diferente al del Perú y donde el VDVB de diverso grado de virulencia es endémico, el desafío para las alpacas sería muy grande, desarrollando la enfermedad y ocurriendo el nacimiento de alpacas PI, como está ocurriendo en EEUU y Canadá. Los resultados de la caracterización molecular de esas cepas del VDVB aisladas de alpacas enfermas o PI indican que son de origen bovino (Carman *et al.*, 2005, Celedón *et al.*, 2006).

Aspectos Inmunitarios

El VDVB es un patógeno con capacidad de supervivencia en la población bovina utilizando dos estrategias, una de ellas conocida como «choque y fuga» donde el virus ocasiona infecciones agudas, pero con respuesta inmunitaria humoral y celular, aunque de un modo lento, induciendo protección contra nuevas reinfecciones; y la otra estrategia es a través de las infecciones persistentes donde el virus establece inmunotolerancia específica (Peterhans *et al.*, 2003). Además, el virus tiene amplia variabilidad genética, pero de todas las cepas agrupadas en los biotipos cp y ncp, solo el ncp puede establecer infección persistente (PI) a través de la infección en estadios tempranos del desarrollo fetal, con el fin de persistir evadiendo la respuesta inmunitaria específica (Peterhans *et al.*, 2003).

Estudios sobre la inmunidad innata han progresado rápidamente en la última década, ya que la calidad y magnitud de la respuesta adaptativa es dependiente de las señales recibidas de la respuesta innata frente a un patógeno (Brackenbury *et al.*, 2003; Uematsu y Akira, 2007). De todas las células presentadoras de antígeno, las células dendríticas (CDs) son las más eficientes en la generación de la respuesta innata en animales susceptibles (Banchereau *et al.*, 2000).

Se ha demostrado *in vitro* que los monocitos y CDs son susceptibles a ambos biotipos del VDVB; sin embargo, los monocitos infectados con virus ncp tuvieron una disminuida habilidad para estimular la respuesta de subpoblaciones linfocitos T CD4 alogénicos y de memoria, pero las CDs no fueron afectadas. Las CDs fueron resistentes a la lisis por el virus cp, y mantuvo su capacidad de presentar antígeno pero los monocitos fueron destruidos. La habilidad de las CDs para resistir el efecto citopático por el virus cp no estuvo relacionada a la presencia de interferones tipo 1 (IFN- α/β) ya que en ambos tipos de células infectadas se de-

tectaron dichas citocinas, indicando que la resistencia de las CDs puede ser debido a factores asociados al tipo de virus ya que estas células son susceptibles a otros virus citopáticos como el sarampión o parainfluenza (Glew *et al.*, 2003).

La infección post natal de un animal inmunocompetente con el VDVB ncp resulta en una infección aguda pero leve. La infección activa la respuesta inmunitaria, detectándose niveles de interferones IFN- α/β en el suero, viremia pasajera, presencia de virus en las secreciones y leucopenia, desapareciendo entre 12 a 14 días post infección (Charleston *et al.*, 2001, 2002). En forma experimental así como en infecciones de campo, se ha observado, además, un incremento en la susceptibilidad a infecciones por otros patógenos evidenciando una inmunosupresión (Potgieter, 1995). El VDVB y, en general, todos los pestivirus, muestran especial tropismo por las células del sistema inmunitario ocasionando una disminución en la blastogénesis de los linfocitos B y T, hasta que entre la 6^a a 8^a semana post infección se observa un incremento de linfocitos T CD4⁺ indicando que la inmunosupresión es pasajera (Brackenbury *et al.*, 2003). Los anticuerpos neutralizantes son detectados dentro de 1-3 semanas post infección alcanzando la meseta entre 10-12 semanas pudiendo persistir por largo tiempo, incluso por toda la vida del animal (Duffell y Harkness, 1985; Fredriksen *et al.*, 1999).

Uno de los mecanismos de persistencia del VDVB ncp es su capacidad de interferir con la inducción del Interferón 1 (IFN- α/β) en la etapa fetal (Charleston *et al.*, 2001; Bauhofer *et al.*, 2007; Seago *et al.*, 2007); sin embargo, es capaz de inducir el interferón en la etapa post natal (Charleston *et al.*, 2001; Ruggli *et al.*, 2003). El IFN- α/β es producido por muchos tipos de células luego de la infección viral y su función es generar un estado antiviral; además, es el enlace entre la inmunidad innata y adaptativa a través de la estimulación de la maduración de las CDs,

activación directa de los linfocitos B y T, activación de macrófagos y células Nk, inducción de la expresión de los MHC-1, etc. (Marrack *et al.*, 1999; Asselin-Paturel *et al.*, 2005; Le Bon *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que la falla en inducir IFN- α/β por el VDVB ncp es producto de la evolución, capacitando al virus a establecer persistencia en estadios tempranos del desarrollo fetal (Brackenbury *et al.*, 2003).

