



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA MEDIANTE EL MÉTODO DE ELISA
SÁNDWICH**

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Médico Veterinario

AUTOR: JUAN SEBASTIÁN CORNEJO BACULIMA

TUTOR: ING. MAURICIO XAVIER SALAS RUEDA, MSC.

Cuenca - Ecuador

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Juan Sebastián Cornejo Baculima con documento de identificación N° 0105619589, manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 21 de septiembre del 2023

Atentamente,



Juan Sebastián Cornejo Baculima

0105619589

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Yo, Juan Sebastián Cornejo Baculima con documento de identificación N° 0105619589, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Trabajo experimental: “Prevalencia de diarrea viral bovina mediante el método de ELISA sándwich”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Médico Veterinario, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 21 de septiembre del 2023

Atentamente,



Juan Sebastián Cornejo Baculima

0105619589

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Mauricio Xavier Salas Rueda con documento de identificación N° 0603329681, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA MEDIANTE EL MÉTODO DE ELISA SÁNDWICH, realizado por Juan Sebastián Cornejo Baculima con documento de identificación N° 0105619589, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 21 de septiembre del 2023

Atentamente,



Ing. Mauricio Xavier Salas Rueda MSc.

0603329681

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de titulación primeramente a Dios y luego a mis padres Pablo y Silvana por su amor, trabajo y sacrificio; quienes me han permitido con su apoyo llegar a cumplir una meta más en mi vida y por inculcarme el ejemplo de esfuerzo, valentía y del que sin trabajo duro no se consigue nada, a mis hermanos Emilia y Pablo quienes son un pilar fundamental en mi vida y en mi negocio ahora, todos ellos son mi motivación y fuerza en cada momento. A mi familia porque con sus consejos y palabras de aliento me acompañaron a lo largo de mi carrera universitaria y en mi vida personal.

A mi tutor de tesis por haberme guiado en la elaboración de este trabajo y brindado el apoyo para desarrollarme profesionalmente; a mis profesores universitarios que con su sabiduría y conocimiento motivaron a desarrollarme como profesional y culminar esta prestigiosa carrera.

Finalmente, quiero dedicar esta tesis a todas las personas que confiaron en mí desde el primer día en que tome la decisión de estudiar la carrera de Medicina Veterinaria a todos los profesores, amigos y familia en general que estuvieron ahí durante toda mi etapa universitaria.

AGRADECIMIENTO.

Quiero expresar mi gratitud a Dios por guiarme a lo largo de mi vida y de mi carrera universitaria; a mis padres quienes son mi mayor inspiración ya que con su paciencia y buenos valores han sabido llevarme a culminar esta prestigiosa carrera. A mis hermanos quienes siempre me alentaron y apoyaron cuando más lo necesitaba y a la persona que estuvo a mi lado todos estos años por el apoyo mutuo y su lealtad en todo este camino que recién empieza.

Mi profundo agradecimiento a mis profesores quienes me transmitieron sus conocimientos para ser una excelente profesional e incentivaron a ser mejor cada día con sus palabras de aliento.

Un agradecimiento muy especial a mi tutor de tesis por su paciencia, orientación y apoyo en cada paso consiguiendo culminar con éxito este trabajo de titulación en esta prestigiosa universidad.

A la Universidad Politécnica Salesiana por ser sede del conocimiento adquirido durante todos estos años.

INDICE

1.	INTRODUCCION	15
1.1.	Problema	16
1.2.	Delimitación.....	17
1.2.1.	Espacial.....	17
1.2.2.	Temporal.....	17
1.2.3.	Académica	17
1.3.	Explicación del problema	17
1.4.	Objetivos	18
1.4.1.	Objetivo General.....	18
1.4.2.	Objetivos Específicos	18
1.5.	Hipótesis	18
1.5.1.	Hipótesis alternativa	18
1.5.2.	Hipótesis nula	19
1.6.	Fundamentación teórica	19
2.	REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTO.....	20
2.1.	Introducción	20
2.2.	Etiología.....	21
2.3.	Propiedades del virus	23
2.5.	Sintomatología y lesiones	25
2.6.	Manifestaciones clínicas	26
2.6.1.	Infecciones subclínicas:	27
2.6.2.	Infección aguda:	27
2.6.3.	Infección persistente	28
2.6.4.	Enfermedad de las mucosas.....	29
2.7.	Lesiones	30
2.8.	Diagnóstico.....	30
2.8.1.	Serología.....	31
2.8.2.	Aislamiento Viral	31
2.8.3.	Detección de antígenos mediante ELISA.....	32
2.8.4.	Inmunohistoquímica	33
2.8.5.	PCR.....	33
2.9.	Tratamiento	34
2.10.	Control y Erradicación	34

2.10.1.	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas – ELISA	35
2.10.1.1.	Principios de la técnica ELISA	36
2.10.1.2.	Pasos generales del proceso.....	36
2.10.2.	ELISA indirecto.....	39
2.10.3.	ELISA directo.....	39
2.10.4.	ELISA competitivo.....	40
2.10.5.	Elisa sándwich en la prevalencia de la enfermedad.	40
2.11.	Resumen del estado del arte del estudio del problema.....	41
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	42
3.1.	Materiales	42
3.1.1.	Materiales físicos de campo.	42
3.1.2.	Material biológico de campo.	42
3.1.3.	Material de laboratorio.	43
3.1.4.	Material químico.....	44
3.1.5.	Materiales de oficina.	44
3.2.	Metodología	45
3.3.	Proceso de la investigación.	45
3.3.1.	Selección de los animales	45
3.3.2.	Recolección de las muestras	45
3.4.	Análisis estadístico	46
3.5.	Población y muestra	46
3.5.1.	Población de datos	46
3.5.2.	Muestra	47
3.5.3.	Procedimiento de la muestra.....	48
3.5.4.	Interpretación de los resultados.	49
3.6.	Operalización de variables	50
3.6.1.	Variable Independiente.....	50
3.6.2.	Variable dependiente	50
3.7.	Consideraciones éticas	50
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1.	Prevalencia total.....	52
4.2.	Prevalencia por procedencia	54
4.3.	Prevalencia por sexo	56
4.4.	Prevalencia por edad	58

