

**TRANSMISIÓN DE LA INFECCIÓN POR PESTIVIRUS
A OVEJAS Y CABRAS EN CONTACTO CON UN
TERNERO PERSISTENTEMENTE INFECTADO CON
UNA CEPA VACUNAL DE ORIGEN BOVINO.**

**(TRANSMISSION OF PESTIVIRUS INFECTION
TO SHEEP AND GOATS IN CLOSE CONFINEMENT
WITH A CALF PERSISTENTLY INFECTED
WITH A VACCINAL STRAIN OF BOVINE VIRUS
DIARRHOEA VIRUS)**

*M. Álvarez Martínez**
*M. González González**
*M^a. Muñoz Fernández**

Palabras clave: Pestivirus Transmisión. Vacuna. Rumiantes.
Key words: Pestivirus. Transmission. Vaccine. Ruminants.

RESUMEN

Un ternero, de cinco meses de edad, persistentemente infectado (P.I.) con una cepa vacunal de pestivirus bovino, se estabuló, durante 11 semanas, en estrecho contacto con dos cabras seronegativas y dos ovejas gestantes (4^o mes de gestación) seronegativas. La transmisión de la infección se confirmó mediante una prueba de neutralización del efecto citopático vírico de la cepa Oregon C24V sobre células EBTr. Las cabras y las ovejas seroconvirtieron durante la 2^a y la 3^a semanas después de su estabulación. Los títulos en anticuerpos neutralizantes específicos frente a pestivirus aumentaron progresivamente, principalmente durante las cuatro primeras semanas, y permanecieron constantes después de alcanzado el título máximo entre la 5^a y la 9^a semana. La cepa vacunal de pestivirus bovino infectó a los dos fetos ovinos de una oveja gestante, como se demostró por la presencia de anticuerpos séricos específicos

* Dpto. Patología Animal (Sanidad Animal) Universidad de León
An. Fac. Vet. 1992-1994, 38, 79-87

en los corderos antes de la toma de calostro. Se discuten las implicaciones epidemiológicas del uso de vacunas vivas de pestivirus en rebaños mixtos de rumiantes.

SUMMARY

A five months calf persistently infected (P.I.) with a vaccinal strain of bovine pestivirus was confined, for 11 weeks, in close contact with two seronegative goats and two seronegative pregnant sheep in the fourth month of gestation. Transmission of infection was confirmed by a neutralization assay of the cytopathic effect of the Oregon C24V strain on EBTr cells. Goats and sheep seroconverted during the 2nd and 3rd weeks of confinement. Serum antibody titres increased, mainly in the first four weeks, and remained constant after reaching the maximum titers between the fifth and the ninth week. Vaccinal bovine pestivirus strain also infected the two ovine fetuses in a pregnant sheep as was shown by the presence of specific serum neutralizing antibodies before the colostrum intake. Epidemiological implications of using live vaccines in mixed herds are discussed.

INTRODUCCIÓN

Los pestivirus se encuentran ampliamente distribuidos en las poblaciones de bovinos y de ovinos e inducen entidades nosológicas, en ambas especies, que reciben la denominación de "Diarrea vírica bovina" y de "Enfermedad de la Frontera", respectivamente⁶. La infección por pestivirus en caprinos ha sido mucho menos estudiada; no obstante, pueden sufrir la infección, tanto de forma experimental como natural, y padecer la enfermedad, que ha recibido, por extensión, la misma denominación que en los ovinos⁷. Todos los pestivirus poseen un antígeno estable común, la proteína no estructural p80, y un antígeno, la glicoproteína principal de la envoltura gp53, que muestra variabilidad antigénica e induce la formación de anticuerpos neutralizantes, si bien no se ha establecido todavía una clasificación en serotipos⁸. La clasificación de las cepas de pestivirus aisladas de rumiantes es difícil debido a la variabilidad antigénica en y entre las cepas específicas de especie y también como consecuencia de la presentación de infecciones cruzadas intraespecíficas en los rumiantes, designándose a las cepas de pestivirus con el calificativo de la especie animal de la que proceden¹².