La comprensión de la patogénesis de la infección por el VDVB ha sido decisiva para establecer exitosos programas de control de la enfermedad en países europeos, pero también, conocer los mecanismos de interacción del virus con las células del sistema inmunitario innato y adaptativo servirá para el desarrollo de nuevas estrategias de control, tal vez nuevas vacunas que estimulen mejor al sistema inmunitario innato o vacunas que eviten infecciones transplacentarias.

Diagnóstico

Diversas técnicas para el diagnóstico de la DVB han sido desarrolladas que permiten detectar con precisión al animal o hato infectado pues sirven para la detección del virus, anticuerpos o componentes virales (antígeno, ácido nucleico) en un individuo o en un hato. Sin embargo, la disponibilidad de estas técnicas diagnósticas no está siendo debidamente empleada en la solución de los múltiples problemas que ocasiona el virus en el ganado (Dubovi, 2002; Salike y Dubovi, 2004).

El aislamiento viral (AV) en cultivo celular a partir de muestras de tejidos, leucocitos, suero, o semen es considerado el método estándar de oro pero las desventajas son el costo, tiempo, poca practicidad para trabajar muchas muestras, e interferencia por anticuerpos, entre otros. Además, si bien su especificidad es de 100%, su sensibilidad depende mayormente de las células en la cual se realiza el aislamiento (Salike y Dubovi, 2004).

La detección del antígeno viral es mucho más rápido y de menor costo. Las técnicas más usadas son inmunofluorescencia (IF) en tejido fresco e inmunoperoxidasa (IP) en tejido fresco o fijado en formalina utilizando mAbs (Ozkul *et al.*, 2002; Brodersen, 2004). La especificidad y sensibilidad de la prueba IP es de 97%, de IF es de 88 y 77% y de AV de 100 y 83%, respectivamente. Sin embargo, los datos de especificidad y sensibilidad de las técnicas IF, IP y ELISA han mejorado con el desarrollo de reactivos de mejor calidad como los mAbs (Ellis *et al.*, 1995; Njaa *et al.*, 2000). Por otro lado, ELISA de captura de antígeno en forma de kits para detectar virus en sangre o leche están disponibles en el mercado.

La detección de anticuerpos es el método diagnóstico más común, aunque de menor utilidad en hatos o en zonas donde se usa la vacunación contra DVB. En serología, el método estándar de oro es la neutralización viral y actualmente existen numerosas técnicas de ELISA en formato de kits. Las ELISAs son ideales como técnicas de tamiz para trabajar un gran número de muestras. La leche de tanque o porongo para detectar virus o anticuerpos contra el VDVB es adecuada para identificar hatos infectados con presencia de animales PI, pero igualmente, es de poca utilidad en animales vacunados. Hatos con ausencia o con bajos títulos de anticuerpos en leche de tanque y ausencia de anticuerpos en animales jóvenes indica que el hato está libre de animales PI; por otro lado, títulos altos de anticuerpos en leche de tanque, y con o sin anticuerpos en animales jóvenes constituye una evidencia de que el hato es positivo y que requiere de pruebas adicionales para identificar y remover animales PIs.

Técnicas moleculares como PCR en sus diferentes variedades vienen utilizándose en la última década para el diagnóstico de la DVB y otros pestivirus. La fortaleza del PCR es su elevada sensibilidad pero se ve afectada por su vulnerabilidad, ya que una mínima

concentración de ARN contaminante durante la colección o procesamiento en el laboratorio puede ser amplificado y resultar en falsos positivos, o también cuando las moléculas de ARN no son adecuadamente conservadas (Belak y Ballagi-Pordany, 1993; Wirz *et al.*, 1993). Sin embargo, los riesgos de contaminación en el laboratorio y otras desventajas como el alto costo son cada vez menores. La técnica de RT-PCR en tiempo real viene siendo utilizada por su rapidez y precisión, y tiene la ventaja de realizarse en un sistema cerrado evitándose la contaminación entre las muestras y no requiere del análisis por electroforesis del producto post PCR (Mahlum *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2005; Kosinova *et al.*, 2007). Por otro lado, la tecnología del PCR es ampliamente utilizada en la genotipificación y análisis filogenético del VDVB y otros pestivirus.

Últimamente, la tecnología de la proteómica representa un enorme potencial con fines de diagnóstico veterinario, como el Microarray que originalmente fue utilizado para el mapeo de genes pero que actualmente tiene un potencial para identificar agentes con alta variabilidad genética como el VDVB (Schmitt y Henderson, 2005; Belak, 2006).

Control

A partir de la década del 60, el control de la DVB estaba focalizado en prevenir la ocurrencia clínica de la enfermedad mediante la vacunación. En adelante, se fabricaron más de 150 vacunas comerciales a virus modificado o a virus inactivado; sin embargo, su uso masivo en algunos países por más de cuatro décadas, no ha logrado la reducción de la prevalencia e incidencia de la DVB. Van Oirschot *et al.* (1999) considera la necesidad de estudios adicionales sobre la eficacia y seguridad de las vacunas, sobre todo, considerando la diversidad antigénica de las cepas del VDVB de campo.