4.5.	Prevalencia por estado de desarrollo.....	61
4.6.	Prevalencia por antecedentes de abortos.....	63
4.7.	Prevalencia por tipo de reproducción.....	65
4.8.	Prevalencia por raza	68
4.9.	Prevalencia por número de parto.....	71
4.10.	Prevalencia por vacuna.....	73
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	75
5.1.	Conclusiones	75
5.2.	Recomendaciones	75
6.	BIBLIOGRAFIA.....	76
7.	ANEXOS.....	84

Índice de Tablas

Tabla 1.	<i>Equipos físicos de campo</i>	44
Tabla 2.	<i>Equipos biológicos de campo</i>	44
Tabla 3.	<i>Equipos físicos de laboratorio</i>	45
Tabla 3.	<i>Equipo personal de laboratorio</i>	45
Tabla 4.	<i>Material químico de laboratorio</i>	46
Tabla 5.	<i>Material biológico de laboratorio</i>	46
Tabla 6.	<i>Materiales de oficina</i>	47
Tabla 8.	<i>Variable Independiente: Suero de origen Bovino</i>	52

Tabla 9. <i>Variable dependiente: ELISA para DVB</i>	52
Tabla 10. <i>Prevalencia total</i>	54
Tabla 11. <i>Prevalencia por procedencia total (negativo – positivo)</i>	56
Tabla 12. <i>Prevalencia por sexo</i>	58
Tabla 13. <i>Prevalencia por edad</i>	60
Tabla 14. <i>Prevalencia por estado de desarrollo</i>	63
Tabla 15. <i>Prevalencia por antecedentes de abortos</i>	65
Tabla 16. <i>Prevalencia por tipo de reproducción</i>	67
Tabla 17. <i>Prevalencia por raza</i>	70
Tabla 18. <i>Prevalencia por número de parto</i>	73
Tabla 19. <i>Prevalencia por vacuna</i>	75

Índice de Figuras

<i>Figura 1.</i> Estructura del virus.	24
<i>Figura 2.</i> Propiedades del virus.....	26
<i>Figura 3.</i> Patogenia del virus.....	28
<i>Figura 4.</i> Animal persistentemente infectado.....	30
<i>Figura 5.</i> Pasos generales del proceso.....	40
<i>Figura 6.</i> Obtención de las muestras.....	85
<i>Figura 7.</i> Análisis de las muestras.....	86
<i>Figura 8.</i> Interpretación de las muestras mediante el método de ELISA sándwich.....	87

Figura 9. Selección de los animales.....88

RESUMEN

La DVD en ganado es una enfermedad infectocontagiosa que genera severas y grandes pérdidas al ganadero y se caracteriza por trastornos respiratorios, diarreas, abortos y una caída brusca en la producción de leche pudiendo llegar hasta la muerte, el objetivo del trabajo fue determinar la prevalencia de Diarrea Viral Bovina en la zona de San Fernando provincia del Azuay en diferentes hatos ganaderos, la toma de muestras de sangre se realizó en la vena coxígea del animal para su posterior examinación, consideramos que es un lugar donde la producción ganadera y lechera, es prácticamente la principal fuente de ingresos económicos de sus habitantes. El presente trabajo corresponde a un estudio de tipo transversal descriptivo prospectivo, que pretende establecer la prevalencia de Diarrea Viral Bovina en dicho cantón, por tal razón se realizó esta investigación en varias zonas de San Fernando con un muestreo al azar de 182 bovinos sin discriminar sexo, raza, edad y tipo de hato ganadero, mediante un análisis serológico con la técnica de ELISA Sándwich, esto se realizó en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana. Dándonos como resultado una prevalencia del 3,30% (6/182) animales positivos y con un 96,70% (176/182) de animales negativos. Incluidos estudios de diferentes investigaciones realizadas dentro y fuera del país, el nivel de prevalencia se ajusta a las cifras descritas por aquellos autores, tomando en cuenta la edad de los animales, su estado reproductivo y la eficacia en el control de la vacunación.

ABSTRACT

DVD in cattle is an infectious disease that generates severe and large losses to the farmer and is characterized by respiratory disorders, diarrhea, abortions and a sudden drop in milk production that can even lead to death, the objective of the work was to determine the prevalence of Bovine Viral Diarrhea in the area of San Fernando province of Azuay in different cattle herds, blood samples were taken from the animal's coccygeal vein for subsequent examination, we consider that it is a place where livestock and dairy production is practically the main source of income for its inhabitants. The present work corresponds to a prospective descriptive cross-sectional study, which aims to establish the prevalence of Bovine Viral Diarrhea in said canton, for this reason this investigation was carried out in several areas of San Fernando with a random sampling of 182 bovines without discriminating sex, race, age and type of cattle herd, by means of a serological analysis with the Sandwich ELISA technique, this was carried out in the laboratories of the Salesian Polytechnic University. Resulting in a prevalence of 3,30% (6/182) sampled animals and 96,70% (176/182) of negative animals. Including studies of different investigations carried out inside and outside the country, the level of prevalence is adjusted to the figures described by those authors, taking into account the age of the animals, their reproductive status and the efficacy in vaccination control.

1. INTRODUCCION

La diarrea viral bovina (DVD), es una enfermedad que afecta principalmente al ganado bovino. Es una enfermedad que en varios países está afectando tanto en el tema reproductivo como productivo, lo cual está generando pérdidas económicas a los productores, ya que la enfermedad antes mencionada se está considerando como un virus relevante en el mundo ganadero.

