

DIARREA VÍRICA BOVINA: ETIOLOGÍA, FORMAS CLÍNICAS, DISTRIBUCIÓN DEL VIRUS Y PATOGENIA

M. PEDRERA¹, M.A. RISALDE¹, J.L. ROMERO-TREVEJO^{1,2}, A. DA SILVA ALEXANDRE¹, A. NÚÑEZ¹, E. RUIZ-VILLAMOR³, J.C. GÓMEZ-VILLAMANDOS¹, P.J. SÁNCHEZ CORDÓN¹

RESUMEN

El virus de la diarrea vírica bovina (vDVB) es un agente de distribución mundial y responsable de cuantiosas pérdidas económica a la cabaña bovina, estando clasificado dentro de la familia *Flaviviridae* junto a otros pestivirus como el virus de la peste porcina clásica, el virus de la enfermedad de la frontera de la oveja y el virus de la hepatitis C. Este virus se caracteriza por causar una amplia variedad de formas clínicas que van desde forma subagudas, que pasan desapercibidas, a formas caracterizadas por desarrollar una intensa leucopenia, trombocitopenia y hemorragias.

Acorde con sus diferencias antigénicas y genéticas, los aislados del virus se pueden clasificar en 2 genotipos o especies: vDVB tipo 1 y vDVB tipo 2. El primero causa enfermedad leve pero en vacas preñadas, las infecciones fetales pueden inducir abortos y otras patologías reproductivas. El vDVB tipo 2 está asociado principalmente a la enfermedad respiratoria severa y a un cuadro hemorrágico agudo, caracterizado por trombocitopenia, diarrea hemorrágica, epistaxis, petequias, equimosis en mucosas, anemia, sangrado en zonas de inyección, pirexia, leucopenia y muerte.

¹ Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Edificio Sanidad Animal, Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, España.

² Área de Hepatología y Terapia Génica, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra, 31008, Pamplona, España.

³ Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe, Camino del Jau s/n, 18320, Santa Fe, Granada. Académico Numerario de la Real de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental.

Independientemente del genotipo al que pertenezca, el vDVB puede ser clasificado en 2 biotipos acorde con su efecto sobre cultivos celulares: citopático (CP) y no citopático (NCP), siendo estos últimos los más comunes en la naturaleza. La infección del feto con cepas NCP entre los días 40 y 120 de la gestación, puede dar lugar al nacimiento de animales persistentemente infectados (PI). En estos animales el virus se distribuye ampliamente a través de todos los órganos, siendo el daño limitado, lo que permite que la gestación continúe. Estos animales están predispuestos a padecer infecciones secundarias, así como a desarrollar la denominada enfermedad de las mucosas cuando se infectan con cepas CP antigénicamente homólogas.

1. ETIOLOGÍA

La diarrea vírica bovina (DVB) es una enfermedad infectocontagiosa que induce graves patologías reproductivas, respiratorias y gastrointestinales en la ganadería bovina, causando graves pérdidas económicas (1,2,3,4). Fue descrita por primera vez en 1946 a la vez en Saskatchewan (Canadá) y en el estado de Nueva York (EEUU), siendo denominada con el nombre de «enfermedad X» (Childs, 1946) y «diarrea vírica» (5). Ya en la década de los 50, se describió en Iowa (EEUU) una forma especial de diarrea vírica, que se denominó enfermedad de las mucosas (6), que a diferencia de las formas anteriores, no podía ser reproducida experimentalmente. Posteriormente, se determinó que estaban producidas por el mismo agente, un virus del género *Pestivirus* (7), género que en los 90 se incluyó definitivamente dentro de la familia *Flaviviridae* (8).

La DVB se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, con una prevalencia del 73-100% de los rebaños y del 50-90% de los animales (1,3,9). Produce una amplia variedad de presentaciones clínicas que van desde formas subclínicas a procesos hemorrágicos que pueden llegar a causar la muerte de los animales. Además, el virus de la DVB (vDVB) induce un estado de inmunosupresión en los animales que predispone la aparición de infecciones secundarias (1,3). Los bovinos se presentan como los hospedadores naturales del virus, pero también puede infectar a otros artiodáctilos, como son las ovejas, cabras, rumiantes salvajes y el cerdo. Puede infectar al cerdo al igual que otros pestivirus, que afectan principalmente a la especie porcina, pueden infectar de forma cruzada a la especie bovina, induciendo en ambas especies respuestas inmunes cruzadas. El vDVB es capaz de replicar en cultivos primarios bovinos y en líneas celulares establecidas, siendo las más utilizadas las líneas BT (cornetes nasales bovinos), MDBK (riñón bovino) y PK-15 (riñón porcino) (10).

1.1. Taxonomía, morfología y estructura del virus de la DVB

El vDVB es un virus RNA clasificado dentro del género *Pestivirus* (familia *Flaviviridae*) que presenta una elevada homología con otros pestivirus como el virus de la peste porcina clásica (vPPC) y el virus de la enfermedad de la frontera (vEF) de la oveja (11, 12).

Al igual que otros flavivirus, el vDVB presenta una envuelta lipídica que deriva de la membrana de las células que infecta, con un pequeño tamaño que oscila entre los 40 y los 60 nm de diámetro. Esta envoltura esférica se encuentra rodeando una nucleocápside icosaédrica de 25-37 nm de diámetro (13,14). En su interior se encuentra el RNA, constituido por una cadena simple de sentido positivo de 2,9 a 4,4, x 10⁶ Da de tamaño (15,16) y 12.5 kb de longitud (17,18, 19). Esta cadena de RNA está constituida por un fragmento de lectura abierta (ORF, *open reading frame*) flanqueado en los extremos 3' y 5' por regiones no traducidas (UTR, *untranslated region*), mostrándose el extremo 5'UTR como la región más conservada en los pestivirus (18). El extremo 5' del ORF codifica las **proteínas estructurales** (P14/C, Gp48/E^{rns}, Gp33/E1, Gp53/E2), siendo la región menos conservada del genoma de los pestivirus la que codifica la proteína estructural E2, mientras que las **no estructurales** (P20/N^{pro}, P125/NS23) están codificadas en el extremo 3' restante (20). El genoma de los virus pertenecientes al género *Pestivirus* codifica dos proteínas únicas que no codifican otros miembros de la familia *Flaviviridae*, como son la proteína no estructural P20/N^{pro} y la proteína estructural Gp48/E^{rns} (12).

1.2. Genotipos y biotipos del VDVB

Los virus RNA, entre los que se incluye el vDVB, se caracterizan por su variabilidad genética y antigénica (21,22), dando lugar a un amplio espectro de manifestaciones clínicas y lesiones, que dificultan el diagnóstico de la enfermedad y limitan la protección de las vacunas monovalentes (23). Estos virus destacan por su plasticidad, debida a la falta de una exonucleasa eficiente para corregir las bases mal incorporadas, originando de esta manera cepas mutantes que escapan a la respuesta inmunológica del hospedador (24). Otra posible causa de la variabilidad es la oportunidad para la mutación que ofrecen los prolongados períodos de replicación en animales persistentemente infectados. Sin embargo, esto no parece suceder con el vDVB, donde estos animales son más importantes como reservorios, mientras que los animales que sufren una infección aguda pueden jugar un papel más destacado en la generación de nuevas variantes antigénicas (23,25).

Los biotipos hacen referencia a diferencias fenotípicas, mientras que los genotipos reflejan diferencias en el genoma. Así, el vDVB se ha dividido tradicionalmente en 2 genotipos: vDVB tipo 1 y vDVB tipo 2 (26). Más recientemente los genotipos han pasado a ser reconocidos como especies distintas (27,28). Inicialmente esta clasificación se realizaba en función de la similitud en la secuencia de la región 5'UTR, para posteriormente basarse en las diferencias que presentaban ambos genotipos en distintas partes del genoma (29).