El propósito de la vacunación para el control de la DVB ha cambiado. En la actualidad, estas vacunas deben ser usadas como

una mediada adicional de bioseguridad en vez del concepto clásico de control (Moennig *et al.*, 2005; Lindberg *et al.*, 2006). Además, el principal objetivo de la vacunación es prevenir el pasaje del virus al feto para evitar las fallas reproductivas causadas por el virus. A la fecha, se tiene suficientes datos de la biología del virus, patogenia, y epidemiología de la enfermedad, así como las técnicas diagnósticas necesarias para considerar la erradicación de la DVB basadas en la bioseguridad, eliminación de animales PI y vigilancia, como lo demuestra los resultados de los exitosos programas de control que están efectuándose en muchos países europeos.

En el Perú no existe un programa de control de la DVB. Algunos ganaderos de las principales cuencas lecheras utilizan la vacunación. Las vacunas autorizadas oficialmente son de tipo inactivado y su uso es voluntario y profiláctico más que de control sistemático. Las vacunas pueden ser útiles solo cuando se aplica en forma estratégica y sistemática, es decir, como una medida de bioseguridad y conjuntamente con la detección de animales PI y vigilancia permanente. Estudios preliminares de control sin vacunación pero con detección y eliminación de los animales PI y maximizando las medidas de bioseguridad y vigilancia en dos hatos de crianza intensiva en Arequipa evidencian buenos resultados (Jayashi *et al.*, 2005; Zúñiga *et al.*, 2006).

LITERATURA CITADA

1. **Adashi EY. 1990.** The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: the emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series. *Endocrine Rev* 11: 454-465.
2. **Aguilar R, Benito A, Rivera H. 2006.** Seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en ganado lechero de crianza intensiva del valle de Lima. *Rev Inv Vet, Perú* 17: 148-153.

3. **Akkina RK. 1991.** Pestivirus bovine viral diarrhoea virus polypeptides: identification of new precursor proteins and alternative cleavage pathways. *Virus Res* 19: 67-82.
4. **Alenius S, Jacobsen SO, Cafaro E. 1986.** Frequency of bovine viral diarrhoea virus infections in Sweden among heifers selected for artificial insemination. *Proc. World Congr. Diseases of Cattle* 14: 204-207.
5. **Alvarez S, Rivera H, Pezo D, García W. 2002.** Detección de anticuerpos contra pestivirus en rumiantes de una comunidad campesina de la provincia de Canchas, Cusco. *Rev Inv Vet, Perú* 13(1): 46-51.
6. **Asselin-Paturel C, Brizard G, Chemin K, Boonstra A, O'Garra A, Vicari A, Trichieri G. 2005.** Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med* 201: 1157-1167.
7. **Atluru D, Gudapaty S, Xue W, Gurria F, Chengappa MM, McVey DS, Minocha HC, Atluru S. 1992.** *In vitro* inhibition of 5-lipoxygenase metabolite, leukotriene B₄, in bovine mononuclear cells by bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol* 31: 49-59.
8. **Baker JC. 1995.** The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet Clin North Am: Food Anim Practice* 11(3): 425-445.
9. **Banchereau J, Briere J, Caux F, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000.** Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.
10. **Bauhofer O, Summerfield A, Sakoda Y, Tratschin J-D, Hofmann M, Ruggli N. 2007.** Classical swine fever Npro interacts with Interferon Regulatory Factor 3 and induces its proteosomal degradation. *J Virol* 81: 3087-3096.
11. **Belak S, Ballagi-Pordany A. 1993.** Experiences on the application of the polymerase chain reaction in a diagnostic laboratory. *Mol Cell Probe* 7(3): 241-248.
12. **Belak S. 2006.** Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects. *Vaccine* 25: 5444-5452.
13. **Belknap EB, Collins JK, Larsen RS, Conrad KP. 2000.** Bovine viral diarrhoea in new world camelids. *J Vet Diagn Invest* 12: 568-570.
14. **Bielanski A, Hare WC. 1988.** Effect in vitro of bovine viral diarrhoea virus on bovine embryos with the zona pelucida intact, damaged and removed. *Vet Res Commun* 12: 19-24.
15. **Bieleski L, Talbot SJ. 2001.** Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vCyclin open reading frame contains an internal ribosome entry site. *J Virol* 75: 1864-1869.
16. **Bolin SR. 1995.** The pathogenesis of mucosal disease. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 11: 489-500.
17. **Bolin SR, McCurkin AW, Coria MF. 1985.** Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds. *Am J Vet Res* 46: 2385-2387.
18. **Booth JP, Stevens DA, Collins ME, Brownlie J. 1995.** Detection of bovine viral diarrhoea virus antigen and RNA in oviduct and granulose cells of persistently infected cattle. *J Reprod Fertil* 105: 17-25.
19. **Brackenbury LS, Carr BV, Charleston B. 2003.** Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. *Vet Microbiol* 96: 337-344.
20. **Brock K, Stringfellow D. 1993.** Comparative effects of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea on bovine blastocysts. *Theriogenology* 39: 196 (Abstr).
21. **Brock KV, Deng R, Riblet SM. 1992.** Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhoea virus by RNA ligation and PCR. *J Virol Methods* 38: 39-46.