La Diarrea Viral Bovina del (DVB) es una enfermedad infecto-contagiosa con amplia distribución mundial y que limita la eficiencia productiva debido a la persistencia del virus en la naturaleza. El DVB es endémico en algunos hatos bovinos lecheros y de doble propósito del Ecuador, cuantificándose a nivel de país una prevalencia del 39,4 %. (Jara, 2008)

Causando grandes pérdidas económicas debido a su presentación clínica con trastornos reproductivos y muerte embrionaria; entre otros. Además de animales persistentemente infectados, los cuales resultan estériles o diseminan la enfermedad (Baker, 1990)

En 1946, cuando BVD fue descrito por primera vez, esta fue la forma más prevalente y uno de los signos más saltante fue la diarrea, de allí el nombre de diarrea viral bovina, aunque, en la actualidad se estima que solamente 1 a 5% de los animales de 6 meses a 2 años de edad pueden presentar esta forma clínica. (Rivera H. , 1993)

Esta enfermedad principalmente se presenta por signos y síntomas característicos como: depresión, fiebre alta, diarrea, anorexia, deshidratación, salivación, descarga

nasal, hemorragia en varios tejidos, erosiones gastrointestinales, y leucopenia hemorragia en varios tejidos.

Fue aislado desde un inicio por Lee y Gillespie en el año de 1957 y se denominó VDVB. Una presentación similar pero de mayor severidad se observó en Canadá por el microbiólogo Childs en 1946 y Estados Unidos, manifestándose con fiebre, anorexia, depresión, salivación profusa, descarga nasal, hemorragias gastrointestinales, erosiones, úlceras, y diarrea profusa a veces sanguinolenta; condición que posteriormente se denominó “enfermedad de las mucosas” (Gonzales Carbajal, 2016).

1.1. Problema

La Diarrea viral bovina implica un problema muy importante en la industria ganadera, debido a que afecta principalmente a la salud e integridad del ganado ya que en un gran número de hatos o vacas lecheras está comenzando a surgir con fuerza en el cantón de San Fernando, en la actualidad no existen estudios con respecto a la prevalencia de diarrea viral bovina en esta zona, por tal motivo es un problema los animales infectados ya que generan un riesgo de infección a los animales sanos al contacto.

Por consecuente la presente investigación tiene la finalidad de demostrar la prevalencia de diarrea viral bovina en varios hatos ganaderos o lecheros del cantón de San Fernando mediante pruebas serológicas y un Kit de Elisa lo cual nos van a garantizar varios resultados para poder determinar la prevalencia, teniendo en cuenta que debemos llevar un control para obtener resultados.

1.2. Delimitación

1.2.1. Espacial

La investigación se realizó en el cantón de San Fernando y todos sus alrededores, tiene una población de 3.961 habitantes de los cuales 3.256 son habitantes de la zona rural, su altitud es de 2600 msnm y su clima es templado en la parte baja y frío en la parte alta, tiene una extensión de 140,51 km², representando un 1,75% del porcentaje total de la provincia.

1.2.2. Temporal

Este proceso investigativo tuvo una duración de 400 horas, distribuidas en el proceso experimental y la redacción final del documento.

1.2.3. Académica

Este estudio cubre un área importante de las profesiones veterinarias y zootécnicas como lo es la epidemiología, por lo que este estudio permitirá profundizar en el conocimiento de este tema en beneficio de profesionales, estudiantes y personas interesadas en el tema al comprender la prevalencia de DVB derivada del ganado bovino del sector de San Fernando.

1.3. Explicación del problema

La presente investigación está enfocada en diagnosticar y evaluar la prevalencia de Diarrea Viral Bovina en el sector de San Fernando , provincia del Azuay, ya que esta enfermedad genera signos clínicos que tienen similitud a otras enfermedades de tipo reproductivo, gastrointestinal y respiratorio, por lo que podría existir una equivocación

en el diagnóstico, la enfermedad de DVB según las diferentes investigaciones que se han realizado está presente en la mayoría de los hatos ganaderos ya sea producción de leche o de carne, por lo que se llegan a generar grandes pérdidas económicas, por lo que se necesita un ente de control, o capacitaciones para un claro diagnóstico y de manera que esto se vea reflejado en los diferentes hatos de los ganaderos, y así se pueda prevenir y controlar de mejor manera, evitando menores pérdidas en la Zona de San Gerardo, así como también en las diferentes producciones fuera del mismo.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Determinar la prevalencia de Diarrea Viral Bovina en bovinos, en la provincia del Azuay, Cantón Girón, zona San Fernando.

1.4.2. Objetivos Específicos

Determinar la presencia de anticuerpos dirigidos para DVB en bovinos mediante el método de ELISA sándwich.

Determinar la prevalencia de *Diarrea viral bovina* en bovinos del Cantón San Fernando.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis alternativa

Es alta la prevalencia de Diarrea viral bovina en ganado bovino del cantón San Fernando

1.5.2. Hipótesis nula

Es baja la prevalencia de Diarrea viral bovina en ganado bovino del cantón San Fernando.

1.6. Fundamentación teórica

El presente trabajo de investigación se basó en determinar la prevalencia de diarrea viral bovina en hatos ganaderos y lecheros en la zona de San Fernando. Ya que esta es una enfermedad infecto-contagiosa que afecta principalmente al ganado bovino y por lo tanto como médicos veterinarios debemos informar, aportar información y proyectos de capacitación a los ganaderos tanto como pequeños y grandes productores.

Los resultados obtenidos servirá como información adicional para productores y ganaderos en general, proporcionando así como también programas tales como vacunación, desparasitaciones, prevención en la aparición de animales PI, cuarentenas y demás protocolos para el manejo y prevención de la enfermedad.

2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTO.

2.1. Introducción

La enfermedad conocida como Diarrea Viral Bovina como su nombre lo indica es un virus que ataca la salud del ganado bovino, este es un virus RNA de cadena simple que pertenece al género Pestivirus afectando todos los rumiantes sin tener en cuenta edad, es una enfermedad a nivel mundial que afecta a muchos ganaderos con grandes pérdidas de sus animales como también en la parte económica, se requiere tener un control del hato ganadero realizando pruebas serológicas o moleculares para la detección a tiempo de esta enfermedad. (Carrillo Correa, 2019)

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB) es una enfermedad endémica en las poblaciones de ganado en la mayor parte del mundo. La alta prevalencia en combinación con los efectos negativos sobre la reproducción y el estado general de salud en los rebaños afectados dan como resultado grandes pérdidas económicas significativas para la industria ganadera a nivel mundial. (Velasquez, 2022)

Este patógeno de origen viral, es responsable de una amplia variedad de manifestaciones clínicas que varían desde infecciones inaparentes o subclínicas hasta una enfermedad aguda y muchas veces fatal. (Paredes Galarza, 2022)

