

FENOTIPO Y GENOTIPO DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL AISLADO DE BOVINOS EN EL PERÚ

PHENOTYPE AND GENOTYPE OF BOVINE VIRAL DIARRHOEA VIRUS ISOLATED IN PERUVIAN CATTLE

Mariluz Araínga R.^{1,2}, Hermelinda Rivera G.^{1,3}, Juan Carlos Huamán G.¹, Alberto Manchego S.¹

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el fenotipo y genotipo de cepas del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) aisladas de bovinos de diversos lugares del Perú. Entre 1998 y 2007 se colectó muestras de tejidos de fetos abortados, sangre, suero o plasma de bovinos con infección aguda o portadores del virus procedente de las principales cuencas lecheras del país para la búsqueda del antígeno del VDVB mediante inmunofluorescencia y ELISA de captura. Las muestras positivas al antígeno viral fueron cultivadas en monocapas de células de cornete nasal de feto bovino (CNB), libre del VDVB hasta el tercer pasaje, para determinar el biotipo. Las muestras positivas, tanto de los tejidos como del tercer pasaje, fueron procesadas por la técnica RT-PCR en tiempo real, para determinar el genotipo viral. Se aislaron 41 cepas del VDVB en CNB. El 85.4% (35/41) correspondieron al fenotipo no citopático y 14.6% (6/41) al citopático. El 45.5% (25/55) y el 74.5% (41/55) de las muestras de tejidos y del 3^{er} pasaje en CNB, respectivamente, resultaron positivas al VDVB mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Todas las cepas pertenecieron al VDVB-1. Los resultados enriquecen la epidemiología de la DVB en el país y sugieren la ausencia o baja prevalencia de cepas del VDVB-2 en la población bovina de las principales cuencas lecheras.

Palabras clave: virus de la diarrea viral bovina, ARN, fenotipo, genotipo, PCR en tiempo real, cultivo celular

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the phenotype and genotype of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) in Peruvian cattle. During the period 1998-2007, tissues of aborted foetus, blood, serum or plasma samples of bovine with acute infection or persistently infected from dairy herds of various locations in the country were collected and the BVDV antigen was detected by immunofluorescence or capture ELISA tests, and positive samples were inoculated in BVDV free BT cells and cultured until third passage to

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

²E-mail: mariluz.arainga@gmail.com

³E-mail: hriverag2005@yahoo.es

determine the biotype. Both animal tissues and third passage of positive samples were tested by a Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for genotyping the strains. Forty one BVDV strains were isolated in BT cells. Eighty five percent (35/41) of the isolates were non-cytopathic and 14.6% (6/41) cytopathic. Forty five and a half percent (25/55) and 74.5% (41/55) of the animal tissues and from the 3rd passage samples respectively, were positive to BVDV by Real Time RT-PCR test. All isolates belonged to BVDV-1 genotype. These results contribute to a better understanding of the epidemiology of the bovine viral diarrhoea disease in Peru and suggest that BVDV-2 is absent or has low prevalence in dairy herds.

Key words: bovine viral diarrhoea virus, RNA, phenotype, genotype, real time PCR, cell culture

INTRODUCCIÓN

La industria lechera en el Perú está concentrada en las cuencas de Arequipa, Lima y Cajamarca (MINAG, 1996), aunque también se encuentra en zonas como Trujillo (La Libertad), valle del Mantaro (Junín) y valles interandinos con disponibilidad de recursos forrajeros. La ganadería lechera afronta serias limitantes que afectan su desarrollo, entre ellas, enfermedades infecciosas como el virus de la diarrea viral bovina (VDVB).

La DVB es una enfermedad ampliamente distribuida en el país, con prevalencias mayores al 50%, siendo causa importante de fallas reproductivas y un componente del complejo respiratorio en terneros (Rivera *et al.*, 1994). Las pérdidas estimadas a causa de esta enfermedad son muy variables, dependiendo de las condiciones de cada establo; pues ocasiona reducción en la producción de leche, menor tasa de concepción, desórdenes respiratorios, abortos, defectos congénitos y retardo en el crecimiento, entre otros (Houe, 2003). El virus puede cruzar la barrera placentaria, infectar al feto y ocasionar el nacimiento de un ternero con infección persistente durante la vida postnatal, convirtiéndose en el principal diseminador del virus (Becher *et al.*, 1997). Los animales persistentemente infectados (PI) posibilitan la generación de los dos fenotipos virales, citopático y no citopático, pudiendo, además,

desarrollar una enfermedad de carácter mortal, denominada Enfermedad de las Mucosas (Baker, 1987).