El vDVB tipo 1 incluye los aislados predominantes en las explotaciones, siendo responsables de procesos leves con sintomatología inaparente, caracterizados por un ligero aumento de la temperatura corporal y la presencia de lesiones moderadas restringidas al aparato digestivo y a órganos del sistema linfoide. Asimismo, en vacas gestantes este genotipo puede inducir abortos y otras patologías reproductivas. Los aislados de tipo 1 se emplean con frecuencia en el desarrollo de vacunas y métodos de diagnóstico, siendo los más usados en investigación (26,30).

Los aislados del vDVB tipo 2 están asociados con enfermedades agudas severas (31,32,33,34,35,36,37), caracterizadas en ocasiones por presentar un cuadro hemorrágico agudo, conocido como síndrome hemorrágico, que causa la muerte de los animales (31,38). En estos procesos no se ven involucrados aislados de vDVB tipo 1. Sin embargo, sólo una minoría de las cepas del vDVB tipo 2 causa enfermedad aguda severa, no siendo en general más virulentas que las de tipo 1 (39). La diferencia en la virulencia y en los mecanismos patogénicos de ambas especies permanecen aún sin aclarar (40).

La escasez de diferencias antigénicas no ha permitido establecer la serotipificación del vDVB (23). Recientemente, se han podido tipificar genéticamente aislados de ambos tipos, dividiéndose así en subgrupos o subgenotipos, dando lugar a 11 subgenotipos para el vDVB tipo 1 (1a,1b,1c,1d,1e,1f,1g,1h,1i,1j,1k) y 2 para el vDVB tipo 2 (1a,1b) (41,42).

Independientemente del genotipo al que pertenezca y en función del efecto que producen sobre ciertos cultivos celulares, el vDVB puede ser clasificado en 2 biotipos: citopático (CP) y no citopático (NCP), siendo el biotipo NCP el más frecuente en la naturaleza (11). Los biotipos CP, aislados únicamente de animales con enfermedad de las mucosas, provocan efecto citopático sobre cultivos de células epiteliales bovinas, lo que se traduce en vacuolización citoplasmática y muerte celular (23). Sin embargo, los biotipos NCP se replican en las células sin provocar cambios morfológicos evidentes en estos cultivos, lo que no descarta que los biotipos NCP no sean patogénicos. Recientemente se ha sugerido la existencia de un tercer biotipo

linfocitopático que no causa muerte celular en cultivos de células epiteliales pero sí en cultivos de células linfoides (43).

El biotipo NCP es el único con capacidad de atravesar la placenta e infectar al feto, pudiendo dar lugar al nacimiento de animales persistentemente infectados (44), los cuales juegan un papel crucial en la epidemiología de la enfermedad. El biotipo CP en cambio, es incapaz de establecer infecciones persistentes (45). Sin embargo, cuando infecta a individuos que han sufrido una infección intrauterina previa por una cepa NCP antigénicamente homóloga, puede dar lugar al desarrollo de una forma letal de la DVB conocida como enfermedad de las mucosas.

2. EPIDEMIOLOGÍA

La especie bovina se muestra como el principal reservorio y fuente de infección del vDVB, tanto para esta especie como para animales de la especie ovina, caprina y porcina. Se ha demostrado que las ovejas también pueden ser transmisoras del vDVB por contacto estrecho con otras ovejas o con bovinos, existiendo otras especies de rumiantes exóticos como camellos, llamas o alpacas las cuales, pese al aislamiento del virus, no parecen jugar un papel importante en la diseminación del mismo (46,47,48).

El papel de los animales persistentemente infectados (PI) en la epidemiología de la enfermedad es fundamental, ya que la presencia de uno de estos animales podría desencadenar la infección en la mayoría de los animales con los que tiene contacto, siendo capaces de infectar en 3-4 meses al 90% de los animales con los que conviven (49,50). La prevalencia de la DVB en explotaciones con animales PI fue del 89%, frente al 51,7% en explotaciones libres de éstos. Sin embargo, debido a la alta mortalidad de los animales PI, el porcentaje de animales vivos en estudios de campo no supera el 2% (51). Los animales PI eliminarán durante toda su vida grandes cantidades de virus a través de secreciones nasales, saliva, orina, heces, lágrimas, semen y leche (49,52).

Los animales virémicos transitorios son animales que, tras una infección aguda, también pueden eliminar virus durante un corto periodo de tiempo (4-10 días), aunque la cantidad de virus eliminada y por lo tanto, la eficacia de la transmisión será inferior que la que muestran los individuos inmunotolerantes (53,54,55).

El vDVB puede transmitirse de forma vertical u horizontal. Dentro de las formas de transmisión vertical al feto destacan las hembras infectadas que transmiten el

virus a su descendencia durante el periodo gestacional (54,56). Si el feto es infectado por biotipos NCP antes de adquirir competencia inmunológica (alrededor de los 125 días de gestación), desarrollará una infección persistente (57). La transmisión de forma horizontal directa se basa en el contacto estrecho entre animales PI o animales durante la fase aguda de la enfermedad y animales sanos (49,54,58,59). Sin embargo, en la transmisión horizontal indirecta la diseminación del virus se realiza a través de fómites, pastos comunes, fluidos de transferencia embrionaria, semen infectado o incluso mediante vacunas (60,61), siendo menos frecuente la transmisión por artrópodos (55,62).

3. INFECCIÓN EN ANIMALES INMUNOCOMPETENTES

La biología del vDVB es muy compleja, lo que da lugar a una gran variedad de manifestaciones clínicas en los animales infectados que dependerá de factores como el genotipo y el biotipo del vDVB que produce la infección, el estado inmunitario tanto del rebaño como del animal, de la edad, así como de la situación inmunitaria de las madres y de la edad gestacional de éstas.

En animales adultos, muchas de las infecciones agudas que producen ambos genotipos dan como resultado una enfermedad leve e inaparente, siendo esta la forma más común de DVB. La infección aguda con una sintomatología clínica característica se describe como diarrea vírica bovina, la cual está generalmente producida por cepas de genotipo 1 y algunas cepas de baja virulencia del genotipo 2, afectando a animales de todas las edades, aunque suele darse con mayor frecuencia en terneros de 6-24 meses de edad, seronegativos e inmunocompetentes. En estos procesos es posible la obtención de aislados de ambos biotipos siendo, sin embargo, más frecuentes los biotipos NCP. Estos procesos cursan con una morbilidad generalmente alta y una mortalidad muy baja o nula (32).

Se ha estimado que el 70-90% de las infecciones agudas del vDVB en terneros inmunocompetentes cursan de forma subclínica (11,63). En estos animales, dichas infecciones pasan desapercibidas en la mayoría de las ocasiones, mostrando como únicos síntomas una ligera elevación de la temperatura corporal, disminución del recuento leucocitario e inmunosupresión (11,32,63,64,65). Esta inmunosupresión favorece la aparición de agentes infecciosos oportunistas (66), destacando aquellos que provocan enfermedades respiratorias bovinas (67,68), dependiendo los signos clínicos de la naturaleza de la infección secundaria, por lo que casi nunca son reconocidos como procesos inducidos por el vDVB (11,63,69). En estos casos se observa anorexia,

letargia, salivación, descarga oculo-nasal, tos y ligera diarrea. Además, es frecuente observar una disminución en la producción de leche. Ocasionalmente pueden apreciarse lesiones como erosiones y ulceraciones de la mucosa oral y digestiva (32,70,71,72). Estos animales desarrollan anticuerpos neutralizantes entre los 14 y 28 días postinfección, los cuales les protegen de por vida frente a reinfecciones con cepas homólogas (32,35). Cuando fracasa la transferencia pasiva de anticuerpos, el virus participa en el complejo diarrea neonatal de los terneros, infecciones concurrentes con enteropatógenos, que cursa con una clínica más acusada debido al efecto inmunosupresor del vDVB.