Las vacunas vivas frente a los pestivirus son inmunógenas, pero no están exentas de efectos colaterales perjudiciales. Las cepas vacunales pueden pasar la barrera placentaria e infectar al feto, dando lugar a un cuadro patogénico similar al de la infección natural^{6,10,11}. Los animales persistentemente infectados (P.I.) por pestivirus son las principales fuentes de infección y excretan virus con todas las secreciones y excreciones durante toda su vida⁴.

Si bien se ha descrito la transmisión de la infección por pestivirus de bovinos a ovinos⁵ y caprinos⁷, nunca se ha denunciado la transmisión intraespecífica de la infección de una cepa vacunal. En el presente trabajo estudiamos la difusión de la infección a ovejas gestantes y cabras en contacto con un ternero P.I. por una cepa vacunal de origen bovino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales:

Ternero P.I. por una cepa vacunal de pestivirus bovino

El ternero P.I. tenía cinco meses de edad y era de raza frisona. La infección persistente por pestivirus se consiguió mediante la aplicación, en el día 90 de gestación, de una vacuna viva comercial, por vía intramuscular profunda, en una hembra seronegativa al virus. La vaca parió un ternero P.I. por la cepa vacunal de origen bovino. Durante los cinco meses de vida se realizaron diversas recogidas de sangre, con tubos de vacío con y sin heparina sódica, para la comprobación de la persistencia de la infección y la determinación de anticuerpos séricos.

Ovejas

Se adquirieron dos ovejas en el 4º mes de gestación, de 3 años de edad, seronegativas a pestivirus. Las ovejas procedían de un rebaño seronegativo a pestivirus al menos en el año anterior de la prueba. Se realizaron dos pruebas serológicas y de detección del antígeno vírico, una semana antes y en el momento de su ubicación en las instalaciones en las que se realizó la prueba, todas con resultado negativo. Las dos ovejas parieron 1 y 2 corderos, que fueron sangrados, con tubos de vacío con y sin anticoagulante, en el día de su nacimiento y, semanalmente, hasta la 3ª semana de vida. Asimismo, de las ovejas recién paridas se recogieron las secreciones calostrales del 1º día.

Cabras

Se adquirieron dos cabras de 2 años de edad, de raza murciano-granadina, criadas en intensivo. Las cabras procedían de un rebaño que había sido seronegativo al virus al menos 4 años antes de la realización de la prueba. Por la aplicación de un programa de sincronización de celos en el rebaño, en la época en que se llevó a cabo el experimento no fue posible conseguir animales gestantes. Se realizaron dos pruebas serológicas y de detección del antígeno vírico, una semana antes y en el momento de su llegada a las instalaciones en las que se llevó a cabo la prueba, todas con resultado negativo.

Realización de la prueba experimental

Se llevó a cabo en instalaciones cedidas por Laboratorios Ovejero (León). Los animales se estabularon en un local de 12 m². El ternero P.I. fue introducido 2 días antes que las ovejas y las cabras. Para comprobar la transmisión de la infección, mediante

la detección de anticuerpos específicos séricos anti-pestivirus, las ovejas y las cabras se sangraron, con tubos de vacío, de la yugular, el día de la entrada y, a intervalos semanales, hasta la 11ª semana después de la entrada.