Los métodos de diagnóstico, como serología con anticuerpos policlonales o monoclonales, pruebas de neutralización viral, pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y análisis filogenéticos sostenidos por estudios de secuenciamiento genético de pestivirus, han identificado varios genotipos pestivirales: virus de la diarrea viral bovina genotipo 1 (VDVB-1), virus de la diarrea viral bovina genotipo 2 (VDVB-2), virus de la enfermedad de la frontera (VEF), virus de la peste porcina clásica (VPPC) y una quinta especie tentativa, representada por pestivirus de animales silvestres y atípicos (Ridpath *et al.*, 1994; Paton 1995; Becher *et al.*, 1997, 2003).

EL VDVB ha sido aislado en varios países europeos (Wolfmeyer *et al.*, 1997; Letellier *et al.*, 1999; Vilcek *et al.*, 1999, 2005; Falcone *et al.*, 2001; Tajima *et al.*, 2001), EEUU y Canadá (Ridpath *et al.*, 1994; Chul *et al.*, 2005; Ridpath, 2005), Japón (Sakoda *et al.*, 1999), y en América Latina (Flores *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2001; Pizarro-Lucero *et al.*, 2006). Asimismo, se han desarrollado estudios de genotipificación y cuantificación del VDVB, usando para ello técnicas más rápidas, con alta sensibilidad y especificidad, como es el PCR en Tiempo Real (Letellier y Kerkhofs, 2003).

En el país, la información sobre el VDVB se limita a la prevalencia de la enfermedad, pero no se conocen las características biomoleculares de las cepas que circulan en la población bovina. El objetivo del presente estudio fue conocer el fenotipo y genotipo del virus y su distribución en la población bovina de varios lugares del país como una vigilancia de la emergencia de cepas patógenas y para un mejor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Virología y el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima.

Muestras

Se seleccionaron 55 muestras de bazo, timo, riñón, pulmón de fetos bovinos abortados y muestras de sangre, suero o plasma de bovinos con sospecha de infección aguda o PI, procedentes de establos lecheros de Arequipa, Cajamarca, Junín, La Libertad, Lima y Puno, que fueron remitidas para la detección de antígenos del VDVB entre 1998 y 2007 y que resultaron positivas o sospechosas a antígenos del VDVB mediante pruebas convencionales (Inmunofluorescencia y ELISA de captura).

Determinación del Antígeno Viral

Se determinó la presencia del antígeno viral en los tejidos mediante la técnica de inmunofluorescencia directa, usando un conjugado comercial (Ames, Iowa, USA), siguiendo el protocolo disponible en el Laboratorio de Virología de la FMV; mientras que las muestras de sangre y suero sanguíneo fueron analizadas mediante ELISA de captura (kit comercial Moredun-UK o IDEXX-USA).

Todas las muestras positivas y sospechosas se conservaron en congelación a -35 ó -70 °C hasta el momento del aislamiento viral. Las muestras de sangre que resultaron positivas a virus fueron centrifugadas a 3000 g x 10 minutos para la obtención de leucocitos y plasma, antes de ser congeladas.

Aislamiento Viral y Determinación del Fenotipo

Las muestras de tejido que resultaron positivas a virus fueron homogenizadas al 10% Peso/Volumen en medio MEM, y se centrifugaron para obtener el sobrenadante. Este, así como leucocitos y suero sanguíneo se inocularon en monocapas de cornete nasal de feto bovino (CNB), cultivadas en placas de 24 hoyos en una incubadora a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂, durante 5 días, y observadas diariamente en busca de lesión celular para determinar el fenotipo (biotipo) viral. Cumplidos los 5 días, se cosecharon las células infectadas, para luego hacer pasajes ciegos (hasta por tercera vez) en nuevas monocapas de células. En cada pasaje se realizaron pruebas de identificación de antígenos virales con la técnica de inmunoperoxidasa (kit comercial "Trop-IIP Pestivirus", Trop-Bio, Australia). Las muestras positivas al virus y que no mostraron efecto citopático fueron consideradas cepas No Citopáticas (NCP) y las que presentaron lesiones celulares fueron consideradas cepas Citopáticas (CP).

Determinación del Genotipo Viral

Se realizó la extracción del ARN de las 55 muestras originales y de las muestras del tercer pasaje en cultivo celular, utilizando el kit comercial de extracción y purificación de ARN "SV Total RNA Isolation System" (Promega, EEUU). Además, se extrajo el ARN de las cepas virales controles NADL (VDVB genotipo 1) y cepa 125 (VDVB genotipo 2), y del cultivo celular normal (cornete nasal bovino), así como de las muestras de suero de bovinos de un hato negativo al VDVB. El ARN aislado fue cuantificado

usando un espectrofotómetro de luz UV visible (Varian - Casy 50 Bio) y conservado en congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para la reacción de RT-PCR en Tiempo real se utilizó el kit "DyNamo SYBR Green 2-Step qRT-PCR F-430L" (Finnzymes, Finlandia), considerando, además, las especificaciones para cada set de primers específicos (Cuadro 1). Brevemente, la técnica consistió en:

Extracción del ARN viral y de los controles

Todos los ARN fueron extraídos de 100 μl de la muestra utilizando 175 μl del buffer de lisado del ARN siguiendo las instrucciones del fabricante del kit SV (Promega). La lisis se realizó a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos y los tubos enfriados en hielo. Los tubos conteniendo el lisado fueron centrifugados a $14\ 000 \times g$ a $20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos continuándose con la purificación del ARN por centrifugación. Finalmente el ARN purificado fue eluido con 100 μl de agua libre de nucleasas y fue almacenado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

PCR en Tiempo Real en 2 pasos

a) Transcripción Reversa (Síntesis de ADNc). Para la Transcripción Reversa se utilizó el kit DyNamo SYBR Green 2-step qRT-PCR F430L (Finnzymes, Finlandia) que contiene los reactivos necesarios para la síntesis de ADNc y para la amplificación del ADN (PCR) por los primers específicos. Para la síntesis del ADNc se preparó la mezcla de reactivos que contiene el kit en un volumen de 20 μl al cual se le añadió el ARN extraído y purificado colocándose en el equipo termociclador PTC 200 (Peltier Therme Cycler) Chromo 4 (detector continuo de fluorescencia) (MJ Research, UK) por 10 minutos a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 minutos a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, y una vez finalizado se mantuvo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

b) PCR en Tiempo Real. Se preparó una mezcla de reacción final de 20 μl /muestra/genotipo por cada set de primers (VDVB-1 y VDVB-2) y se programó en el termociclador de acuerdo a la temperatura de hibridización (annealing) de los primers específicos. El programa constó de 15 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 35 ciclos de: 10 segundos a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 segundos a la temperatura promedio de los primers ($52\text{ }^{\circ}\text{C}$), 30 segundos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, luego 10 minutos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se continuó con $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ con incremento de $0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ cada 2 segundos hasta $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ y al finalizar se mantuvo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al término de la prueba, se visualizó las curvas de amplificación (CT) en forma logarítmica y se analizó las temperaturas de disociación (TD) para cada genotipo viral de referencia VDVB-1 y VDVB-2 que estuvieron entre 84 y $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente (Fig. 1), comparando con la TD de los aislados de campo (Fig. 2).

Análisis de Datos

La positividad al VDVB-1 y VDVB-2 fue determinada por el análisis de la temperatura de disociación (Melting), del programa "Opticon Monitor" del equipo del PCR en Tiempo Real. El número de muestras positivas a antígenos virales, fenotipos y genotipos se representan mediante porcentajes.

RESULTADOS

Las 55 muestras que resultaron positivas o sospechosas al VDVB por inmunofluorescencia (IF) o ELISA de captura, así como al tercer pasaje en cultivo celular de CNB se muestran en el Cuadro 2, en tanto que los resultados de las muestras originales y del tercer pasaje en CNB mediante la técnica molecular de RT-PCR en tiempo real, usando primers para la detección de Pestivirus, se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 1. Relación de primers de la región 5' UTR (Pan Pestivirus, VDVB-1 y VDVB-2)¹ comerciales utilizados con la técnica de PCR en Tiempo Real

Primer ²	Especificidad	Secuencia	Posición del genoma	Tamaño ³
Pan F	Pestivirus	5'AGGGTA GTC GTCAGT GGT TCG3'	185-195	210 bp
Pan R	Pestivirus	5'TCAACT CCA TGT GCC ATG TAC3'	395-375	
Gen1 F	VDVB-1	5' GGT AGC AAC AGT GGT GAG 3'	139-155	221 bp
Gen1 R	VDVB-1	5' GTA GCA ATA CAG TGG GCC 3'	360-343	
Gen2 F	VDVB-2	5' ACT AGC GGT AGC AGT GAG 3'	139-145	221 bp
Gen2 R	VDVB-2	5' CTA GCG GAA TAG CAG GTC 3'	360-343	

¹ Descrito por Letellier *et al.* (1999)² F: Forward, R: Reverse³ Tamaño del producto amplificado

Cuadro 2. Detección del virus de la diarrea viral bovina, en muestras originales, mediante las técnicas de inmunofluorescencia directa y ELISA de captura, y en muestras del tercer pasaje en cultivo celular de cornete nasal bovino mediante la técnica de inmunoperoxidasa

Estatus	Antígeno Pestiviral			
	Muestras originales		Tercer pasaje CNB	
	N.º	%	N.º	%
Positivo	36	65.5	43	78.2
Sospechoso			3	5.5
Negativo	19	34.5	9	16.3
Total	55	100	55	100

Cuadro 3. Detección del ARN Pestiviral, procedente de muestras originales y del tercer pasaje en cornete nasal bovino, utilizando primers pan pestivirus, mediante la técnica de RT-PCR en Tiempo Real