Existe una forma aguda grave de DVB que fue descrita en Europa por primera vez en 1992 en bovinos adultos del Reino Unido (73,74), observándose casos similares en otros países como Canadá (33), EEUU (75) y Brasil (76). Esta forma, con elevada morbilidad y mortalidad, está causada por cepas NCP del vDVB tipo 2 de elevada virulencia, afectando a animales de todas las edades (31,32,33,34,35,36,37,38). La sintomatología se caracteriza por una fiebre alta (39,7 a 41°C), agalaxia, diarrea acuosa y alteraciones respiratorias, produciéndose a menudo la muerte del animal a las 48 horas del comienzo. Estos animales presentan una reducción del 50% de los linfocitos circulantes y una marcada trombocitopenia junto a lesiones neumónicas, ulceraciones en la mucosa oral y depleción de los órganos linfoides (33,35,63,73,74). En algunos casos, este proceso evoluciona hacia una forma más grave denominada síndrome hemorrágico (31,38).

El síndrome hemorrágico constituye una forma clínica muy grave, causada por cepas NCP del vDVB tipo 2, con una mortalidad cercana al 25% (11,30,39). Los animales que sufren esta forma muestran pirexia, diarrea sanguinolenta, congestión en conjuntiva y mucosas, hemorragias petequiales y equimosis en mucosas, llegando a producirse sangrado en los sitios de inyección. Además, este síndrome se caracteriza por presentar una marcada trombocitopenia, leucopenia y neutropenia (11,77). Entre las lesiones más características destaca una importante depleción de los órganos linfoides, incremento de la apoptosis de linfocitos, vacuolización de células del epitelio basal de la mucosa y vasculitis en diversos órganos (38,78,79).

El vDVB puede además dar lugar a trastornos reproductivos, ya que puede ser eliminado por el semen tanto de los animales PI (80,81) como de los animales inmunocompetentes que sufren una infección aguda, dando lugar a infecciones venéreas (82,83) que provocan en los machos un descenso de la fertilidad y una disminución de las tasas de concepción (80,84). En ocasiones estos trastornos reproductivos son los únicos síntomas que se observan en una explotación infectada (84). En el caso

de la hembra, todos los órganos del sistema reproductivo son permisivos al vDVB, siendo el ovario una de las estructuras más afectadas, pudiéndose alterar la función ovárica e impidiendo una dinámica folicular normal, lo que induce un estado de infertilidad temporal (85,86).

4. INFECCIONES CONGÉNITAS

En las infecciones congénitas, la complejidad y gravedad de las lesiones ocasionadas en el feto dependen en gran medida del momento de la infección. Normalmente, las infecciones tempranas parecen provocar menos daños que las tardías, indicando la existencia de una patogenia inmuno-mediada. En la infección transplacentaria pueden verse involucrados ambos genotipos del virus, aunque solamente el biotipo NCP puede causar infección fetal (87).

Cuando la infección ocurre antes de los 60 días de gestación, puede dar lugar a muerte fetal con **momificaciones o abortos** que se traducen en repeticiones a celo. Estos abortos se producen desde los 10 días post-infección hasta incluso tres meses después de la llegada del virus (88). Normalmente, el porcentaje de abortos es bajo y éstos sólo se presentan en rebaños que no han estado antes en contacto con el virus y, por tanto, no poseen ningún tipo de inmunidad (89,90,91).

Cuando una hembra gestante seronegativa se infecta con una cepa NCP del virus entre los 50-120 días de gestación, la consecuencia puede ser el establecimiento de un estado de **inmunotolerancia** al virus por parte del feto y el nacimiento de un animal persistentemente infectado. El sistema inmunitario del animal no está desarrollado aún y, por lo tanto, no reconoce los antígenos del vDVB como extraños. Estos animales eliminarán virus por todas sus excreciones y secreciones durante toda su vida, convirtiéndose en la principal fuente de virus dentro del rebaño (11,92,93,94,95). En este tipo de procesos también se puede producir muerte fetal con momificación o abortos y, en ocasiones, alteraciones teratógenas.

Los animales PI presentan grandes cantidades de virus en todos sus tejidos, aunque éste manifiesta un especial tropismo por las células epiteliales, linfoides y del sistema nervioso central (96,97,98,99,100), lo que unido a la ausencia del desarrollo del sistema inmunológico en el momento de la infección, la depleción de los linfocitos B y T (101) y la inhibición del interferón alfa por cepas NCP (102), favorece el establecimiento de un estado de inmunotolerancia que permite la persistencia del virus en el feto.

En estos animales existe ausencia de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes (103), pero son inmunocompetentes ya que responden frente a antígenos de virus heterólogos (66,104). La mortalidad de estos animales es muy superior a la de individuos no infectados, ya que alrededor del 50% mueren en el primer año de vida (105) debido a sus defectos funcionales en el sistema inmune que inducen un estado de inmunosupresión y a una mayor predisposición frente a infecciones secundarias (95,106). Las lesiones que presentan estos animales son escasas y leves, no pudiéndose establecer una relación directa entre dichas lesiones y la presencia del virus (100). Sin embargo, en algunos casos podemos observar microscópicamente lesiones crónicas en piel y mucosas (107).

Entre los 100-150 días de gestación, coincidiendo con el comienzo de la inmunocompetencia fetal y la organogénesis, aparecen las **malformaciones congénitas**, siendo menos frecuentes los abortos. El biotipo NCP del vDVB demuestra en estos momentos un especial tropismo por las células con actividad mitótica activa, destacando las células de tejidos linforreticulares, piel, pulmón, ojos o sistema nervioso central (88,108), provocando daño celular directo o siendo destruidas las células infectadas por el propio sistema inmune. Así pues, podemos encontrar malformaciones características como la hipoplasia tímica, hipoplasia y necrosis pulmonar, alopecia, hipotricosis, artrogriposis, retraso en el crecimiento y otras anomalías esqueléticas (109) y oculares (107,110), presentando graves malformaciones a nivel del sistema nervioso, como son microcefalia, hidrocefalia e hipoplasia cerebelosa (107).

Otra consecuencia de la infección congénita es el nacimiento de **terneros seropositivos**, que se produce cuando la infección tiene lugar a partir de los 150 días de gestación. Se trata de terneros inmunocompetentes que nacen por lo general sin problemas, aunque presentando anticuerpos específicos contra el vDVB. En algunos casos, se produce el nacimiento de terneros débiles de bajo peso y poco viables, que suelen morir pocos días después del nacimiento (111).

5. ENFERMEDAD DE LAS MUCOSAS (EM)

Fue descrita por primera vez en 1953 por Ramsey y Chivers (6), observándose poco después que el virus que la provocaba era idéntico al de la DVB (112). Esta enfermedad afecta solamente a los animales PI que sufren una superinfección poco después del nacimiento, generalmente entre los 6 y 18 meses de edad, por un biotipo CP homólogo antigénicamente al biotipo NCP que produjo la inmunotolerancia (20,69,95). Existen evidencias de que el biotipo CP del vDVB se puede originar a

partir del NCP, generándose bien por la división proteolítica de la proteína NS23 (7), por duplicación genética de la proteína NS3 alterada (113), por delección genética de la proteína NS2 (114), o por mutación (115). Sin embargo, otros trabajos demuestran que el biotipo CP se puede generar por recombinación a partir de cepas NCP en animales PI, dando lugar a la aparición espontánea de la enfermedad de las mucosas, sin necesidad de que ocurra infección exógena (23,116). Además, se ha comprobado que una cepa CP homóloga antigénicamente, no necesariamente da lugar a la EM, sino que este hecho también depende de otros factores inmunológicos como el número de linfocitos T gamma/delta ($\tilde{\alpha}/\tilde{\alpha}$) circulantes que durante los primeros meses de vida parecen proteger a los animales PI de padecer la EM (117).

La EM es una forma esporádica, fatal, de curso agudo o crónico, que presenta una sintomatología clínica caracterizada por la aparición de diarreas sanguinolentas, erosiones mucocutáneas y muerte a las 2 o 3 semanas de aparecer los signos clínicos. Microscópicamente los animales presentan enteritis fibrinosa, erosiones, ulceraciones y hemorragias en las superficies mucosas de la cavidad oral, esófago, prestómagos, abomaso e intestino. Los animales muestran además depleción de los tejidos linfoides, especialmente intensa en el tejido linfoide asociado a mucosa, que induce un estado de inmunosupresión (11,44,118,119,120). Esta depleción es consecuencia de la apoptosis de los linfocitos (121), principalmente de los linfocitos B IgM+ en los folículos linfoides (122). En fases tempranas de la EM, los folículos linfoides se caracterizan por presentar áreas con bajos niveles de proliferación y alto grado de apoptosis, la cual se ve muy reducida en fases avanzadas (123,124).