22. **Brodersen BW. 2004.** Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet Clin Food Anim* 20: 85-93.
23. **Brown GB, Bolin SR, Frank DE, Roth JA. 1991.** Defective function of leucocytes from cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, and the influence of recombinant cytokines. *Am J Vet Res* 52: 381-387.
24. **Brownlie J. 1990.** The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev Sci Tech (OIE)* 9: 43-59.
25. **Brownlie J. 1991.** The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch Virol* 3(Suppl): 79-96.
26. **Brownlie J, Booth PJ, Stevens DA, Collins ME. 1997.** Expression of non-cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus in oocytes and follicles of persistently infected cattle. *Vet Rec* 141: 335-337.
27. **Brownlie J, Clark MC, Howard CJ. 1984.** Experimental production of fetal mucosal disease in cattle. *Vet Rec* 114: 535-536.
28. **Brownlie J, Clark MC, Howard CJ. 1989.** Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res Vet Sci* 46: 307-311.
29. **Brownlie J, Hooper LB, Thompson I, Collins ME. 1998.** Maternal recognition of fetal infection with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) – the bovine pestivirus. *Clin Diagn Virol* 10: 141-150.
30. **Bruschke CJM, Hulst MM, Moormann RJM, van Rijn PA, Van Oirschot JT. 1997.** Glycoprotein E of pestivirus induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J Virol* 71: 6692-6696.
31. **Cabello K, Quispe R, Rivera H. 2006.** Frecuencia de los virus parainfluenza-3, respiratorio sincitial y diarrea viral bovina en un rebaño mixto de una comunidad campesina de Cusco. *Rev Inv Vet, Perú* 17(2): 167-172.
32. **Canal WC, Strasser M, Herting C, Masuda A, Peterhans E. 1998.** Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet Microbiol* 63: 85-97.
33. **Carman S, Carr N, DeLay J, Baxi M, Deregt, D, Hazlett M. 2005.** Bovine viral diarrhoea virus in alpaca: abortion and persistent infection. *J Vet Diagn Invest* 17: 589-593.
34. **Celedón MO, Osorio J, Pizarro J. 2006.** Aislamiento e identificación de pestivirus obtenidos de alpacas (*Lama pacos*) y llamas (*Lama glama*) de la Región Metropolitana, Chile. *Arch Med Vet* 38: 247-252.
35. **Charleston B, Brackenbury LS, Carr BV, Fray MD, Hope JC, Howard CJ, Morrison WI. 2002.** Alpha/beta and gamma interferons are induced by infection with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in vivo. *J Virol* 76: 923-927.
36. **Charleston B, Fray MD, Baigent S, Carr BV, Morrison WI. 2001.** Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J Gen Virol* 82: 1893-1897.
37. **Childs T. 1946.** X disease in cattle. *Can J Comp Med* 10: 316-319.
38. **Coggins L, Gilliespie JH, Robson DS. 1961.** Attenuation of virus diarrhoea virus (Strain Oregon C24V) for vaccine purposes. *Cornell Vet* 51: 539-545.
39. **Collett MS, Andersen DK, Retzel E. 1988.** Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the Flaviviridae. *J Gen Virol* 69: 2637-2643.
40. **Collett MS, Moening V, Horzinek MC. 1989.** Recent advances in pestivirus research. *J Gen Virol* 70: 253-266.

41. **Confer AW, Fulton RW, Step DL, Johnson BJ, Ridpath JF. 2005.** Viral antigen distribution in the respiratory tract of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus subgenotype 2a. *Vet Pathol* 42: 192-199.
42. **Darbyshire JH. 1960.** A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. *Vet Rec* 72: 331-333.
43. **Donis OR, Dubovi EJ. 1987.** Glycoproteins of bovine viral diarrhea-mucosal disease virus in infected bovine cells. *J Gen Virol* 68: 1607-1616.
44. **Donis RO. 1995.** Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *Vet Clin North Am: Food Anim Practice* 11: 393-423.
45. **Dubovi EJ. 2002.** Diagnostic testing programs are but one element of a BVDV control program. [Internet]. [3 marzo 2008]. Disponible en: http://www.ars.usda.gov/news/docs.htm?docid=10982&pf=1&cg_id=0.
46. **Duffell SJ, Harkness JW. 1985.** Bovine virus diarrhea-mucosal disease infection in cattle. *Vet Rec* 117: 240-245.
47. **Ellis JA, Martin K, Norman GR, Haines DM. 1995.** Comparison of detection methods for bovine viral diarrhea virus in bovine abortions and neonatal deaths. *J Vet Diagn Invest* 7: 433-436.
48. **Falcone E, Cordioli P, Sala G, Tarantino M, Tollis M. 2001.** Genotyping of bovine viral diarrhea viruses isolated from cattle in northern Italy. *Vet Res Commun* 25: 161-167.
49. **Flores EF, Ridpath JF, Weiblen R, Vogel FS, Gil LH. 2000.** Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res* 87: 51-60.
50. **Fray MD, Mann GE, Clark MC, Charleston B. 1999.** Bovine viral diarrhea virus: its effects on estradiol, progesterone and prostaglandin secretion in the cow. *Theriogenology* 51: 1533-1546.
51. **Fray MD, Prentice H, Clark MC, Charleston B. 1998.** Immunohistochemical evidence for the localization of bovine viral diarrhea virus, a single strand RNA virus, in ovarian oocytes in the cow. *Vet Pathol* 35: 253-259.
52. **Fredriksen B, Sandvik T, Loken T, Odegaard SA. 1999.** Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhea virus. *Vet Rec* 144: 111-114.
53. **Fulton RW, Ridpath JF, Ore Sh, Confer AW, Salike JT, Burge LJ, Payton ME. 2005.** Bovine viral diarrhea virus subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: distribution of BVDV 1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Vet Microbiol* 111: 35-40.
54. **Gillespie JH, Baker JA, McEntee K. 1960.** A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet* 50: 73-79.
55. **Givens, MD, Heath AM, Brock KV, Edens MSD. 2002.** BVDV persists in semen after acute infection of post-pubertal, immunocompetent bulls. In: *Detecting and controlling BVDV infections: Conference Proc*, p 37. Ames, Iowa.
56. **Glew FJ, Carr BV, Brackenbury LS, Hope JC, Charleston B, Howard CJ. 2003.** Differential effects of bovine viral diarrhea virus on monocytes and dendritic cells. *J Gen Virol* 84: 1771-1780.
57. **Goyal SM, Bouljihad M, Haugerud S, Ridpath JF. 2002.** Isolation of bovine viral diarrhea virus from an alpaca. *J Vet Diagn Invest* 14: 523-525.
58. **Grooms DL, Brock KV, Ward LA. 1998.** Detection of bovine viral diarrhea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhea virus. *J Vet Diagn Invest* 10: 125-129.