Estas manifestaciones clínicas afectan directamente en la producción y reproducción bovina, generando graves perjuicios observados en pérdidas en producción lechera, bajos índices de la tasa de concepción, abortos, momificación fetal, nacimiento de terneros débiles y aumento de la tasa de mortalidad neonatal. El VDVB se perpetúa en la naturaleza y en la ganadería bovina por la presencia de bovinos aparentemente sanos

infectados congénitamente denominados Persistentemente Infectados (PI) (Gomes Fernandes, y otros, 2018)

A medida que los sistemas de producción animal se intensifican cuantitativa o cualitativamente se hace necesario implementar medidas de bioseguridad en las fincas, ya que los factores de riesgo para las enfermedades de origen infeccioso se incrementan en la misma proporción que aumenta la densidad poblacional por unidad de superficie. En América Latina carece de análisis sobre el grado de incidencia y el impacto de las patologías reproductivas en hembras de ganadería bovina, lo cual ha impedido adoptar medidas sanitarias para controlar dichas enfermedades, que inciden en un elevado índice de mortalidad en bovino, y baja producción de leche y carne. La mayoría de las unidades de producción no disponen de un calendario de manejo sanitario de los animales. (Medina Leiva & Saballos Soza, 2017)

2.2. Etiología

Es causada por un Pestivirus de la familia Flaviviridae, de los que se reconocen dos genotipos: vDVB tipo 1 y vDVB tipo 2, éste último está asociado con cuadros agudos graves e induce enfermedades respiratorias severas, que en ocasiones se ven complicadas con un cuadro hemorrágico agudo, a menudo mortal. (SAG, 2022)

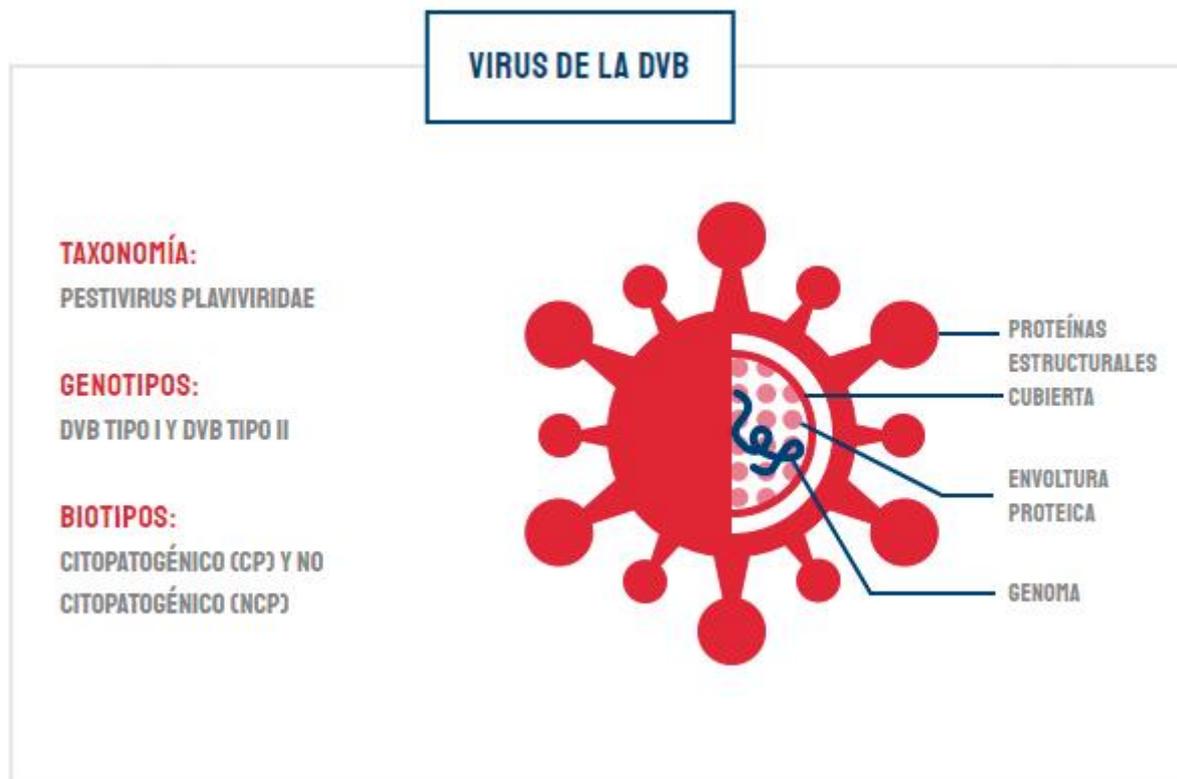
2.2.1. Genotipos

Hay dos genotipos de virus que causan diarrea infecciosa en las vacas, pero no difieren en virulencia. Anteriormente se pensaba que los virus con el genotipo BVDV-1 causan formas más leves de la enfermedad que el BVDV-2. Estudios posteriores no

confirmaron esto. La única diferencia: los virus del segundo tipo están menos extendidos en el mundo. (GARDEN Decorexpro.com, 2015)

El virus DVB tipo 1 es responsable de procesos leves con sintomatología inaparente, caracterizados por ligero aumento de la temperatura corporal y la presencia de lesiones moderadas restringidas al aparato digestivo y a órganos del sistema Linfoide; en vacas gestantes este genotipo puede inducir abortos y patologías reproductivas, al virus DVB tipo 2 se lo asocia con enfermedades agudas severas caracterizadas por presentar un cuadro hemorrágico agudo, conocido como síndrome hemorrágico, que es fatal para los animales. No se ha establecido una diferencia en la virulencia y en los mecanismos patogénicos de ambas especies. (Walz, y otros, 2001)

Figura 1. Estructura del virus.