Sueroneutralización

Para la detección de anticuerpos se utilizó una prueba de neutralización del efecto citopático vírico en microplaca sobre la línea celular establecida de tráquea bovina EBTr. La cepa de virus utilizada fue el biotipo citopático de pestivirus bovino Oregon C24V. Los sueros fueron inactivados a 56°C durante 30 minutos y diluidos en base 2 (dilución de partida 1/5). Cada dilución de suero se mezcló con igual volumen de un inóculo vírico que contenía 100 DICT50/25 µl y se incubó a 37°C durante una hora en estufa con un 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se transfirieron a una microplaca, 50 µl de la mezcla virus-dilución del suero, añadiéndose a continuación 50 µl de una suspensión de células EBTr con una concentración de 200.000 células/ml. Las microplacas se incubaron a 37°C en estufa con un 5% de CO₂. Cada suero se tituló cuatro veces. En todas las microplacas se incluyeron testigos de las células, del virus, de los sueros y de sueros positivos y negativos de referencia. A la semana se realizó la lectura de los resultados mediante la observación, por microscopía, del efecto citopático -indicador de la replicación vírica- o de la ausencia del mismo -indicadora de la capacidad neutralizante del suero-. Los títulos de los sueros se expresan como la dosis neutralizante cultivo tisular 50%.

Detección del antígeno vírico a partir de los linfocitos

La detección del antígeno vírico se realizó mediante un ELISA doble sandwich, a partir de los linfocitos previamente tratados.

Obtención y tratamiento de los linfocitos

La sangre, obtenida con anticoagulante (heparina sódica), se centrifugó a 1.500 g durante 10 minutos. Tras la retirada del plasma, se lisaron los glóbulos rojos con una solución 0,16 M de cloruro de amonio (Sigma) y 0,17 M de Tris (Sigma) de pH 7,2. Transcurridos unos 4 minutos se centrifugó a 1.500 g durante 10 minutos, desechándose el sobrenadante. El sedimento (leucocitos) se lavó con PBS y se centrifugó, a 1.500 g durante 10 minutos, tres veces. El sedimento obtenido en el último lavado se trató con 1 ml de una solución al 1% de Nonidet P-40 (Sigma) en PBS durante 1 hora a temperatura de habitación y en rotación. Tras este tratamiento se centrifugó a 1.500 g durante 10 minutos, recogiendo el sobrenadante y conservándose a -80°C hasta la realización de la prueba.

ELISA doble sandwich

El líquido ascítico de ratón hiperinmune frente a pestivirus (WB 105) fue suministrado por el Dr Edwards del Central Veterinary Laboratory de Weybridge (Reino Unido); el suero hiperinmune anti-pestivirus bovino obtenido en cerdo y su control por el Dr Brownlie del Institute for Animal Health de Compton (Reino Unido).

Se utilizaron placas de PVC de 96 pocillos (Flow). Todos los pocillos de la placa se tapizaron, con 100 µl del líquido ascítico al 1/2000 en un buffer 0,05M carbonato/bicarbonato de pH 9,6, durante 2 horas a 37°C. Entre todos los pasos, las placas se lavaron 4 veces con un PBS que contenía 0,05% de Tween-20 (Sigma) (PBST). Los pocillos se bloquearon, durante 2 horas a 37°C, con 100 µl de PBST con 5% de suero de caballo (Gibco) previamente inactivado (PBSTC). Se dispusieron 100 µl de los extractos de linfocitos problemas en cada uno de los cuatro pocillos durante 18 horas a 37°C. Después del lavado, se distribuyeron por duplicado 100 µl del suero hiperinmune anti-BVD obtenido en cerdo y del suero control al 1/1.000 en PBSTC. Después de la incubación, durante 2 horas 37°C, y el lavado, se añadieron a todos los pocillos 100 µl de anti-Ig G (H+L) de cerdo producida en pollo y biotinada (Sera-lab) diluida al 1/1.000 en PBSTC. Tras la incubación, durante 1 hora y media a 37°C, y el lavado, se añadieron, a cada pocillo, 100 µl de un conjugado estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (Amershan) al 1/1000 en PBST durante 10 minutos a temperatura de habitación y en oscuridad. Tras el lavado, se dispuso el sustrato (100 µl/ pocillo) compuesto por tetrametilbenzidina (ICN) en buffer fosfato citrato de pH 5,0 que contenía 0,005% de agua oxigenada (Merck). La reacción se paró mediante la adición a cada pocillo de 50 µl de ácido sulfúrico 2,5 M. La densidad óptica se midió con un Flow Tirtetek Multieskan con un filtro de 492 nm.