59. **Grooms DL. 2004.** Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin Food Anim* 20: 5-19.
60. **Hamers C, Couvreur B, Dehan P, Letellier C, Levalle P, Kerkhofs P, Pastoret PP. 1999.** Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus strains isolated from haemorrhagic syndromes. *Ann Med Vet* 143: 197-200.
61. **Hilton L, Moganeradj K, Zhang G, Chen Y-H, Randall RE, McCauley JW, Goodbourn S. 2006.** The Npro product of bovine viral diarrhoea virus inhibits DNA binding by Interferon Regulatory Factor 3 and targets it for proteosomal degradation. *J Virol* 80: 11723-11732.
62. **Hoffmann B, Beer M, Schelp C, Schirrmeyer H, Depner K. 2005.** Validation of a real time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Method* 130: 36-44.
63. **Horzineck MC. 1973.** The structure of togavirus. *Prog Med Virol* 16: 109-156.
64. **Houe H. 1995.** Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North America: Food Animal Practice* 11: 521-547.
65. **Houe H. 1999.** Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus BVDV infection. *Vet Microbiol* 64: 89-107.
66. **Houe H. 2003.** Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 31: 137-143.
67. **Houe H, Meyling A. 1991.** Prevalence of bovine viral diarrhoea virus in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Prev Vet Med* 11: 9-16.
68. **Houe H, Baker JC, Maes RK, Wuryastuti H, Wasito R, Ruegg PL, Lloyd JW. 1995.** Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in 20 herds in two counties in central Michigan and comparison of prevalence of antibody positive cattle among herds with different infection and vaccination status. *J Vet Diagn Invest* 7: 321-326.
69. **Huamán JC, Rivera H, Araínga M, Gavidia C, Manchego A. 2007.** Diarrea viral bovina y animales portadores del virus en hatos productores de leche de la irrigación de Majes, Arequipa. *Rev Inv Vet, Perú* 18: 141-149.
70. **Itoh O, Sasaki H, Hanaki T. 1984.** Study of serologic relationship among non cytopathic strains of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus by reverse plaque technique. *Jpn J Vet Sci* 46: 669-675.
71. **Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJH, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E. 1988.** A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyelocarditis virus ARNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62: 2536-2643.
72. **Jasper MJ, Robertson SA, van der Hoek KH, Bonello N, Brannstrom M. 2000.** Characterization of ovarian function in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *Biol Reprod* 62: 704-713.
73. **Jayashi C, Gavidia G, Araínga M, Manchego A, Rivera H. 2005.** Dinámica de seroconversión en hembras bovinas post eliminación de animales portadores del virus de la diarrea viral bovina. *Rev In Vet, Perú* 16: 56-64.
74. **Jones LR, Zandomeni R, Weber EL. 2001.** Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Vet Microbiol* 81: 367-375.
75. **Kirkland PD, McGowan MR, Mackintosh SG, Moyle A. 1997.** Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. *Vet Rec* 140: 124-127.
76. **Kosinova E, Psikalm I, Robesova B, Kovarcik K. 2007.** Real Time PCR for quantification of bovine viral diarrhoea virus RNA using Sybr green I fluorimetry. *Vet Med* 52: 253-261.