Estatus	ARN Pestiviral			
	Muestras originales		Tercer pasaje CNB	
	N.º	%	N.º	%
Positivo	25	45.5	41	74.5
Negativo	30	54.5	14	25.5
Total	55	100	55	100

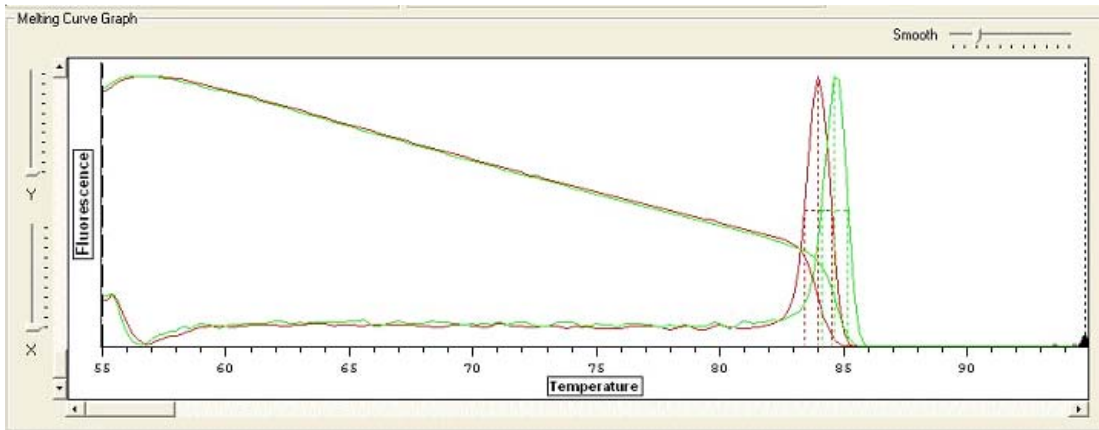


Figura 1. Gráfico de la curva de “melting” del RT-PCR en Tiempo Real, mostrando las temperaturas de disociación para los virus de la diarrea viral bovina-1 y 2 (VDVB-1 y VDVB-2)

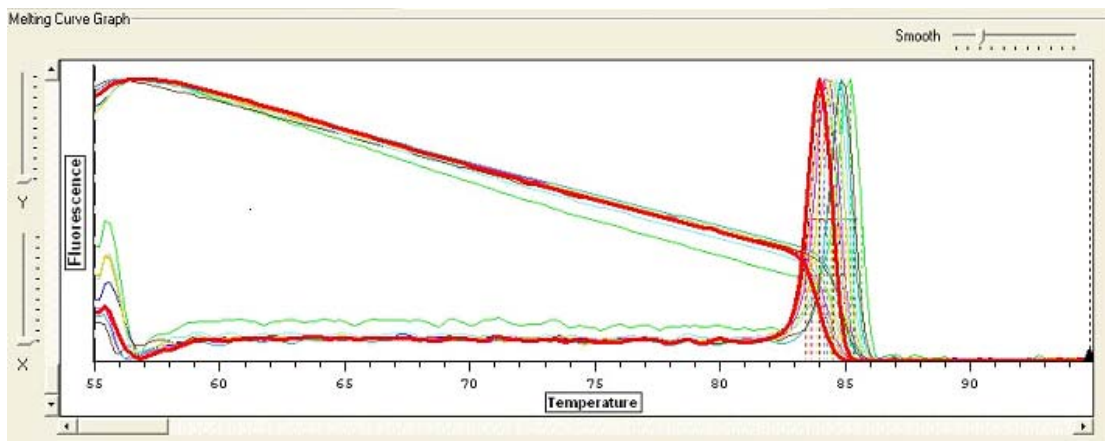
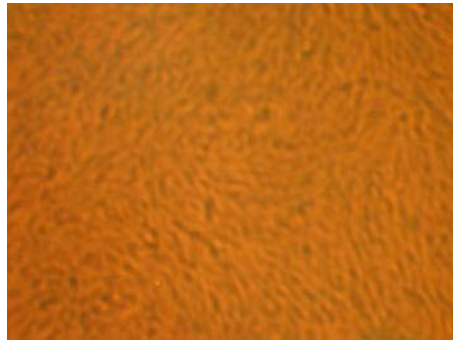


Figura 2. Gráfico de la curva de “melting” del RT-PCR en Tiempo Real, mostrando las temperaturas de disociación para el virus de la diarrea viral bovina-1 de referencia, y muestras positivas al genotipo 1

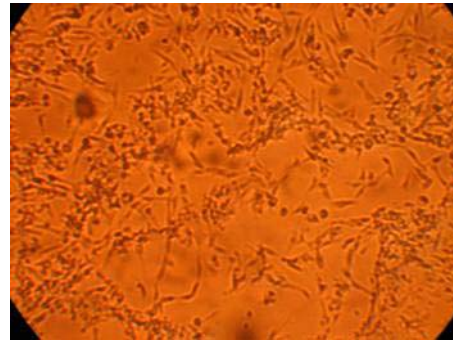
La genotipificación del VDVB usando el ARN extraído del tercer pasaje en cultivo celular de las muestras, determinada mediante RT-PCR en tiempo real, usando primers específicos para cada genotipo viral, indicó que 14 de las 55 muestras fueron positivas al genotipo VDVB-1 y ninguna al genotipo VDVB-2.