RESULTADOS

El ternero P.I. fue positivo por el ELISA de identificación del antígeno vírico en las diversas tomas de sangre realizadas, desde el primer día de vida hasta el momento del inicio de la prueba, lo que confirma la persistencia de la infección por el virus vacunal. Como consecuencia de la toma de calostro, el ternero fue seropositivo durante los dos primeros meses de vida. A partir del 3º mes de vida y hasta la finalización de la prueba fue seronegativo.

La evolución del título de anticuerpos frente a la cepa de pestivirus bovino vacunal en las ovejas y en las cabras se expresa en las figuras 1 y 2, respectivamente.

En la oveja nº 1, la seroconversión tuvo lugar durante la 2ª semana y el título de anticuerpos fue aumentando progresivamente hasta la 8ª semana. En la oveja nº 2, la seroconversión se produjo en la 3ª semana, aumentando el título hasta la 9ª semana, a partir de la cual se mantuvo inalterable.

En la cabra nº 1, la seroconversión se presentó en el transcurso de la 2ª semana, con un aumento progresivo del título hasta la 7ª semana, a partir de la cual permaneció constante. La cabra nº 2 seroconvirtió durante la 3ª semana, el título aumentó hasta la 5ª semana, manteniéndose invariable hasta el final de la prueba.

En la descendencia de una de las dos ovejas, que tuvo un parto gemelar, se obtuvo el suero de los corderos, inmediatamente después de su nacimiento, antes de la toma de calostro. Los dos corderos tuvieron un título sérico de 63, que aumentó durante la 2ª semana, en ambos animales, a 501 y 630, que se mantuvieron en la 3ª

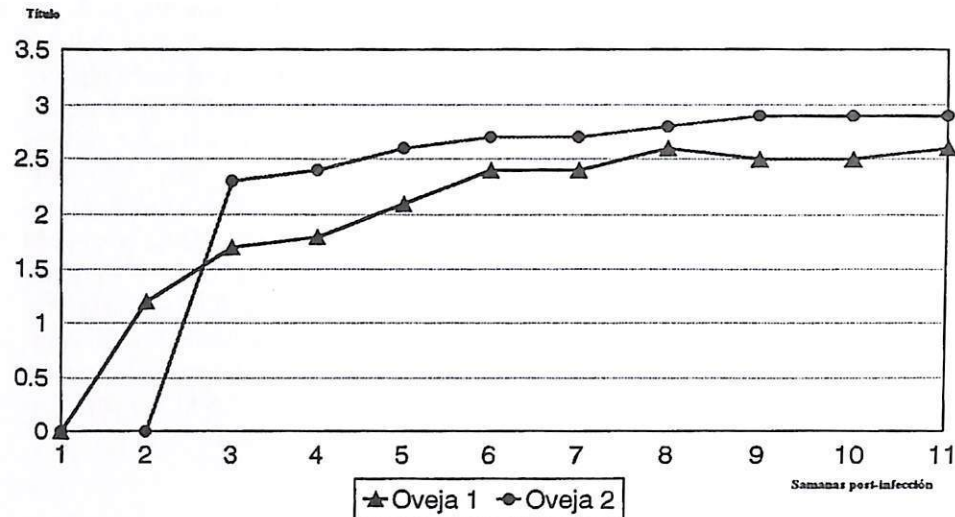


Figura 1. Evolución del título de anticuerpos séricos. (log₁₀) en las ovejas.