77. **Kummerer BM, Tautz N, Becher P, Thiel HJ, Meyer G. 2000.** The genetic basis for cytopathogenicity of pestivirus. *Vet Microbiol* 77: 117-128.
78. **Le Bon A, Thompson C, Kamphuis E, Durand V, Rossmann C, Kalinke U, Tough DF. 2006.** Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN. *J Immunol* 176: 2074-2078.
79. **Lee KM, Gillespie JH. 1957.** Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture. *Am J Vet Res* 18: 952-955.
80. **Lértora WJ. 2003.** Diarrea viral bovina: actualización. *Rev Vet* 14: 42-49.
81. **Letellier C, Kerkhofs P, Wellemans G, Vanpdenbosch E. 1999.** Detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus by reverse transcription – polymerase chain amplification of the 5' URT. *Vet Microbiol* 64: 155-167.
82. **Lindberg A, Brownlie J, Gunn GJ, Houe H, Moennig V, Saatkamp HW, Sandvik T, Valle PS. 2006.** The control of bovine viral diarrhea virus in Europe: today and in the future. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 26: 961-979.
83. **Loken T, Krogsrud J, Larsen IL. 1991.** Pestivirus infections in Norway. Serological investigations in cattle, sheep and pigs. *Acta Vet Scand* 32: 27-34.
84. **Mahlum CE, Haugerud S, Shivers JL, Rossow KD, Goyal SM, Collins JE. 2002.** Detection of bovine viral diarrhea virus by TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 14: 120-125.
85. **Malmquist WA. 1968.** Bovine viral diarrhea – Mucosal disease: Etiology, pathogenesis and applied immunity. *J Am Vet Med Assoc* 152: 763-768.
86. **Manchego A, Rivera H, Rosadio R. 1998.** Seroprevalencia de agentes virales en rebaño mixto de una comunidad andina peruana. *Rev Inv Pec IVITA, Perú. N° Extraordinario* 9(2): 1-10.
87. **Marrack P, Kappler J, Mitchell T. 1999.** Type I interferon keep activated T cells alive. *J Exp Med* 189: 521-530.
88. **Martínez-Salas E, Ramos R, Lafunete E, López de Quinto S. 2001.** Functional interactions in internal translation directed by viral and cellular IRES elements. *J Gen Virol* 82: 973-984.
89. **Mayo MA, Pringle CR. 1997.** Virus taxonomy. *J Gen Virol* 79: 649-657.
90. **McClurkin AW, Littledike E, Cutlip RC, Frank GH, Coria MF, Bolin SR. 1984.** Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. *Can J Comp Med* 48: 156-161.
91. **McGowan MR, Kirkland PD, Rodwell SG, Littlejohns IR. 1993.** Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Vet Rec* 133: 39-43.
92. **McGowan M, Kirkland P. 1995.** Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *Br Vet J* 15: 263-270.
93. **McKercher DG, Saito JK, Crenshaw GL. 1968.** Complication in cattle following vaccination with a combined bovine viral diarrhea-infectious bovine rhinotracheitis vaccine. *J Am Vet Med Assoc* 152: 1621-1624.
94. **Meyers G, Rumenapf T, Thiel H-J. 1989.** Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171: 555-567.
95. **Meyers G, Thiel H-J. 1996.** Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Virus Res* 47: 53-118.
96. **Moennig V. 1990.** Pestivirus: A review. *Vet Microbiol* 23: 35-54.
97. **Moennig V, Eicken K, Flebbe U, Frey H-R, Grummer B, Haas L, Greiser-Wilke I, Liess B. 2005.** Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhea (BVD). *Prev Vet Med* 72: 109-114.
98. **Moerman A, Straver PJ, de Jong MC, Quak J, Baanvinger T, van Oirschot JT. 1993.** A long term