La Fig. 1 muestra las curvas de disociación para las cepas del VDVB de referencia, y genotipos 1 y 2 observándose temperaturas de disociación de 84 y 85 °C, respectivamente. Asimismo, en la Fig. 2, se compara los productos amplificados del VDVB-1 de referencia y de las cepas aisladas, usando primers específicos para el genotipo 1.

En relación al fenotipo viral de los aislados, el 85.4% (35/41) fue de cepas NCP y el 14.6% (6/41) fue CP (Figs. 3 y 4).

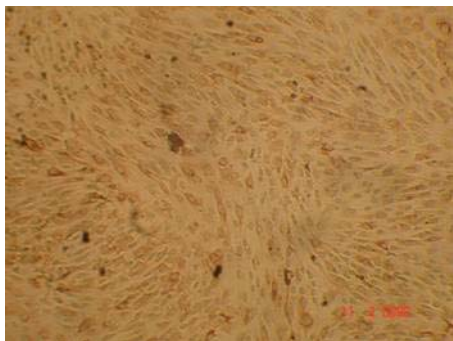


Cepa No Citopática (NCP)

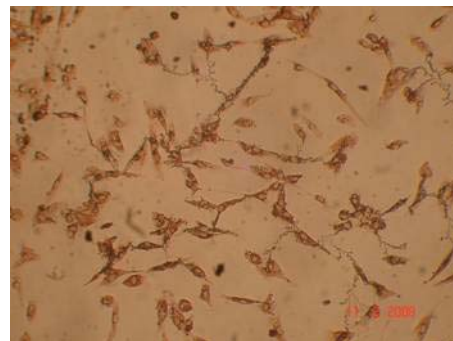


Cepa Citopática (CP)

Figura 3. Fenotipos del Virus de la Diarrea Viral Bovina, aislados y determinados en cultivos celulares de cornete nasal bovino. 40X



Cepa No Citopática (NCP)



Cepa Citopática (CP)

Figura 4. Fenotipos del Virus de la Diarrea Viral Bovina, aislados en cultivos celulares y detectados por la prueba de inmunoperoxidasa. 40X

DISCUSIÓN

Las diferencias a nivel molecular han permitido agrupar las cepas como genotipo 1 y 2 y en subgenotipos dentro de cada genotipo. Se sabe que las cepas del VDVB exhiben una amplia variación antigénica, que son citopáticas y no citopáticas. En el Perú, tal

clasificación no se había realizado, aunque en un análisis preliminar se ha reportado la presencia del genotipo 1b (Ståhl *et al.*, 2009).

En este estudio, el 65.5% (36/55) de muestras positivas y 34.5% sospechosas del VDVB, diagnosticadas mediante las pruebas de IF y ELISA de captura, representan cepas de campo aisladas de animales de diver-

Los lugares y situaciones climáticas del país, entre 1998-2007 (Cuadro 2). La utilización de las pruebas de IF o ELISA permite la identificación rápida y económica del VDVB. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de estas pruebas pueden ser influenciadas por factores como la gran diversidad antigénica viral, calidad de los reactivos utilizados, y tipo de muestras, entre otros, por lo que un resultado positivo confirma la presencia del antígeno viral, pero un resultado sospechoso o negativo no descarta definitivamente la presencia del mismo (Saliki y Dubovi, 2004; Mars y Van Maanen, 2005).

Una de las razones de inocular las 55 muestras en una línea celular secundaria de CNB libre de VDVB endógeno fue definir los resultados obtenidos directamente de los tejidos. Luego de tres pasajes sucesivos en las células de CNB, la identificación del antígeno pestiviral utilizando mAbs contra la proteína P125/NS23 (región muy conservada entre los pestivirus) evidenció un 78.2% (43/55) de muestras positivas a Pestivirus (Cuadro 2). La técnica de aislamiento del virus en cultivo celular, a pesar de los avances en técnicas de diagnóstico del VDVB, continúa siendo la técnica estándar de oro, sobre todo si se utilizan células de CNB y de testículo bovino, que son las más sensibles para aislar VDVB (Saliki y Dubovi, 2004).