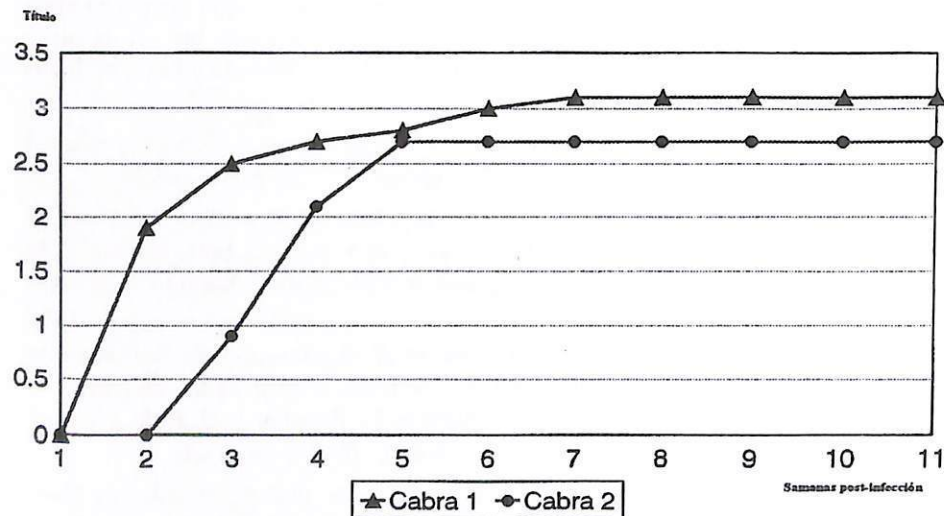


Figura 2. Evolución del título de anticuerpos séricos. (log₁₀) en las cabras.

semana. La oveja n° 2 parió un cordero, del que no se sabe si había ingerido calostro, con un título de 501, que aumentó a 630 y 794 durante la 2ª y 3ª semanas después del nacimiento, respectivamente. Los tres corderos fueron negativos al virus por ELISA.

El título en anticuerpos obtenido en los calostros de las ovejas fue de 2.511 y de 3.162, en la ovejas n° 1 y n° 2, respectivamente.

DISCUSIÓN

Como se comprueba por los resultados obtenidos, la cepa vacunal de pestivirus de origen bovino se transmitió con facilidad desde el ternero P.I. a las ovejas y a las cabras en contacto. La seroconversión, en ambas especies, tuvo lugar durante la 2ª ó 3ª semana después del inicio de la prueba. Los títulos aumentaron progresivamente en todos los animales, principalmente, durante el primer mes de estancia con el ternero P.I. y, en general, permanecieron constantes una vez alcanzado el título máximo, entre la 5ª y la 9ª semanas, quizás como consecuencia de la presencia continuada de la fuente de infección.

Los títulos neutralizantes máximos obtenidos en nuestro estudio en las ovejas (398 y 794) son inferiores a los hallados por otros autores en ovejas (1250) a los tres meses después de su puesta en contacto con una novilla P.I. por una cepa de campo; no obstante, el periodo de tiempo necesario para la seroconversión ha sido similar en ambos estudios⁵.

Los pestivirus de los rumiantes están estrechamente relacionados antigénicamente y se ha cuestionado que puedan ser considerados como especies diferentes, designándolos según la especie animal de la que proceden¹². Ahora bien, existen claras diferencias en relación con la epidemiología de la infección por pestivirus entre las diferentes especies de rumiantes. Así, la infección por pestivirus se encuentra más uniformemente distribuida en bovinos que en ovinos y caprinos; y, en un área geográfica determinada, la prevalencia de la infección es siempre mayor en los bovinos que en los otros rumiantes^{1,3,7}. Asimismo, la transmisión de la infección se produce con mayor facilidad desde los bovinos P.I. que desde los ovinos P.I.⁷, como se deduce de que en los rebaños bovinos cuando existe un animal P.I. la seroprevalencia de la infección puede llegar a ser cercana al 100%² mientras que, en los rebaños ovinos, la presencia de un animal P.I. da lugar a seroprevalencias de rebaño inferiores, entre 20 y el 50%⁷.