6. CÉLULAS BLANCO Y DISTRIBUCIÓN DEL vDVB

Los pestivirus, entre los que se incluye el vDVB, inician la infección de las células susceptibles mediante una endocitosis mediada por receptores, comenzando con la adhesión y posterior penetración en la célula por un mecanismo en el que interviene la glucoproteína E2 (125). Una vez en el interior de la célula, el virus libera su RNA al citoplasma produciéndose la replicación del genoma vírico (126). El ensamblaje tiene lugar tanto en el aparato de Golgi como en el retículo endoplásmico, donde los viriones adquieren su envoltura lipídica, alcanzando el medio extracelular mediante exocitosis a las 10 horas post-infección (27,19).

La infección y replicación del virus, especialmente las cepas CP, puede inducir un efecto citopático en las células infectadas, efecto contrastado tanto en células procedentes de animales infectados como en cultivos celulares. Este efecto parece que

está asociado al estrés que provoca la acumulación de la proteína vírica NS3 sobre el retículo endoplásmico liso (127), lo que induciría una proliferación de las membranas lisas y la formación de vacuolas y lisosomas, confiriendo propiedades fagocíticas anormales a las células (128). Esta vacuolización del citoplasma ha sido observada de forma manifiesta y temprana en células epiteliales de las criptas intestinales de animales infectados y en células de los cultivos de riñón y testículo bovinos. Por el contrario, en células de los tejidos linfoides las vesículas fueron escasas y de pequeño tamaño (129,130). Por ello, se considera que el grado de vesiculación celular podría asociarse con el grado de permisividad frente a la infección de los diferentes tipos celulares (128). Esta vacuolización es diferente morfológicamente de la apoptosis, la cual parece producirse en estadios tardíos de la infección. Así, estudios recientes que emplearon inhibidores de las caspasas, demostraron que se trata de procesos separados, ya que estos inhibidores no previenen el efecto citopático, demostrando además que las caspasas juegan un importante papel en el desarrollo de la apoptosis, aunque no exclusivo (128,131,132).

Trabajos recientes *in vitro* han demostrado que ambos biotipos replican de igual forma en las células de los cultivos, aunque sólo las cepas CP producen vacuolización, lo que implica que este efecto es irrelevante en la replicación del virus (128). Además, aunque las cepas NCP aparentemente no inducen efecto citopático, son capaces de bloquear el efecto de las cepas CP sobre las células de los cultivos donde aparecen ambos biotipos (132,133).

Independientemente de la virulencia de la cepa, la principal ruta de infección postnatal del vDVB es la oronasal, constituyendo la mucosa nasal y la tonsila los primeros órganos de replicación del virus (118). El virus se disemina desde la cavidad nasal a los nódulos linfáticos regionales a través de los vasos linfáticos y sanguíneos y, posteriormente, al resto del organismo de forma libre o asociado a linfocitos y monocitos-macrófagos (69,134), alcanzándose los títulos más elevados en órganos linfoides e intestino (134,135).

Los aislados del virus muestran diferencias en cuanto al tropismo por diferentes tejidos (25), lo cual puede deberse a la considerable diversidad genética y antigénica existente entre ellos, destacando su especial tropismo por el tejido linfoide del tracto intestinal, el cual sufre una importante depleción. Así, el vDVB posee predilección por las células del sistema inmune, donde las principales células afectadas *in vivo* son los linfocitos (T y B), y las células presentadoras de antígeno (CPA) (117). De estas últimas, las células dendríticas y los macrófagos se presentan como las principales células blanco del vDVB (121,122). La localización preferencial del antígeno en célu-

las dendríticas y células del sistema mononuclear fagocítico se consideró que podría deberse a la retención por parte de estas células de elementos específicos del virus no relacionados con la replicación, lo que explicaría la ausencia de vesículas citoplasmáticas en estas células. Sin embargo, estudios ultraestructurales e inmunohistoquímicos más recientes han demostrado la infección de monocitos, linfocitos B y T y células dendríticas (79,100,121,130,135,136). Otras células que sufren la infección del virus en menor medida son las células endoteliales, las células epiteliales, los queratinocitos, los megacariocitos, los neutrófilos y las plaquetas (37,79,98,100,122,135,137). Las lesiones erosivas o ulcerativas encontradas a lo largo del tracto digestivo se asocian con la presencia de antígeno vírico, situación que podría inducir a una necrosis del epitelio del tracto digestivo superior y de las criptas intestinales (37,38,70,78,93).

En estudios realizados tras la inoculación con **cepas NCP de baja virulencia** tanto de genotipo 1 como del genotipo 2 en animales sanos, el antígeno vírico se encontró en folículos linfoides de tonsila, nódulos linfáticos y tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal desde los 3 días post-inoculación y, posteriormente, en bazo y corteza tímica, donde se localizó asociado a linfocitos B y células dendríticas. La mayor cantidad de antígeno vírico y su más amplia distribución se detectó 6 días después de la infección, tras lo cual se produjo una rápida eliminación del virus que condujo a su desaparición de la mayoría de los órganos estudiados (32,40,70,79,100,135).

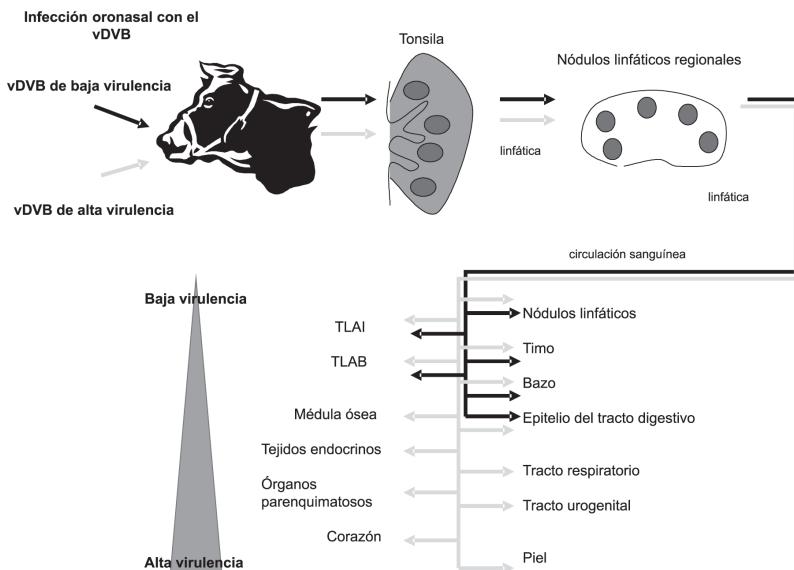


Figura. Diseminación de vDVB de baja y de alta virulencia en infecciones agudas

En inoculaciones experimentales con **cepas NCP de alta virulencia**, se observó que la cantidad y la diseminación de antígeno vírico en los tejidos, excedió de la producida por las cepas de baja virulencia. La presencia de antígeno en los procesos causados por estas cepas no se restringe a los folículos de los tejidos linfoides, sino que se extiende también al tracto digestivo, respiratorio, tejidos endocrinos y médula ósea (37,40,79,134). El antígeno se presenta inicialmente en el intersticio o la pared vascular para localizarse posteriormente en células parenquimatosas, lo que apunta hacia una diseminación hematógena (38,78,93). Su presencia en las células mieloides y en los megacariocitos se correlaciona con un descenso en el número de plaquetas (37,79).

7. MECANISMOS PATOGENICOS DEL vDVB

La mayoría de las cepas virulentas pertenecen al genotipo 2, no estando esta virulencia relacionada con el biotipo. No obstante existen diferencias, ya que las cepas NCP se diseminan más ampliamente en el hospedador que sus homólogas CP (71), y ambos biotipos difieren en el modo de activar el sistema inmune del animal (138). Por otro lado, el efecto citopático que causa el virus sobre los cultivos celulares no se corresponde con la virulencia de las infecciones agudas. Estos mecanismos patogénicos del virus aún no han sido aclarados, existiendo discrepancias en cuanto a si la acción directa del virus puede ser o no la responsable de las lesiones aparecidas en distintas localizaciones.