El análisis molecular de un fragmento de la región 5' UTR del ARN extraído de las muestras originales indicó que solo el 45.5% (25/55) fueron positivas al VDVB, pero el análisis de esta misma región del ARN extraído de las muestras del tercer pasaje en CNB, mostró una positividad al VDVB de 74.5% (41/55), indicando que en el trabajo no solo se aisló ARN viral, sino también virus viable (Cuadro 3). El mayor porcentaje de positividad detectado en las muestras del tercer pasaje evidencia recuperación viral producto de la replicación en los sucesivos pasajes en CNB. El menor número de muestras originales positivas obtenido al analizar este fragmento podría deberse a la degradación del ARN viral, debido a factores como

tiempo de permanencia en el laboratorio (desde 1998) e inadecuada conservación de las muestras, sobre todo, durante los primeros años de colección (a -20 ó -30 °C). Las moléculas del ARN viral son más fácilmente degradadas por las RNasas presente en los tejidos comparados con las moléculas de ADN.

Todos los aislados positivos al VDVB pertenecieron al genotipo 1 y no se detectó alguno del genotipo 2, según las Curvas de Melting. El genotipo 1 es el más difundido en poblaciones bovinas de muchos países como EEUU (Vilcek *et al.*, 1999; Chul *et al.*, 2005), de donde el Perú importó bovinos sin restricción respecto al VDVB, sobre todo a fines de la década del 80.

Las cepas del VDVB-1 son conocidas como las cepas clásicas utilizadas en la elaboración de vacunas, en pruebas diagnósticas, y en investigación. Ejemplo de este genotipo son los virus NADL, Singer, C24V, entre otros, aislados en EEUU, pero distribuidos globalmente (Fulton *et al.*, 2005). En el Perú, el único tipo de vacuna utilizada para el control del VDVB es la vacuna a virus inactivado, por lo que sería poco probable que el virus de origen vacunal forme parte del ejambre viral en el país. En un estudio preliminar con pocas muestras se determinó la presencia del genotipo 1, subgenotipo 1b del VDVB en el Perú (Ståhl *et al.*, 2009); además, se conoce que el subgenotipo 1b es el más predominante en la población bovina mundial (Ridpath *et al.*, 1994, 2000; Fulton *et al.*, 2003, 2005).

La no detección del VDVB-2 puede deberse a una baja prevalencia o al bajo número de muestras de campo analizadas, comparado con el número de cepas analizadas en otros estudios donde se ha detectado ambos genotipos (Ridpath *et al.*, 1994; Sakoda *et al.*, 1999; Vilcek *et al.*, 1999; Flores *et al.*, 2000; Falcone *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2001; Tajima *et al.*, 2001; Chul *et al.*, 2005; Pizarro-Lucero *et al.*, 2006), aún cuando el VDVB-1 es más frecuentemente detectado en comparación al VDVB-2 (Chul *et al.*, 2005). El

VDVB-2 ha sido aislado de brotes agudos de DVB o síndrome hemorrágico en EEUU y Canadá a fines de la década del 80 (Corapi *et al.*, 1990; Pellerin *et al.*, 1994; Carman *et al.*, 1998). Sin embargo, no todas las cepas del VDVB-2 aisladas han sido asociadas con el síndrome hemorrágico, ya que fueron aisladas de terneros PI nacidos de vacas vacunadas con VDVB-1 (Ridpath *et al.*, 1994, 2000). Una de las razones de la ausencia o baja prevalencia del VDVB-2 en el país se debería a que la vacuna empleada es a virus inactivado y la vacunación no es una práctica común. No obstante, y si bien el VDVB-2 está presente en Norte América, también se ha detectado en países de América Latina como Brasil (Wageck *et al.*, 1998; Flores *et al.*, 2000), Argentina (Jones *et al.*, 2001) y Chile (Pizarro-Lucero *et al.*, 2006).

La diversidad genética del VDVB, también expresada como diversidad antigénica (Fulton *et al.*, 2003), tiene impacto en el control de la enfermedad a través del uso de vacunas, pues la mayoría de ellas emplea vacunas a virus vivo modificado o muerto, y tiene como antígeno al VDVB-1a y VDVB 2a. Se ha demostrado que anticuerpos dirigidos contra el VDVB-1b no neutralizan eficientemente al VDVB-1a (Ridpath, 2005). Las potenciales cepas del VDVB y su diversidad genética deben ser consideradas cuando se diseñan programas de control, tanto a nivel de hatos como a nivel nacional (Bolin y Grooms, 2004), por lo que las 41 cepas del VDVB-1 aisladas deben ser secuenciadas para conocer los subgenotipos presentes y establecer su distribución en las zonas de procedencia.