Fuente: (Boehringer Ingelheim, 2021)

2.2.2. Biotipos

2.2.2.1. No Citopático

En la clasificación de los biotipos de la VDVB, el biotipo no citopático NCP es considerado una cepa in-vitro la cual se caracteriza por no lisar la célula en el proceso de replicación, en cuanto al biotipo citopático CP en menor grupo se desarrolla a partir del biotipo NCP mediante un proceso molecular de una proteína N2/ 3 propia del virus, las dos cepas pueden infectar al ganado bovino proporcionándole un estado de gravedad dependiendo la vulnerabilidad del mismo; se debe tomar en cuenta que existen ciertos factores muy importantes que permiten una evolución de la enfermedad y la gravedad de la misma, por ejemplo gestación, las defensas del animal si están altas o bajas, entre otras. La cepa no citopático CNP es la más peligrosa al momento de infectar al animal, es decir es la más patógena, la cual reacciona en el animal atacándolo de forma directa causando un estado de salud clínico, según estudios en Estados Unidos se encontró animales con procesos hemorrágicos graves y cuadros de trombocitopenia. (Carrillo Correa, 2019)

2.2.2.2. Citopático

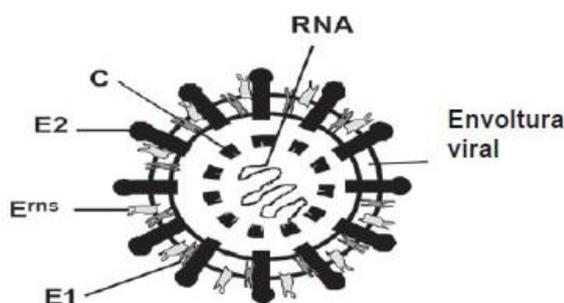
De acuerdo a lo detallado antes se sabe que entre los dos biotipos la cepa citopático puede llegar a matar células que son infectadas, en cambio la cepa no citopática no lo hace, de acuerdo a la infección persistente, la responsable es la cepa no citopático, la cepa citopática se desarrolla a partir de una cepa no citopática ya sea por secuencia de ARN o por una duplicación de la proteína NS3 propiamente. (Carrillo Correa, 2019)

2.3. Propiedades del virus

El Virus de la Diarrea Viral Bovina 1 (DVB-1), Virus de la Diarrea Viral Bovina 2 (DVB-2), virus de la Peste Porcina Clásica (CSFV) y virus de la Enfermedad de las

Fronteras (BDV) comprenden las cuatro especies reconocidas dentro del género Pestivirus y pertenecen a la familia Flaviviridae. Los miembros del género Pestivirus poseen viriones esféricos de forma icosaédrica de 40 a 60 nm de diámetro, contienen un nucleocapside que externamente se encuentra revestido por una envoltura lipídica que contiene tres importantes glicoproteínas virales denominadas, ERNS, E1 y E2. (Paredes Galarza, 2022)

Figura 2. Propiedades del virus.



Fuente: (Vargas, Jaime, & Vera, 2009)

2.4. Patogenia

Después del contacto con membranas mucosas de la boca o nariz, la replicación ocurre en células epiteliales con una predilección por las tonsilas palatinas, especialmente células epiteliales de la cripta. El virus presenta tropismo por células mitóticamente activas como: linfocitos, fagocitos mononucleares y células epiteliales. Se ha especulado que el biotipo cp se replica en la mucosa nasal en títulos más altos que el biotipo ncp, resultando en una eficiente diseminación en animales susceptibles. La replicación comienza con la adhesión a la membrana plasmática y penetración en la célula, parece ser que el receptor específico es una proteína de superficie de 50kD de las células, por mediación de la proteína de envoltura E2. (Morales & Siever, 2002)

Además ocurre fusión de la envoltura con la membrana endosomal - dependiente de pH -, y el virus ingresa al citoplasma mediante endocitosis mediada por receptor y libera su genoma en el citosol. (Rondon, 2006, pag 695)

Este virus tiene afinidad por las células y órganos Diana (monocito-macrófago, linfocitos, células dendríticas). Esta enfermedad causa la supresión de la inmunidad del animal lo que provoca que sean más susceptibles a la presencia de la enfermedad. (Garcia Bocanegra & Zafra Leva, 2019)

Los animales PI pueden presentar enfermedad de las mucosas (EM) cuando existe una mutación del biotipo ncp que produjo la infección fetal a un biotipo cp, o cuando el animal sufre una supe infección posnatal por un biotipo cp antigénicamente homólogo al biotipo ncp que dio lugar a la inmunotolerancia. (Garcia Bocanegra & Zafra Leva, 2019, pág. 24)

2.5. Sintomatología y lesiones

El virus se caracteriza por una amplia gama de formas clínicas, desde formas subagudas que se presentan de manera imperceptible hasta formas caracterizadas por el desarrollo de leucopenia, trombocitopenia y sangrado intenso.(Pedrera, y otros, 2007)

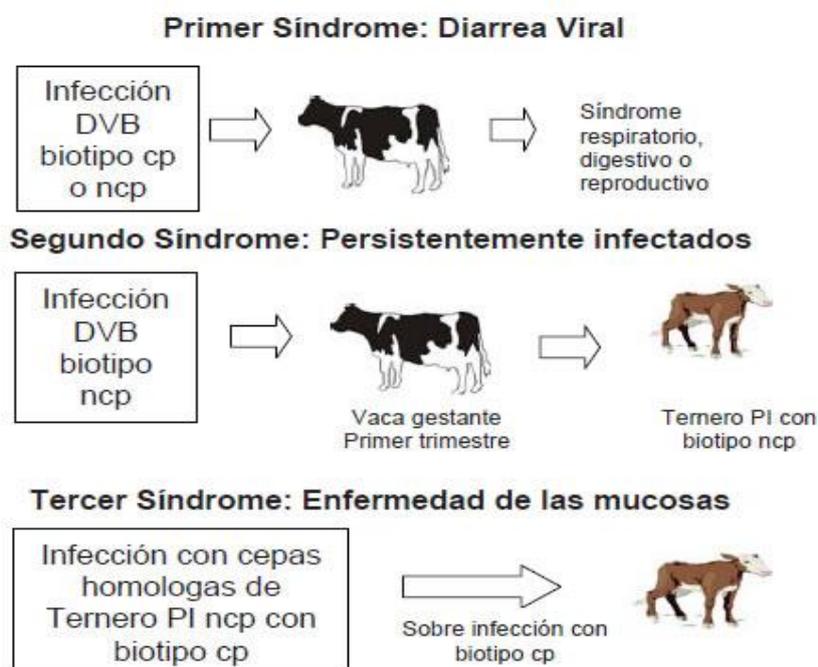
Se calcula que alrededor del 90% son casos del tipo subclínicos (sin síntomas externos) en vaquillas o vacas preñadas. Lo que quiere decir que la hembra no mostrara signos clínicos de la enfermedad pero lo que causa el problema es el embrión o feto. Los terneros nacidos con "infección persistente" se mezclan con animales susceptibles y pueden contagiar a todo el lote. En los cuadros clínicos la enfermedad puede producir: fiebre, depresión y diarrea con sangre, también puede asociarse con otras bacterias