7.1. Leucopenia e inmunosupresión

Durante la DVB se produce un descenso en el número de linfocitos del 50% en infecciones con cepas de baja virulencia y del 90% en las de alta virulencia (35,38,78,79,100,135, 139). Esta linfopenia se correlaciona con la infección y las lesiones presentes en los tejidos linfoides, aunque no se ha demostrado si las lesiones son inducidas directamente por el virus o si la respuesta inmune también contribuye a su desarrollo (37,38,70,78,100). La depleción de los órganos linfoides está provocada tanto por cepas de baja como de alta virulencia, pero en las infecciones con cepas de baja virulencia se llega a producir una recuperación a partir de los 9 días post-inoculación (79,135), recuperación que no ha sido observada en las infecciones con cepas de alta virulencia (79).

El descenso en el número de leucocitos en sangre puede deberse a la migración de estas células a los tejidos, a una reducción en la leucogénesis o a un incremento en

la destrucción de los mismos. En infecciones con cepas de alta virulencia, la apoptosis se presenta como la responsable de la leucopenia y de la depleción de los órganos linfoides (43). La glucoproteína E^{rns} del vDVB podría desempeñar un papel importante, inhibiendo la proliferación linfocitaria y la síntesis de proteínas mediante la inducción selectiva de apoptosis en linfocitos (140). Sin embargo, otros estudios sostienen que esta apoptosis se produce posteriormente a la eliminación del antígeno vírico (25,70,100,117,135), sugiriendo que dicho proceso de muerte celular estaría mediado por los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (135,141,142). También se ha señalado la existencia de un mecanismo indirecto en el que los monocitos/macrófagos infectados podrían jugar un papel determinante en la apoptosis de los linfocitos T (72). La habilidad de las cepas CP de provocar la apoptosis in vitro de macrófagos y células epiteliales a través de la liberación de factores solubles por macrófagos infectados (143,144), contribuiría a las graves lesiones observadas en la EM (72). Otros estudios in vitro apuntan la posibilidad de que sólo las cepas NCP de alta virulencia inducen la producción por parte de los macrófagos de factores que provocan apoptosis (145), hecho considerado como responsable principal de la destrucción del tejido linfoide, descartando el efecto directo de la replicación del virus (37,38,79).

El vDVB es considerado como el principal factor predisponente para la aparición de procesos respiratorios en bovinos, estando asociado a otros agentes infecciosos como el herpesvirus bovino de tipo 1, el virus parainfluenza-3, el coronavirus respiratorio bovino, el virus sincitial respiratorio bovino, *Mannheimia hemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* y *Hemophilus somnus* (95,146,147,148,149). Los mecanismos por los cuales el vDVB favorece la aparición de otros agentes patógenos no se conoce con exactitud, existiendo una reducida respuesta de anticuerpos frente a antígenos extraños y vacunas, así como cambios en las subpoblaciones de linfocitos y en la respuesta de citoquinas (95). La alteración de la respuesta inmune no específica es considerada como la principal contribución del vDVB a las infecciones del tracto respiratorio (67,150), observándose en los pulmones de terneros inoculados con el vDVB la aparición de focos de bronconeumonía aguda purulenta no asociados con la distribución del antígeno vírico en este órgano (37,151).

La infección de los macrófagos alveolares pulmonares (MAPs) por el vDVB puede conducir a defectos funcionales en estas células, destacando un descenso en la expresión del receptor Fc y C3 del complemento necesarios para su actividad fagocítica, disminuyendo su actividad microbicida y liberando factores quimiotácticos (137,152,153,154,155). El vDVB reduce la habilidad de los macrófagos de producir factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , *tumor necrosis factor alpha*) en respuesta a deter-

minados agentes patógenos, en la que pueden estar involucrados otras citoquinas como la interleuquina (IL)-10 y el factor de transformación y crecimiento beta (TGF β , *transforming growth factor beta*) (153). También contribuye a la colonización de bacterias el hecho de que la infección de los MAPs incrementa la formación de fibrina frente a los lipopolisacáridos (LPS) (156). Además, se produce un descenso del anión superóxido y un aumento de la síntesis de óxido nítrico en respuesta a LPS (66,143,157), una estimulación de la síntesis de prostaglandina E2 (152,158) y la inducción de inhibidores de la IL-1 (159), contribuyendo todo ello a potenciar el estado de inmunosupresión.

7.2. TROMBOCITOPENIA Y CAMBIOS VASCULARES

En las infecciones con cepas de alta virulencia del vDVB se produce regularmente una marcada trombocitopenia (25,25,37,38,78,79). Existen varios factores que pueden contribuir a ello, destacando la necrosis de los megacariocitos, un descenso en la producción de plaquetas por los megacariocitos, el incremento del consumo de las plaquetas en sangre y defectos funcionales de las mismas (31,40,77,160). Esta trombocitopenia se relaciona directamente con la infección de las células de la médula ósea, que puede afectar a todos los elementos celulares incluidos los megacariocitos (37,38,70,71,160). Por el contrario, en las infecciones con cepas de baja virulencia no se observa ni la infección de los megacariocitos de la médula ósea ni la existencia de trombocitopenia, siendo la distribución del antígeno vírico más limitada (79,100,135).

Las cepas de alta virulencia, pertenecientes generalmente al genotipo 2 del virus, producen hemorragias petequiales en el tracto digestivo que no siempre están relacionadas con la presencia de erosiones o ulceraciones. En estas zonas, la presencia del antígeno vírico en las células del epitelio basal de la mucosa provoca su vacuolización y con ello la separación entre células, lo que podría originar las hemorragias (38). También se ha descrito la existencia de vasculitis junto a la presencia de antígeno vírico en las células endoteliales, lesión que podría estar causada por el depósito de inmunocomplejos en las paredes de los vasos debido a los elevados títulos de anticuerpos (44,161). También destaca la presencia de áreas de necrosis fibrinosa y de un importante infiltrado linfoplasmocitario perivascular que podría ser el origen del mal estado que caracteriza a estos animales (79,100,118). Asimismo, en infecciones con cepas de baja virulencia del genotipo 1 del vDVB, se ha observado la presencia de un infiltrado periarterial constituido por monocitos/macrófagos (32).

BIBLIOGRAFÍA

1. Baker JC (1987). Bovine viral diarrhoea virus. *Journal of American Veterinary Medical Association* 190:1449-58.
2. Corrales JC, Sanjuán ML, García C (2001). Epidemiología e importancia económica de la diarrea vírica bovina. *Patología Infecciosa y Epizootiología*. Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela. Ciencias Veterinarias.
3. Greiser-Wilke I, Grummer B, Moenning V (2003). Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals* 31: 113-8.
4. Vega S, Prden JA, García A, Pérez T, Ruíz-Santa-Quintería J, De la fuente R (2004). Seroprevalencia de anticuerpos frente al virus de la Diarrea vírica bovina en el ganado bovino de la Comunidad Autónoma de Madrid. *Laboratorio Veterinario ADEVILA* 28: 2-8.
5. Olafson P, MacCallum AD, Fox A (1946). An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet* 36:205-213.
6. Ramsey FK, Chivers WH (1953). Mucosal disease of cattle. *North Am Vet.* 34:629-633.
7. Collett MS, Larson R, Belzer SK, Retzel E (1988). Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* 165: 200-8.
8. Wengler G (1991). Family *Flaviviridae*. Classification and nomenclature of viruses: Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses; Ed. Franki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown Berlin: Springer Verlag, 223-233.
9. Houe H (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol* 64(2-3):89-107.
10. Bolin SR, Ridpath JF, Black J, Macy M, Roblin R (1994). Survey of cell lines in the American Type Culture collection for bovine viral diarrhoea virus. *J Virol Methods* 48: 211-221.
11. Bolin SR, Grooms DL (2004). Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. *Vet Clin Food Anim* 20: 51-68.
12. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (2005). In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J et al, (Eds.) *Classification and nomenclature of viruses*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier Academic Press, San Diego, 2005;135-43, 981-98.
13. Horzinek M (1987). Molecular pathogenesis of virus infections. *Experientia* Dec 1;43(11-12):1193-6.
14. Nettleton PF, Entrican G (1995). Ruminant pestiviruses. *Br Vet J.* 1995 Nov-Dec;151(6):615-42.
15. Pritchett R, Manning JS, Zee YC (1975). Characterization of bovine viral diarrhoea virus RNA. *J Virol* 15(6):1342-7.
16. Purchio AF, Larson R, Collett MS (1983). Characterization of virus-specific RNA synthesized in bovine cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Virol.* 48(1):320-4.
17. Renard A, Schmetz D, Guiot C, Brown-Shimmer S, Dagenais L, Pastoret PP, Dina D, Martial JA (1987). Molecular cloning of the bovine viral diarrhoea virus genomic RNA. *Ann Rech Vet* 18(2):121-5.
18. Ridpath JF, Bolin SR (1997). Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses. *Virus Res.* 50(2):237-43.
19. Grummer B, Beer M, Liebler-Tenorio E, Greiser-Wilke I (2001). Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol.* 82(11):2597-605.