La técnica de RT-PCR en Tiempo Real cualitativo que es la característica del SYBR Green 2 step, ha sido establecido en el laboratorio para diagnóstico e investigación del VDVB en el país. Esta técnica amplifica el producto de PCR y lo detecta durante cada ciclo por la liberación de un colorante fluorescente, provee más información permitiendo una mejor estandarización de la técnica comparado con el PCR convencional, evita el consumo de reactivos para análisis poste-

riores al PCR, y disminuye los riesgos de contaminación post PCR (Wirz *et al.*, 1993). Las secuencias de nucleótidos en la región 5' UTR y en la región que codifica la proteína NS3, son las más conservadas de los pestivirus; por lo que la RT-PCR usando cebadores específicos para estas regiones ofrece una alta sensibilidad (Sandvik, 1999). Diversos estudios sugieren que la detección y el análisis filogenético de la región 5' UTR, es útil para una rápida caracterización de aislados de campo (Letellier *et al.*, 1999; Sakoda *et al.*, 1999). El desarrollo de la prueba de PCR en tiempo real ha permitido la rápida detección de otros pestivirus, tal como el VPPC (Risatti *et al.*, 2005); así como la genotipificación del VDVB en "pools" de muestras de sangre (Letellier y Kerkhofs, 2003).

El cultivo de las muestras en CNB permitió determinar el fenotipo viral, observándose que el 14.6 y 85.4% de las muestras positivas fueron citopáticas y no citopáticas, respectivamente (Figs. 3 y 4), similar a lo reportado en la literatura (Fulton *et al.*, 2000; Chul *et al.*, 2005). La presencia de animales PI y de cepas citopáticas en la población bovina del país sugiere la existencia de riesgos de la ocurrencia de la enfermedad de las mucosas (EM), que es una de las formas clínicas de la DVB de carácter fatal, no reportada aún en el país. Está bien documentado que el VDVB-NCP es la fuente para la aparición del VDVB-CP, como resultado de una mutación espontánea de virus NCP dentro de un animal PI (Brownlie, 1991; Meyers *et al.*, 1992; Bolin, 1995; Tautz *et al.*, 1998).

Los cultivos celulares utilizados durante el aislamiento viral fueron comprobados de ser libres del VDVB por diferentes pruebas convencionales y finalmente por pruebas moleculares como el RT-PCR en tiempo real, demostrando ser negativos al virus en el cornete nasal bovino y el suero fetal bovino, descartando la probabilidad de contaminación con las cepas analizadas durante el estudio por lo que todos los virus aislados en este estudio son cepas de campo genuinas al VDVB. Esta evaluación fue necesaria debido

a que el VDVB es un contaminante frecuente de productos biológicos derivados de bovinos, en particular, el suero fetal bovino comercial, componente de los medios de cultivos celulares (Saliki y Dubovi, 2004).

Hay una tendencia mundial para erradicar al VDVB, debido a que se conoce bien la patogénesis y las características biomoleculares de este virus; por tanto, los estudios epidemiológicos y la disponibilidad de herramientas diagnósticas modernas podrían servir de base para la elaboración de un programa nacional de control-erradicación del VDVB en el Perú, que al inicio podría ser de tipo voluntario como está ocurriendo actualmente en dos hatos en Arequipa.

CONCLUSIONES

- Se determinaron 41 cepas del VDVB de bovinos procedentes de diversos lugares del Perú.
- Se encontró los fenotipos virales no citopático (85.4%) y citopático (14.6%) entre las cepas de campo del VDVB aisladas.
- Todas las cepas de campo del VDVB fueron de genotipo 1.

Agradecimiento

El trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Superior de Investigaciones de la UNMSM. Los autores agradecen al Dr. Raúl Rosadio por sus valiosas sugerencias en la redacción del manuscrito.

LITERATURA CITADA

1. **Baker J. 1987.** Bovine viral diarrhoea virus: A review. *JAVMA* 190: 1449-1458.
2. **Becher P, Orlich M, Shannon A, Horner G, König M, Thiel H-J. 1997.** Phylogenetic analysis of pestivirus from domestic and wild animals. *J Gen Virol* 78: 1357-1366.
3. **Becher P, Avalos Ramirez R, Orlich M, Cedillo Rosales S, König M, Schweizer M, Stalder H, Schirrmeyer H, Thiel H-J. 2003.** Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* 311: 96-104.
4. **Bolin S. 1995.** The pathogenesis of mucosal disease. *Vet Clin N Am-Food A* 11(3): 489-500.
5. **Bolin S, Grooms D. 2004.** Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. *Vet Clin N Am-Food A* 20: 51-68.
6. **Brownlie J. 1991.** The pathways for bovine diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch Virol* 3: 79-96.
7. **Carman S, Van Dreumel T, Ridpath J, Hazlett M, Alves D, Dubovi E, Tremblay R, Bolin S, Godkin A, Anderson N. 1998.** Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario. *J Vet Diagn Invest* 10: 27-35.
8. **Chul B, Walz P, Kennedy G, Kapil S. 2005.** Byotype, genotype, and clinical presentation associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from cattle. *Inter J Appl Res Vet Med* 3: 319-326.
9. **Corapi WV, Elliott RD, Frech TW, Arthur DG, Bezek DM, Dubovi EJ. 1990.** Trombocitopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc* 196: 590-596.
10. **Falcone E, Cordioli P, Sala G, Tarantino M, Tollis M. 2001.** Genotyping of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle in Northern Italy. *Vet Res Commun* 25: 161-167.
11. **Flores E, Gil L, Botton S, Weiblen R, Ridpath J, Kreutz L, Pilati C, Driemeyer D, et al. 2000.** Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolates identified in Brazil. *Vet Microbiol* 77: 175-183.