integrándose al Complejo Respiratorio Bovino. En cuanto a la presentación clínica, la infección en vacas preñadas puede ocasionar muerte embrionaria, abortos o terneros nacidos muertos. (Medina Leiva & Saballos Soza, 2017, pag 11)

2.6. Manifestaciones clínicas

La infección del ganado con el VDVB puede dar como resultado la aparición de tres síndromes como tal. Diarrea viral bovina (o infección postnatal primaria), la infección persistente y la enfermedad de las mucosas que va a desarrollar una infección respiratoria, digestiva. En la Infección postnatal, el reproductiva con sintomatología subclínica o severa animal se puede infectar con un biotipo cp o ncp y con alta mortalidad (Walz, y otros, 2001)

Figura 3. Patogenia del virus.



Fuente: (Vargas S., Jaime, & Vera, 2009)

2.6.1. Infecciones subclínicas:

La mayoría de las infecciones son subclínicas o de carácter moderado, con fiebre, descarga oculonasal, leucopenia transitoria, elevada morbilidad y baja mortalidad. Se desarrollan anticuerpos neutralizantes 14 a 28 días post infección y consecuentemente la protección contra reinfecciones por cepas homólogas del virus es de por vida. (Velasquez Quinaluisa & Toro Molina , 2022)

2.6.2. Infección aguda:

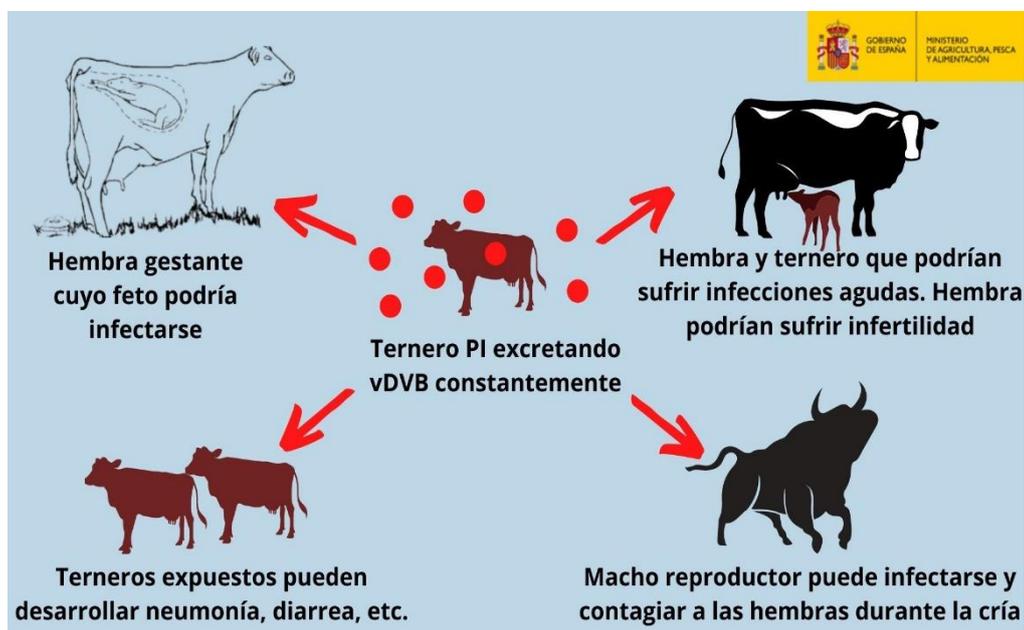
La totalidad de las infecciones agudas están causadas por el biotipo NCP, generalmente ocurre en animales entre 6 meses y 2 años de edad. El periodo de incubación es de 5-7 días; seguido de fiebre transitoria y viremia por encima de los 15 días. Luego del ingreso del virus se replica en las células epiteliales de la mucosa oro nasal y tonsilas, la progenie se disemina vía sanguíneo y linfática, como virus libre o asociado a linfocitos y monocitos. Además, las infecciones agudas causan y producen atrofia ovárica e infertilidad temporal. (Velasquez Quinaluisa & Toro Molina , 2022)

La enfermedad produce múltiples expresiones clínicas; mortalidad embrionaria o fetal, abortos, malformaciones congénitas, mortalidad perinatal, retraso del desarrollo, patologías respiratorias y digestivas variadas. En ocasiones el problema de DVB es subestimado, y su diagnóstico erróneo o diferenciado por que las lesiones son variables y los síntomas se asocian con otras enfermedades como por ejemplo el Complejo Respiratorio Bovino, Fiebre del Transporte y Fiebre indiferenciada. (Glauber, 2013)

Las infecciones de las hembras reproductoras pueden dar lugar a fallos en la concepción o a infecciones embrionarias y fetales, que provocan abortos, animales

nacidos muertos, anomalías teratogénicas o el nacimiento de terneros infectados de forma persistente. (OIE, 2023)

Figura 4. Animal persistentemente infectado.