Los animales P.I. por pestivirus son las principales fuentes de infección en los rebaños⁴. Los animales P.I. han tenido que sufrir la infección durante su vida fetal, cuando todavía no son inmunocompetentes, con una cepa no citopática de pestivirus, entre los 40 y los 120 días en bovinos⁴ y antes de los 80 días de gestación en los ovinos⁹. Los animales P.I. excretan el virus con todas las secreciones y excreciones durante toda su vida; y, si quedan gestantes y paren, dan lugar a animales P.I., perpetuando la infección en el rebaño⁴. En el presente trabajo, la cepa de pestivirus vacu-

nal, inoculada en la vaca seronegativa en el 90 día de gestación, pasó la barrera placentaria e infectó al feto, naciendo un ternero P.I. e inmunotolerante al virus. La cepa vacunal de origen bovino se transmitió desde el ternero P.I. a las cabras y ovejas en contacto y pasó la barrera placentaria, al menos en una de las dos ovejas gestantes, infectando a los fetos ovinos que respondieron inmunológicamente al virus, como se demuestra por la presencia de anticuerpos específicos antes de la toma de calostro en los dos corderos.

En España y en otros países, no es infrecuente la explotación conjunta de diversas especies de rumiantes, principalmente, en sistemas semiextensivos o extensivos. No tenemos conocimiento de que se haya descrito anteriormente la transmisión intraespecífica de un cepa vacunal de pestivirus. Por consiguiente, sí se implanta la vacunación en un rebaño bovino con una vacuna viva de pestivirus bovino, se debe de tener en cuenta que los ovinos y caprinos pueden actuar como reservorios de la misma para los bovinos.

AGRADECIMIENTO

A Laboratorios Ovejero de León por la cesión de sus instalaciones para la realización de la prueba.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) ÁLVAREZ, M., PRIETO, M., MUÑOZ, M. y CÁRMENES, P. (1989). Prevalencia de la infección por pestivirus (Border disease) en ovinos de las regiones castellano-leonesa y asturiana. *Med.Vet.*, 6, 353-355.
- 2) ÁLVAREZ, M., GONZÁLEZ, M., y ÁLVAREZ, F. (1994). Prevalencia de la infección persistente por el virus de la Diarrea vírica bovina en los rebaños vacunos lecheros. Principales características del animal persistentemente infectado por el virus. *Proc. Séptimas Jornadas Internacionales de Reproducción Animal*. Murcia., 200.
- 3) BARLOW, R.M. y GARDINER, A.C. (1983) Border disease. En Martin, W. B. (Edit.). *Diseases of sheep*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 129-133
- 4) BROWNLIE, J., CLARKE, M.C., HOWWARD, C.J. y POCOCK, D.H. (1987). Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann. Rech. Vét.*, 18, 157-166
- 5) CARLSSON, U.(1991). Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, 128, 145-147.
- 6) LIESS, B., ORBAN, B., FREY, H.R., TRAUTWIN, G., WIEFEL, W. y BLINDOW, H. (1984). Studies of transplacental transmissibility of a bovine virus

diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVD virus 90-229 days before parturition (51st to 190th day of gestation). *Zentbl. VetMed. B*, 31, 669-681

- 7) LOKEN, T. (1992). Pestivirus infections in ruminants in Norway. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 11, 895-899.
- 8) MOENING, V. (1990). Pestiviruses a review. *Vet. Microbiol.*, 23, 35-54
- 9) NETTLETON, P. F. (1987). Pathogenesis and epidemiology of Border disease. *Ann. Rech. Vét.*, 18, 147-155.
- 10) ORBAN, S., LIESS, B., HAFEZ, S.M., FREY, H.R., BLINDOW, H. y SASSE PATZER, B. (1983). Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus: I. Inoculation of pregnant cows 15 to 90 days before parturition (190th to 265th day of gestation). *Zentbl. VetMed. B*, 30, 619-634.
- 11) TRAUTWEIN, G., HEWICKER, M., LIESS, B. ORBAN, S. y GRUNERT, E. (1986). Studies of transplacental transmissibility of bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. III. Ocurrance of central nervous system malformations in calves born from vaccinated cows. *J. Vet Med.* 33, 260-268.
- 12) Van OIRSCHOT, J. T. (1983). Congenital infections with nonarbo togaviruses. *Vet. Microbiol.*, 8, 321-361.