20. Thiel HJ, Plagemann PGW, Moennig V (1996). Pestiviruses, in: Fields Virology, Fields BN, Knipe DM, Hewley PM Eds, 3rd ed., Lippincott-Raven Publishers, pp. 1059-73.
21. Corapi WV, Donis RO, Dubovi EJ (1990). Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res.* 1990 Sep;51(9):1388-94.
22. Ridpath JF (1996). Sequence diversity and genotyping. International Symposium Bovine Viral Diarrhoea Virus a 50 years Review, Cornell University, USA, pp. 39-42.
23. Paton DJ (1995). Pestivirus diversity. *J Comparative Pathol* 112: 215-236.
24. Donis RO (1995). Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11(3):393-423.
25. Bolin SR, Ridpath JF (1992). Differences in virulence between two noncytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *Am J Vet Res* 53:2157-63.
26. Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi E (1994). Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 205: 66-74.
27. Heinz FX, Collet MS, Purcell RH, et al (2000). Genus pestivirus. In *Virus Taxonomy*. Eds. Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, et al., pp. 867-72. Academic Press, New York.
28. Fulton RW, Ridpath JF, Confer AW, Saliki JT, Burge LJ, Payton ME (2003). Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals* 31: 89-95.
29. Ridpath JF, Bolin SR (1995). The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology* 212:39-46.
30. Pellerin C, Vandenhurk J, Lecomte J, Tijssen P (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Viriology* 203: 260-8.
31. Corapi WV, Elliott RD, French TW, Arthur DG, Bezek DM, Dubovi EJ (1990). Thrombocytopenia and haemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc* 196: 590.
32. Wilhelmssen CL, Bolin SR, Ridpath JF, Cheville NF, Kluge JP (1990). Experimental primary postnatal bovine viral diarrhoea viral infections in six-month-old calves. *Vet Pathol* 27(4):235-43.
33. Carman S, Van Dreumel T, Ridpath J et al (1998). Severe acute bovine virus diarrhoea in Ontario, 1993-1995. *J Vet Diagn Invest* 10: 27-35.
34. Ridpath JF, Bolin SR (1998). Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol Cell Probes* 12(2):101-6.
35. Archambault D, Beliveau C, Couture Y, Carman S (2000). Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Vet Res* 31(2):215-27.
36. Jones L, Weber L (2001). Application of single-strand conformation polymorphism to the study of bovine viral diarrhoea isolates. *J Vet Diagn Invest* 13: 50-56.
37. Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Nelly JD (2002). Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with highly virulent BVDV 2. *Am J Vet Res* 63:1575-84.
38. Stoffregen B, Bolin SR, Ridpath JF, Pohlenz J (2000). Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case. *Vet Microbiol* 77(1-2):157-62.

39. Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi E (1994). Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 205: 66-74.
40. Walz PH, Bell TG, Wells JL, Gooms DL, Kaiser L, Maes RK, Baker JC (2001). Relationship between degree of viremia and disease manifestations in calves with experimentally induced bovine viral diarrhoea virus infection. *Am J Vet Res* 62 (7): 1095-103.
41. Vilcek S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Iбата G, Moussa A, Loitsch A, Rossmannith W, Vega S, Scicluna MT, Paifi V (2001). Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol* 146(1):99-115.
42. Flores EF, Ridpath JF, Weiblen R, Vogel FS, Gil LH (2002). Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res* 87: 51-60.
43. Ridpath JF, Bendfeldt S, Neill JD, Liebler-Tenorio E (2006). Lymphocytopathogenic activity in vitro correlates with high virulence in vivo for BVDV type 2 strains: criteria for a third biotype of BVDV. *Virus Res* 118 (1-2): 62-9.
44. Bolin SR, McClurkin AW, Cutlip RC, Coria MF (1985). Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res* 46: 573-6.
45. Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ (1989). Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res Vet Sci* 46: 307-11.
46. Tremblay R (1996). Transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Med* 91: 858-66.
47. Belknap EB, Collins JK, Larsen RS, Conrad KP (2000). Bovine viral diarrhoea virus in New World camelids. *J Vet Diagn Invest* 12(6):568-70.
48. Goyal SM, Bouljihad M, Haugerud S, Ridpath JF (2002). Isolation of bovine viral diarrhoea virus from an alpaca. *J Vet Diagn Invest* 14(6):523-5.
49. Corrales JC, Sanjuán ML, García C (2001). Epidemiología e importancia económica de la diarrea vírica bovina. *Patología Infecciosa y Epizootiología*. Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela. Ciencias Veterinarias.
50. Ribera H, Huamán K, Benito A, Diaz A, Arana C (2003). Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina y animales portadores del virus en un hato lechero del valle del Manástaro. *Rev Acad Peruana Cienc Vet* 3: 1-7.
51. Álvarez M, González M, Álvarez F, López JM, Llamazares J (1994). Prevalencia de las infecciones por el virus de la diarrea vírica bovina (DVB) en rebaños vacunos lecheros y su posible participación en problemas reproductivos. VII Jornadas Internacionales de Reproducción (Murcia).
52. Lértora W (2003). Diarrea viral bovina: actualización. *Rev Vet* 14: 42-51.
53. Niskanen R, Lindberg A, Larsson B, Alenius S (1996). Primarily BVDV infected calves as transmitters of the infection. *Proceeding of XIX World Buiatrics Congress, Edinburgh, Scotland*, p. 593-5.
54. Larson R, Grotelueschen D, Brock K, Hunsaker B, Smith R, Sprowls R, MacGregor D, Loneragan G, Daršgatz D (2004). Bovine viral diarrhoea (BVD): Review for beef cattle veterinarians. *Bov Pract* 38: 93-102.
55. Viet A, Fourichon C, Seegers H, Jacob C, Guihenneuc-Jouyauc C (2004). A model of the spread of the bovine viral diarrhoea virus within a dairy herd. *Prev Vet Med* 63: 211-36.
56. Lindberg A, Alenius S (1999). Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet Microbiol* 64: 197-222.