Fuente: (Gobierno de España, 2023)

2.6.3. Infección persistente

Únicamente el biotipo ncp del VDVB puede establecer infecciones persistentes. La mayoría de los terneros con infección persistente nacen de vacas normales susceptibles que fueron infectadas con el biotipo NCP durante los 4 primeros meses de gestación (120-125 días), pero también las vacas con infección persistente dan crías con la misma condición; pudiendo generarse en un hato clones de animales persistentemente infectados. (Rivera H. , 1993)

La capacidad de este biotipo por inhibir la producción de interferón tipo 1 en el feto, posibilita la supervivencia del virus dentro del huésped y establezca la infección persistente. Los fetos infectados dentro de este periodo desarrollan inmunotolerancia

innata y adaptativa a la cepa infectante del VDVB. El organismo del bovino jamás logrará erradicar el virus y el animal nacerá infectado de manera persistente. (Rivera H. , 2008)

Por esta razón en los bovinos PI, la vida útil es significativamente corta y generalmente los terneros mueren durante los primeros meses de vida y tan solo el 28% de estos animales logra sobrevivir hasta los dos años de edad. Cuando estos bovinos logran sobrevivir hasta la etapa reproductiva, transmiten el virus a su progenie, de esta forma los machos enfermos transmiten el virus a través del semen y las hembras PI gestantes generan el nacimiento de terneros PI. (Paredes Galarza, 2022)

2.6.4. Enfermedad de las mucosas

Los animales con viremia persistente pueden sucumbir posteriormente a la enfermedad de las mucosas. Se ha observado que este síndrome es consecuencia de la infección de un animal IP por un virus citopático antigénicamente similar, que puede tener lugar por sobre-infección, recombinación entre biotipos no citopáticos, o mutación del biotipo persistente. (OIE, 2007)

Se caracteriza por ser una enfermedad progresiva que genera diarrea incontrolable y maloliente, deshidratación y enflaquecimiento progresivo, descarga nasal y ulceraciones en las mucosas de la cavidad oral y el tracto gastrointestinal. Una leucopenia severa se puede presentar en los primeros estadios de la enfermedad. (Mora Zapata & Salgado Vargas, 2013, pág. 4)

2.7. Lesiones

La mayoría de las infecciones son subclínicas, presentando sólo lesiones moderadas en aparato digestivo y sistema linfoide. En las hembras puede producir infertilidad temporal y en preñadas causa aborto a partir de los 4 meses de gestación. Afecta con mayor frecuencia a animales de 6-24 meses de edad, cursando con una morbilidad generalmente alta y una baja o nula mortalidad. La forma aguda grave de DVB es poco frecuente, presenta elevada morbilidad y mortalidad, afecta a animales de todas las edades. Se caracteriza por un cuadro de fiebre alta (de 40 a 41°C), agalaxia, diarrea acuosa y alteraciones respiratorias intensas. A menudo se produce la muerte del animal a las 48 horas del comienzo de la sintología. Síndrome hemorrágico, con una mortalidad cercana al 25%, presenta pirexia, diarrea sanguinolenta, congestión en conjuntiva y mucosas, hemorragias petequiales y equimosis en mucosas. Los animales permanentemente infectados (PI) están predisuestos a desarrollar una forma letal denominada enfermedad de las mucosas, que se caracteriza por la aparición de diarreas sanguinolentas, erosiones, ulceraciones y hemorragias en las superficies mucosas de la cavidad oral, esófago, pre-estómagos, abomaso e intestino y muerte a las dos o tres semanas de la aparición de los signos clínicos. (SAG, 2022)

2.8. Diagnóstico

El diagnóstico se basa únicamente en el aislamiento del virus o detección del antígeno viral específico. Serología, Aislamiento viral, Detección de antígenos mediante ELISA, Inmunohistoquímica, PCR. (SAG, 2022)

El diagnóstico se puede realizar basándose en el historial clínico de los animales, registros de reproducción, signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas. El diagnóstico de confirmación se basa en el aislamiento del virus en cultivos celulares, la detección del antígeno vírico en los tejidos y en la serología. Entre las muestras que deben enviarse para realizar un aislamiento vírico se encuentran las heces, exudados nasales, sangre y tejidos recogidos en la necropsia, así como fetos abortados. Dado que el virus no es citopático en los cultivos celulares, su presencia se determina mediante inmunofluorescencia. (GARDEN Decorexpro.com, 2015)

2.8.1. Serología

La mejor forma de confirmar la infección aguda por el VDVB es la observación de seroconversión en muestras pareadas secuenciales, teóricamente de varios animales del grupo. Las muestras pareadas (tomadas en las fases agudas y de convalecencia) deben tomarse con un intervalo mínimo de 21 días y los análisis deben realizarse en paralelo empleando la misma prueba. Las más utilizadas son el enzimoanálisis y la prueba de neutralización del virus. (OIE, 2023)

2.8.2. Aislamiento Viral

Para realizar el aislamiento viral, se requiere mano de obra calificada para trabajar con células, equipamiento y disponibilidad de cultivos celulares. El procedimiento lleva como mínimo tres semanas de trabajo debido a la necesidad de realizar múltiples pasajes en líneas celulares susceptibles al VDVB. A través de estos pasajes celulares se logra aumentar la concentración del virus y el último paso implica el 15 revelado a través de la

detección del antígeno viral en las células infectadas con anticuerpos policlonales o monoclonales marcados con fluorocromos (inmunofluorescencia) o bien detectar el genoma viral por RT-PCR. (Reacción de transcriptasa reversa seguido de reacción en cadena de polimerasa). (Pecora & Perez, 2017)

2.8.3. Detección de antígenos mediante ELISA.

El diagnóstico de animales persistentemente infectados (PI) es clave para la erradicación, se debe utilizar una prueba con alta sensibilidad y alto valor predictivo negativo (VPN) para evitar dejar animales falsos negativos en el rebaño para que la infección persista. La técnica de ELISA de captura (ACE) sobre muestras de piel de oreja es la que demuestra mayor sensibilidad y mayor VPN. En los animales detectados como positivos, se debería repetir el ensayo tres semanas después para corroborar la infección y el estado de PI. Esta técnica se puede utilizar con muestras de piel de la oreja, sangre con anticoagulante, también suero o plasma. (Combessies, 2016)

La muestra de piel de oreja tiene la ventaja que, el resultado, no es afectado por la presencia de anticuerpos calostrales ni de infección natural, así que se recomienda el muestreo en terneros a partir de los tres meses de edad, aprovechando el momento del caravaneado, utilizando un sacabocado o un señalador. Los terneros son la categoría con mayor probabilidad de encontrar los PI e, indirectamente, estamos controlando la madre, ya que se asume que un ternero PI negativo proviene de una madre PI negativa. (Combessies, 2016)

- ELISA tipo sándwich, para detección de antígeno.