- epidemiological study of bovine viral diarrhea infections in a large herd of dairy cattle. *Vet Rec* 132: 622-626.
99. **Moormann RJM, Hulst MM. 1988.** Hog cholera virus: identification and characterization of the viral RNA and virus-specific RNA synthesized in infected swine kidney cells. *Virus Res* 11: 281-291.
 100. **Myers TM, Kolupaeva VC, Mendez E, Baginski SG, Frolov I, Hellen CU, Rice Ch. 2001.** Efficient translation initiation is required for replication of bovine viral diarrhea virus subgenomic replicons. *J Virol* 75: 4226-4238.
 101. **Muñoz-Zanzi CA, Thurmond MC, Hietala ShK. 2004.** Effect of bovine viral diarrhea virus infection on fertility of dairy herifers. *Theriogenology* 61: 1085-1099.
 102. **Nagai M, Sato M, Nagano H, Pang H, King X, Murakami T, Ozawa T, Ahashi H. 1998.** Nucleotide sequence homology to bovine viral diarrhea virus 2 (BVDV 2) in the 5' - URT of BVDV from cattle with mucosal disease or persistent infection in Japan. *Vet Microbiol* 60: 271-276.
 103. **Nielsen SS, Roensholt L, Bitsch V. 2000.** Bovine virus diarrhea virus in free-living deer from Denmark. *J Wildlife Dis* 36: 584-587.
 104. **Njaa BL, Clark EG, Jansen E, Ellis JA, Haines DM. 2000.** Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J Vet Diagn Invest* 12: 393-339.
 105. **Oh SK, Scott MP, Sarnow P. 1992.** Homeotic gene antennapedia mRNA contains 5' -noncoding sequences that confer translational initiation by internal ribosome binding. *Gene Dev* 6: 1643-1653.
 106. **Olafson P, MacCallum AD, Fox A. 1946.** An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet* 36: 205-213.
 107. **Ozkul A, Yesilbag K, Burgu I. 2002.** Comparison of four diagnostic techniques for detecting bovine virus diarrhea virus in buffy coat samples after log-term storage. *Turk J Vet Anim Sci* 26: 1043-1048.
 108. **Paton DJ. 1995.** Pestivirus diversity. *J Comp Path* 112: 215-236.
 109. **Paton DJ, Sharp G, Ibata G. 1999.** Foetal cross-protection experiments between type 1 and type 2 bovine viral diarrhea virus in pregnant ewes. *Vet Microbiol* 64: 185-196.
 110. **Pellerin C, van den Hurk J, Lecomte J, Tijssen P. 1994.** Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreak and high mortalities. *Virology* 203: 260-268.
 111. **Pelletier J, Sonenberg N. 1988.** Internal initiation of translation of eukaryotic RNAm directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334: 320-325.
 112. **Peterhans E, Jungi TW, Schweizer M. 2003.** BVDV and innate immunity. *Biologicals* 31: 107-112.
 113. **Plant JW, Littlejohns IR, Gardnier AC, Vantsis JT, Huck R.A. 1973.** Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. *Vet Rec* 92: 454-455.
 114. **Potgieter LND. 1988.** Immunosuppression of cattle as a result of bovine viral diarrhea infection. *Agri Pract* 9: 7-14.
 115. **Potgieter LND. 1995.** Immunology of bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am: Food Animal Practice* 11: 501-519.
 116. **Potgieter, LND. 1997.** Bovine respiratory tract disease caused by bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am: Food Animal Practice* 13: 471-481.
 117. **Potter ML, Corstvet RE, Looney CR, Fulton RW, Archbald LF, Godke RA. 1984.** Evaluation of bovine viral diarrhea virus uptake by preimplantation embryos. *Am J Vet Res* 12: 1778-1780.

118. **Purchio AF, Larson R, Collett MS. 1984.** Characterization of bovine viral diarrhea viral proteins. *J Virol* 50: 666-669.
119. **Quispe QR, Ccama SA, Rivera GH, Araínga RM. 2008.** El virus de la diarrea viral en bovinos criollos de la provincia de Melgar, Puno. *Rev Inv Vet, Perú* (en prensa).
120. **Ramos-Vera, JA. 2005.** Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42: 405-426.
121. **Ramsey FK, Chivers WH. 1953.** Mucosal disease of cattle. *North Am Vet* 34: 629-634.
122. **Ridpath JF. 2005.** Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S control programs. *Prev Vet Med* 72: 17-30.
123. **Ridpath JF, Bolin SR. 1991.** Antigenic and genomic comparison between non-cytopathic and cytopathic bovine viral diarrhea virus isolated from cattle that had spontaneous mucosal disease. *J Gen Virol* 72: 725-729.
124. **Ridpath JF, Bolin S. 1998.** Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhea virus (BVDV) by PCR. *Mol Cell Probe* 12: 101-106.
125. **Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ. 1994.** Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology* 205: 66-74.
126. **Ridpath JF, Neill JD, Frey M, Landgraf JG. 2000.** Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbol* 77: 145-155.
127. **Rivera H. 1993.** El virus de la diarrea viral bovina. *Rev Pec Inv IVITA* (Perú) 6(1): 1-7.
128. **Rivera H. 2001.** Etiología infecciosa del aborto bovino. *Rev Inv Vet, Perú Supl* 1: 95-99.
129. **Rivera H, Madewell B, Ameghino E. 1987.** Serologic survey of viral antibodies in the Peruvian alpaca (*Lama pacos*). *Am J Vet Res* 48: 189-191.
130. **Rivera H, Manchego A, Sandoval N, Flores E. 1994.** Complejo respiratorio bovino en terneros del valle de Lima. *Rev Inv Pec IVITA* (Perú) 7(1): 35-38.
131. **Rivera H, Valdivia L, Benito A. 2001.** Diarrea viral bovina en bovinos lecheros de crianza semiintensiva de la Provincia de Parinacochas, Ayacucho. *Rev Inv Vet, Perú Supl* 1: 380-381.
132. **Roeder P, Jeffrey M, Cranwell M. 1986.** Pestivirus fetopathogenicity in cattle: changing sequella with fetal maturation. *Vet Rec* 118: 44-48.
133. **Roeder PL, Drew TW. 1984.** Mucosal disease of cattle: A late sequel of fetal infection: *Vet Rec* 114: 309-313.
134. **Rufenacht J, Schaller P, Audige L, Knutti B, Kupfer U, Peterhans E. 2001.** The effect of infection with bovine viral diarrhea virus on the fertility of Swiss dairy cattle. *Theriogenology* 56: 199-210.
135. **Ruggli N, Tratschin JD, Schweizer M, McCullough FC, Hofmann MA, Summerfield A. 2003.** Classical swine fever virus interferes with cellular antiviral defense: evidence for a novel function of N^{pro}. *J Virol* 77: 7645-7654.
136. **Ruijin W, van der Hoek KH, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL. 2004.** Macrophage contributions to ovarian function. *Hum Reprod* 10: 119-133.
137. **Rweyemamu, MM., Fernandez AA, Espinoza AM, Schudel AA, Lager IA, Mueller SB. 1990.** Incidence, epidemiology and control of bovine viral diarrhea virus in Latin America. *Rev Sci Tech* 9: 207-221.
138. **Salike JT, Dibovi EJ. 2004.** Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet Clin Food Anim* 20: 69-83.
139. **Schmitt B, Henderson L. 2005.** Diagnostic tools for animal diseases. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 24(1): 243-250.