57. Moennig V, Liess B (1995). Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11: 477-87.
58. Traven M, Alenius S, Fossum C, Larsson B (1991). Primary bovine viral diarrhoea virus infection in calves following direct contact with a persistently viraemic calf. *Zentralbl Veterinarmed B* 38(6):453-62.
59. Viet AF, Fourichon C, Seegers H (2007). Review and critical discussion of assumptions and modelling options to study the spread of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) within a cattle herd. *Epidemiol Infect* 135(5):706-21.
60. Álvarez S, Rivera H, Pezo D, García W (2002). Detección de anticuerpos contra pestivirus en rumiantes de una comunidad campesina de la provincia de Canchis, Cusco. *Rev Inv Vet Perú* 13: 46-51.
61. Niskanen R, Lindberg A (2003). Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *Vet J* 165: 125-30.
62. Lindberg A, Stokstad M, Loken T, Alenius S, Niskanen R (2004). Indirect transmission of bovine viral diarrhoea virus at calving and during the postparturient period. *Vet Rec* 154: 463-7.
63. Rickey EJ (1996). Bovine viral diarrhoea (BVD) in Beef Cattle. Fact Sheet VM-56. Department of Large Animal Clinical Sciences. College of Veterinary Medicine. University of Florida 1-4.
64. Baker JC (1990). Clinical aspects of bovine viral diarrhoea virus infection. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 9:25.
65. Brock KV (1995). Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11: 549-61.
66. Potgieter LND (1995). Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11: 501-20.
67. Brodersen BW, Kelling CL (1998). Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus infection on respiratory tract and enteric diseases in calves. *Am J Vet Res* 59: 1423-30.
68. Hamers C, Couvreur B, Dehan P, Letellier C, Lewalle P, Pastoret PP, Kerkhofs P (2000). Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea virus strains isolated from haemorrhagic syndromes. *Vet J* 160(3):250-8.
69. Brownlie J (1990). The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 9 (1): 43-59.
70. Marshall DJ, Moxley RA, Kelling CL (1996). Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Vet Pathol* 33:311-8.
71. Spagnuolo-Weaver M, Allan GM, Kennedy S, Foster JC, Adair BM (1997). Distribution of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus antigens in tissues of calves following acute experimental infection. *J Vet Diagn Invest* 9: 287-97.
72. Lambot M, Hanon E, Lecomte C et al (1998). Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes. *J Gen Virol* 79: 1745-9.
73. Hibberd RC, Turkington A, Brownlie J (1993). Fatal bovine viral diarrhoea virus infections of adult cattle. *Vet Rec* 132: 227-8.
74. David GP, Crawshaw TR, Gunning RF, Hibberd RC, Lloyd GM, Marsh PR (1994). Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *Vet Rec* 134: 468-72.

75. Drake TR, Moore DA, Whitlock RH et al. (1994). An outbreak of peracute BVD in Pennsylvania cattle. In Proceedings of the 37th Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Grand Rapids, MI, p.20.
76. Flores EF, Gil LH, Botton SA, Weiblen R, Ridpath JF, Kreutz LC, Pilati C, Driemeyer D, Moojen V, Wendelstein AC (2000). Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet Microbiol* 77(1-2):175-83.
77. Rebhun WC, French TW, Perdrizet JA, Dubovi EJ, Dill SG, Karcher LF (1989). Thrombocytopenia associated with acute bovine viral diarrhoea infection in cattle. *J Vet Intern Med* 3: 42.
78. Ellis JA, West K, Cortese V, Myers SL, Carman S, Martin KM, Haines DM (1998). Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent bovine virus diarrhoea virus-type II. *Can J Vet Res* 62(3):161-9.
79. Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Nelly JD (2003). Lesions and tissue distribution of viral antigen in severe acute versus subclinical acute infection with BVDV2. *Biologicals* 31: 119-22.
80. Revell SG, Chasey D, Drew TW, Edwards S (1988). Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec* 123(5):122-5.
81. Kirkland PD, Richards SG, Rothwell JT, Stanley DF (1991). Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet Rec* 128(25):587-90.
82. Meyling A, Jensen M (1988). Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination with semen from a persistently-infected bull. *Vet Microbiol* 17: 97-105.
83. Schlafer DH, Gillespie JH, Foote RH, Quick S, Pennow NN, Dougherty EP, Schiff EI, Allen SE, Powers PA, Hall CE, et al (1990). Experimental transmission of bovine viral diseases by insemination with contaminated semen or during embryo transfer. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 97(2):68-72.
84. Paton DJ, Brockman S, Wood L (1990). Insemination of susceptible and preimmunized cattle with bovine viral diarrhoea virus infected semen. *Br Vet J* 146(2):171-4.
85. Fray MD, Paton DJ, Alenius S (2000). The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Anim Reprod Sci* 60-61: 615-27.
86. McGowan MR, Kafi M, Kirkland PD et al (2003). Studies of the pathogenesis of bovine pestivirus-induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology* 59: 1051-66.
87. Wittum TE, Grotelueschen DM, Brock KV et al (2001). Persistent bovine viral diarrhoea viral infection is US beef herds. *Perv Vet Med* 49: 83-94.
88. Done JT, Terlecki S, Richardson C, et al (1980). Bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus: Pathogenicity for the foetal calf following maternal infection. *Vet Rec* 106: 473-9.
89. Brownlie J (1985): Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea mucosal disease complex in cattle. In *Pract* 7 (6): 195-202.
90. Duffell SJ, Harkness JW (1985). Bovine viral diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet Rec* 117: 240-5.
91. McGowan MR, Kirkland PD (1995). Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *Br Vet J* 151 (3): 263-70.
92. Fredriksen B, Press C, Loken T, Odegaard SA (1999). Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol* 64: 109-22.

93. Odeon AC, Kelling CL, Marshall DJ, Estela ES, Dubovi EJ, Donis RO (1999). Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus genotype II (NY-93). *J Vet Diagn Invest* 11: 221-8.
94. Brock KV (2003). The persistence of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals* 31,133-135.
95. 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 diarrhoea virus subtype 2a. *Vet Pathol* 42(2):192-9.
96. Sandvik T (1999). Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet Microbiol* 64: 123–34.
97. Fredriksen B, Press C, Sandvik T, Odegaard SA, Loken T (1999). Distribution of viral antigen in placenta and fetus of cattle acutely infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Pathol* 36: 267-75.
98. Njaa BL, Clark EG, Janzen E et al (2000). Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J Vet Diagn Invest* 12: 393-9.
99. Shin T, Acland H (2001). Tissue distribution of bovine viral diarrhoea virus antigens in persistently infected cattle. *J Vet Sci* 2:81-4.
100. Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD (2004). Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest* 16: 388-96.
101. Bolin SR, Sacks JM, Crowder SV (1987). Frequency of association of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus with mononuclear leukocytes from persistently infected cattle. *Am J Vet Res* 48(10):1441-5.
102. 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(2): 923-7.
103. Donis RO, Dubovi EJ (1987). Glycoproteins of bovine viral diarrhoea- mucosal disease virus in infected bovine cells. *J Gen Virol* 68:1607–16.
104. Bolin SR (1995). Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11: 615.
105. Bock RE, Rodwell BJ, McGowan M (1997). Detection of calves persistently infected with bovine pestivirus in a sample of dairy calves in south-eastern Queensland. *Aust Vet J* 75 (9): 656-9.
106. Muñoz-Zanzi C, Hietala S, Thurmond M, Jonson W (2003). Quantification, risk factors, and health impact of natural congenital infection with bovine viral diarrhoea virus in dairy calves. *Am J Vet Res* 64: 568.
107. Bielefeldt-Ohmann H (1995). The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11: 447.
108. Fernandez A, Hewicker M, Trautwein G, Pohlenz J, Liess B (1989). Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Pathol* 26: 26-32.
109. Baker JC (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11:425-45.
110. Kahrs RF(2001). Bovine viral diarrhoea. In: *Viral Diseases of Cattle*, 2nd ED. Kahrs RF, pp. 113-126. Iowa State University Press, Ames, IA.
111. Ohmann HB (1982). Experimental fetal infection with bovine viral diarrhoea virus. I. Virological and serological studies. *Can J Comp Med* 46 (4): 357-62.