12. **Fulton R, Purdy C, Confer A, Saliki J, Loan R, Briggs R, Burge L. 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.
13. **Fulton R, Ridpath J, Confer A, Saliki J, Burge L, Payton M. 2003.** Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologia* 31: 89-95.
14. **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.
15. **Houe H. 2003.** Economic impact of BVDV infection in diaries. *Biologia* 31: 137-143.
16. **Jones L, Zandomeni R, Weber L. 2001.** Genetic typing of bovine viral diarrhea virus isolates from Argentina. *Vet Microbiol* 81: 367-375.
17. **Letellier C, Kerkhofs P, Wellemans G, Vanopdenbosch E. 1999.** Detection and genotyping of bovine diarrhea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. *Vet Microbiol* 64: 155-167.
18. **Letellier C, Kerkhofs P. 2003.** Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus. *J Virol Meth* 114: 21-27.
19. **Mars M, Van Maanen C. 2005.** Diagnostic assays applied in BVDV control in the Netherlands. *Prev Vet Med* 72: 43-48.
20. **Meyers G, Tautz N, Stark R, Brownlie J, Dubovi E, Collet M, Thiel H-J. 1992.** Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* 191: 368-386.
21. **[MINAG] Ministerio de Agricultura, Perú. 1996.** Producción pecuaria e industria avícola. Presidencia de la República. Documento de consulta. Lima: MINAG.
22. **Paton JD. 1995.** Pestivirus diversity. *J Comp Path* 112: 215-236.
23. **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.
24. **Pizarro-Lucero J, Celedon M, Aguilera M, de Calisto A. 2006.** Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Vet Microbiol* 115: 208-217.
25. **Ridpath J, Bolin S, Dubovi E. 1994.** Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology* 205: 66-74.
26. **Ridpath J, Neill J, Frey M, Landgraf L. 2000.** Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbiol* 77: 145-155.
27. **Ridpath J. 2005.** Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Prev Vet Med* 72: 17-30.
28. **Risatti G, Holinka L, Lu Z, Kitish G, Callahan J, Nelson W, Brea Tió E, Borca M. 2005.** Diagnostic evaluation of a real time reverse transcriptase PCR Assay for detection of classical swine fever virus. *J Clin Microbiol* 43: 468-471.
29. **Rivera H, Manchego A, Sandoval N, Morales C, Flores E. 1994.** Complejo respiratorio bovino en terneros del Valle de Lima. *Rev Inv Pec, IVITA* 7(1): 35-38.
30. **Saliki J, Dubovi E. 2004.** Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet Clin N Am-Food A* 20: 69-83.
31. **Sakoda Y, Damrongmotonapakin S, Sato M, Ishikan E, Fukushu E. 1999.** Genetic heterogeneity of porcine and ruminant pestiviruses mainly isolated in Japan. *Vet Microbiol* 65: 75-86.
32. **Sandvik T. 1999.** Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet Microbiol* 64: 123-134.

33. **Ståhl K, Benito A, Felmer R, Zuñiga J, Reinhardt G, Rivera H, Baule C, Moreno-López J. 2009.** Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from Peru and Chile. *Pesq Vet Bras* 29(1): 41-44.
34. **Tajima M, Frey H, Yamato O, Maede Y, Moenning V, Scholz H, Greiser-Wilke I. 2001.** Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Res* 76: 31-42.
35. **Tautz N, Meyers G, Thiel H-J. 1998.** Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus. *Clin Diag Virol* 10: 121-127.
36. **Vilcek S, Drew T, McGoldrick A, Paton D. 1999.** Genetic typing of bovine pestiviruses from England and Wales. *Vet Microbiol* 69: 227-237.
37. **Vilcek S, Durkovic B, Kolesarova M, Paton DJ. 2005.** Genetic diversity of BVDV: Consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev Vet Med* 72: 31-35.
38. **Wageck C, Strasser M, Hertig Ch, Masuda A, Peterhans E. 1998.** Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and characterization of genomes of BVDV from Brasil. *Vet Microbiol* 63: 85-97.
39. **Wirz B, Tratschin JD, 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.
40. **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.