140. **Seago J, Hilton L, Reid E, Doceul V, Jeyatheesan J, Moganeradj K, McCauley J, Charleston B, Goodbourn S. 2007.** The N^{pro} product of classical swine fever virus and bovine viral diarrhoea virus uses a conserved mechanism to target interferon regulatory factor-3. *J Gen Virol* 88: 3002-3006.
141. **Shimizu M, Watanabe H, Satou K, Murakami S. 1989.** Antigenic diversity of bovine viral diarrhoea – mucosal disease virus recently isolated from persistently infected cattle and mucosal disease, and serologic survey on bovine sera using antigenically different BVD-MD virus. *Jpn J Vet Sci* 51: 1115-1122.
142. **Ssentongo YK, Johnson RH, Smith JR. 1980.** Association of bovine viral diarrhoea – mucosal disease virus with ovariitis in cattle. *Aus Vet J* 56: 272-275.
143. **Ståhl K, Benito A, Felmer R, Zúñiga J, Reinhardt G, Rivera H, Baule C, Moreno-Lopez J. 2006.** Genetic diversity of BVDV virus isolated from Peru and Chile. In: Ståhl K Bovine viral diarrhoea virus and other reproductive pathogens. Doctoral Thesis No. 2006: 53. Uppsala, Sweden: Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences.
144. **Ståhl K, Rivera H, Vagsholm I, Moreno-López J. 2002.** Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. *Prev Vet Med* 56: 193-202.
145. **Tautz N, Meyers G, Thiel H-J. 1998.** Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus. *Clin Diagn Virol* 10: 121-127.
146. **Terpstra C. 1985.** Border disease: a congenital infection of small ruminants. *Prog Vet Microbiol Immun* 1: 175-198.
147. **Thomson RG, Savan M. 1963.** Studies on virus diarrhoea and mucosal disease of cattle. *Can J Com Med Vet Sci* 27: 207-214.
148. **Uematsu S, Akira S. 2007.** Toll-like receptors and type I interferons. Minireview. *J Biol Chem* 282: 15319-15323.
149. **Underdahl NR, Grace OD, Hoerlein AB. 1957.** Cultivation in tissue culture of cytopathogenic agent from bovine mucosal disease. *Proc Soc Biol Med* 94: 795.
150. **van Oirschot JT, Brusckhe CJM, van Rijn PA. 1999.** Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol* 64: 169-183.
151. **Victorio W, Rosadio R, Rivera H, Manchego A. 2004.** Seroprevalencia de virus neumopatógenos en alpacas adultas de la provincia de Canchis, Cusco. *Rev Inv Vet, Perú* 15: 127-131.
152. **Vilcek S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmannith W, Vega S, Scicluna MT, Palfi V. 2001.** Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol* 146: 99-115.
153. **Virakul P, Fahning ML, Joo HS, Zemjanis R. 1988.** Fertility of cows challenged with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus during an outbreak of spontaneous infection with a non-cytopathic strain. *Theriogenology* 29: 441-449.
154. **Voges H, Horner GW, Rowe S, Wellenberg GJ. 1998.** Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull. *Vet Microbiol* 61: 165-175.
155. **Wageck C, Strasser M, Hertig CH, Masuda AM, Peterhans E. 1998.** Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet Microbiol* 63: 85-97.
156. **Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SY, Horzinek MG. 1985.** Togaviridae. *Intervirology* 24: 125-139.
157. **Wirz B, Trastchin J-D, Muller HK, Mitchell DB. 1993.** Detection of hog

- cholera virus and differentiation from other pestivirus by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31: 1148-1154.
- 158. Wolfmeyer A, Wolf G, Beer M, Strube W, Hehnen HR, Schmeer N, Kaaden OR. 1997.** Genomic (5'-URT) and serologic differences among German BVDV field isolates. *Arch Virol* 142: 2049-2057.
- 159. Zanabria V, Rivera H, Rosadio R. 2000.** Etiología del síndrome neumónico agudo en vacunos de engorde en Lima. *Rev Inv Vet, Perú* 11: 169-187.
- 160. Zúñiga A, Rivera H, Araínga M, Manchego A. 2006.** Evaluación de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en un hato en proceso de erradicación de la enfermedad. *Rev Inv Vet, Perú* 17: 44-51.