112. Gillespie J, Baker J, McEntee K (1960). A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet* 50:73-9.
113. Meyers G, Tautz N, Stark R, Brownlie J, Dubovi EJ, Collett MS, Thiel HJ (1992). Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* 191: 368-86.
114. Tautz N, Thiel HJ, Dubovi EJ, Meyers G (1994). Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J Virol* 68(5):3289-97.
115. Kümmerer BM, Tautz N, Becher P, Thiel H, Meyers G (2000). The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet Microbiol* 77:117-28.
116. Becher P, Orlich M, Thiel HJ (2001). RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J Virol* 75(14):6256-64.
117. Brusckke CJ, Haghparast A, Hoek A et al (1998). The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-homologous cytopathic BVDV. *Vet Immunol Immunopathol* 62: 37-50.
118. Bielefeldt Ohmann H (1983). Pathogenesis of bovine viral diarrhoea-mucosal disease: Distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves. *Res Vet Sci* 34: 5-10.
119. Liebler EM, Waschbusch J, Pohlenz JF, Moennig V, Liess B (1991). Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease. *Arch Virol* 3: 109-24.
120. Wilhelmssen CL, Bolin SR, Ridpath JF et al (1991). Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhoea. *Am J Vet Res* 52: 269-75.
121. Teichmann U, Liebler-Tenorio EM, Pohlenz JF (2000). Ultra-structural changes in follicles of small-intestinal aggregated lymphoid nodules in early and advanced phases of experimentally induced mucosal diseases in calves. *Am J Vet Res* 61:174-82.
122. Liebler EM, Küsters C, Pohlenz JF (1995). Experimental mucosal disease in cattle: changes of lymphocyte subpopulations in Peyer's patches and in lymphoid nodules of large intestine. *Vet Immunol Immunopathol* 48: 233-48.
123. Liebler-Tenorio EM, Pohlenz JF (1997). Experimental mucosal disease of cattle: altered cell proliferation in lymphoid tissues and intestinal epithelium. *J. Comp. Pathol.* 117, 339-350.
124. Grummer B, Moennig V, Greiser-Wilke I (1998). Cytopathogenic bovine viral diarrhea viruses induce apoptosis in bovine cell cultures. *D.T.W.* 105, 29-31.
125. Xue W, Zhang S, Minocha HC (1997). Characterization of a putative receptor protein for bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol* 57 (2-3) :105-18.
126. Yu H, Isken O, Grassmann CW, Behrens SE (2000). A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J Virol* 74(13):5825-35.
127. Zhang G, Flick-Smith H, McCauley JW (2003). Differences in membrane association and sub-cellular distribution between NS2-3 and NS3 of bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res* Nov;97(2):89-102.
128. Birk AV, Dubovi EJ, Cohen-Gould L, Donis R, Szeto HH (2008). Cytoplasmic vacuolization responses to cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res* 132: 76-85.
129. Bielefeldt Ohmann H, Bloch B (1982). Electron microscopic studies of bovine viral diarrhea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures. *Arch Virol* 71:57-74.
130. Bielefeldt Ohmann H, Bloch B, Davis WC, Askaa J (1988). BVD-virus infection in peripheral blood mononuclear cells from persistently viraemic calves studied by correlative immunoelectron microscopy. *Zentralbl Veterinarmed B* Aug;35(7):477-92.

131. Grummer B, Bendfeldt S, Greiser-Wilke I (2002). Apoptosis inhibitors delay the cytopathic effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49:298-303.
132. Bendfeldt S, Grummer B, Greiser-Wilke I (2003). No caspase activation but overexpression of Bcl-2 in bovine cells infected with noncytopathic bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol* 96:313-26.
133. Yamane d, Nagai M, Ogawa Y, Tohya Y, Akashi H (2005). Enhancement of apoptosis via an extrinsic factor, TNF- α in cells infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Microbes and Infection* 7: 1482-91.
134. Brusckhe C, Weerdmeester K, Van Oirschot J, Van Rijn P (1998). Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Vet Microbiol* 64: 23-32.
135. Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD (2003). Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. *J Vet Diagn Invest* 15:221-32.
136. Bielefeldt Ohmann H, Rønsholt L, Bloch B (1987). Demonstration of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood mononuclear cells of persistently infected, clinically normal cattle. *J Gen Virol* 68: 1971-82.
137. Peterhans E, Jungi TW, Schweizer M (2003). BVDV and innate immunity. *Biologicals* 31: 107-12.
138. Collen T, Morrison WI (2000). CD4 (+) T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Res* 67: 67-80.
139. Ridpath JF, Neill JD, Frey M, Landgraf JG (2000). Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbiol* Nov 15;77(1-2):145-55.
140. Brusckhe CJ, Hulst MM, Moormann RJ, Van Rijn PA, Van Oirschot JT (1997). Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J Virol* 71(9):6692-6.
141. Hahn S, Gehri R, Erb P (1995). Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol Rev* 146:57-79.
142. Ellis JA, Yong C (1997). Systemic adverse reactions in young Simmental calves following administration of a combination vaccine. *Can Vet J* 38(1):45-7.
143. Adler B, Adler H, Pfister H, Jungi TW, Peterhans E (1997). Macrophages infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus release a factor(s) capable of priming uninfected macrophages for activation-induced apoptosis. *J Virol* 71(4):3255-8.
144. Perler L, Schweizer M, Jungi TW, Peterhans E (2000). Bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 prime uninfected macrophages for lipopolysaccharide-triggered apoptosis by interferon-dependent and independent pathways. *J Gen Virol* 81(4):881-887.
145. Chase CCL, Elmowalid G, Yousif AAA (2004). The Immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. *Vet Clin Food Anim* 20:95-114.
146. Greig A, Gibson IR, Nettleton PF, Herring JA (1981). Disease outbreak in calves caused by a mixed infection with infectious bovine rhinotracheitis virus and bovine viral diarrhoea virus. *Vet Rec* 108: 480.
147. Fulton RW, Purdy CW, Confer AW, Saliki JT, Loan RW, Briggs RE and Burge LJ (2000). Bovine viral diarrhoea infections in feeder calves with respiratory disease: Interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res* 64: 151-9.

148. Fulton RW, Ridpath JF, Saliki JT, Briggs RE, Confer AW, Burge LJ, Purdy CW, Loan RW, Duff GC, Payton ME (2002). Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Can J Vet Res* 66: 181-90.
149. Shahriar FM, Clark EG, Janzen E et al (2002). Coinfection with bovine viral diarrhoea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. *Can Vet J* 43: 863-8.
150. Potgieter LN (1997). Bovine respiratory tract disease caused by bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13(3):471-81.
151. Baule C, Kulcsar G, Belak K, Albert M, Mittelholzer C, Soos T, Kucsera L, Belak S (2001). Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhoea virus type I. *J Clin Microbiol* 39 (1): 146-53.
152. Welsh MD, Adair BM, Foster JC (1995). Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. *Vet Immunol Immunopathol* 46:195-210.
153. Adler H, Jungi TW, Pfister H, Strasser M, Sileghem M, Peterhans E (1996). Cytokine regulation by virus infection: bovine viral diarrhoea virus, a flavivirus, downregulates production of tumor necrosis factor alpha in macrophages in vitro. *J Virol* 70(4):2650-3.
154. Liu I, Lehmkuhl HD, Kaeberle ML (1999). Synergistic effects of bovine respiratory syncytial virus and non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection on selected bovine alveolar macrophage functions. *Can J Vet Res* 63: 41-8.
155. Glew EJ, Carr BV, Brackenbury LS, Hope JC, Charleston B, Howard CJ (2003). Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. *J Gen Virol* 84: 1771-80.
156. Olchowy TWJ, Slauson DO, Boschler PN (1997). Induction of procoagulant activity in virus infected bovine alveolar macrophages and the effects of lipopolysaccharide. *Vet Immunol Immunopathol* 58: 27-37.
157. Adler H, Frech B, Meier P et al. (1994). Noncytopathic strains of bovine viral diarrhoea virus prime bovine bone marrow-derived macrophages for enhanced generation of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 1562-8.
158. Van Reeth K, Adair B (1997). Macrophages and respiratory viruses. *Pathol Biol* 45: 184-92.
159. Jensen J, Schultz RD (1991). Effect of infection by bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in vitro on interleukin-1 activity of bovine monocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 29 (3-4):251-65.
160. Walz PH, Steficek BA, Baker JC, Kaiser L, Bell TG (1999). Effect of experimentally induced bovine virus diarrhoea virus infection on platelet function in calves. *Am J Vet Res* 60: 1396-401.
161. Edwards RL, Rickles FR (1984). Macrophage procoagulants. *Prog Hemostasis Thromb* 7:183-209.