- ELISA para detección de anticuerpos, del cual hay dos kits distintos:
- ELISA indirecto para la detección de anticuerpos totales.
- ELISA competitivo para la detección de anticuerpos contra la proteína no estructural P80 (NSP2-3). Esta prueba es capaz de detectar la infección activa de DVB aún si están vacunando, siempre y cuando la vacuna sea inactivada, ya que este tipo de vacunas no inducen la producción de anticuerpos anti-P80. (Serrano, 2019)

2.8.4. Inmunohistoquímica

El vDVB infecta varios órganos y tejidos del animal. A través de biopsias se ha obtenido éxito para detectar el vDVB ganglios linfáticos, encéfalo, abomaso y placenta. En el caso de animales vivos, se realiza biopsias de piel de preferencia del pabellón auricular, las cuales son útiles para la detección de animales persistentemente infectados. (OIE, 2007)

2.8.5. PCR

Las pruebas de diagnóstico molecular detectan directamente el ARN genómico viral. Estos métodos tienen ventajas sobre el aislamiento del virus porque no interfieren con los anticuerpos neutralizantes y, por lo tanto, no afectan la sensibilidad y especificidad de la prueba. No obstante, es necesario normalizar pruebas moleculares como el RT-PCR, ya que esto haría posible la realización de un diagnóstico con una muy alta sensibilidad y especificidad que incluiría a los animales PI, haciendo posible la realización de programas de control y prevención detectando dichos individuos. Así mismo, hace posible el desarrollo de futuras investigaciones en cuanto a genotipificación

viral, que permitirían la caracterización molecular de cepas colombianas. En el presente estudio se describe el proceso de normalización de la prueba de RT-PCR para detección del VDVB. (Burbano C., Vera A., & Ramírez N, 2006)

2.9. Tratamiento

“No hay un tratamiento específico, pero pueden ayudar las terapias de sostén a base de astringentes digestivos y de soluciones parenterales de electrolitos. Se tratan son las enfermedades secundarias que se generan por la inmunosupresión” Se requiere tomar medidas preventivas específicas como la vacunación, para evitar y controlar la aparición de síntomas derivados de la enfermedad. Aplicar virus vivo en novillas de levante, y en vacas vacunar con virus muerto para evitar la reactivación viral y producción de abortos. Así se controlará la sintomatología en el hato ya que no hay tratamientos para esa oleada viral. (Cuervo, 2017)

2.10. Control y Erradicación

Para el control en la aparición de esta enfermedad se requiere de pruebas diagnósticas en los programas de control, permitiendo así la vigilancia o monitoreo de la prevalencia a nivel del hato ganadero, así como también a nivel regional; establecer el estatus del hato frente a la enfermedad, e identificar animales PI para su posterior eliminación. Los métodos de diagnóstico incluyen: detección de antígenos, detección de anticuerpos y detección del genoma viral. Por ahora, estas vacunas deberían usarse como una medida de bioseguridad adicional en lugar del concepto clásico de control. Además, el principal objetivo de la vacunación es prevenir el pasaje del virus al feto para evitar las fallas reproductivas causadas por el virus. (Vargas, Jaime, & Vera, 2009)

A la fecha, se tiene suficientes datos de la biología del virus, patogenicia, y

epidemiología de la enfermedad, así como las técnicas diagnósticas necesarias para considerar la erradicación de la DVB basadas en la bioseguridad, eliminación de animales PI y vigilancia, como lo demuestran los resultados de los exitosos programas de control que están efectuándose en muchos países europeos. (Rivera H. , 2008)

El programa también implementa medidas de bioseguridad como controlar el movimiento de ganado entre fincas, aislar el ganado nuevo que ingresa a la finca, utilizar semen certificado y libre de enfermedades, controlar el movimiento de empleados al rebaño, entre otros. El diagnóstico de los animales PI es de gran importancia debido a que ellos constituyen los principales diseminadores de la enfermedad representando entre el 1 al 2% de la población bovina afectada. (Vargas, Jaime, & Vera, 2009)

2.10.1. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas – ELISA

Su fundamento se basa en la cuantificación de un antígeno inmovilizado sobre una superficie sólida mediante el empleo de un anticuerpo específico ligado a una enzima de forma covalente, con el fin de detectar la respuesta inmunológica de la muestra a evaluar. La cuantificación del anticuerpo unido al antígeno es proporcional a la cantidad de antígeno presente, su determinación se realiza por espectrofotometría al medir la transformación de un sustrato transparente en un producto de color a través de la enzima enlazada. (Abbas, Litchman, & Pillai, 2015)

Los test de ELISA pueden ser competitivos o no competitivos; en el ELISA competitivo el anticuerpo de la muestra compite con el conjugado por los sitios de unión al antígeno, una muestra es positiva cuando no hay color, ya que el sustrato no encontrará la enzima porque el conjugado ha sido desplazado por el anticuerpo presente en la muestra, es decir, cuantifica el antígeno presente en la muestra; mientras tanto, en el ELISA no

competitivo se enfrenta la muestra con el antígeno o anticuerpo que está en la fase sólida, la positividad de este test es dado cuando al formarse el complejo antígeno-anticuerpo y al agregar el conjugado estos reaccionan con el sustrato y generan color, dentro de estos se encuentran dos tipos: los directos detectan antígeno y los indirectos detectan anticuerpos. (Abbas, Litchman, & Pillai, 2015)

2.10.1.1. Principios de la técnica ELISA

El concepto y procedimiento para la detección de anticuerpos o antígenos por ELISA es exactamente el mismo. Comience por obtener la proteína objetivo (antígeno o anticuerpo). Las proteínas individuales requieren un proceso separado para obtener una concentración purificada de esa proteína en particular. Determinar a qué proteína o proteínas apuntar es un proceso científico complejo. (Ramirez, 2022)

Idealmente, una prueba que se dirija a una proteína que sea exclusiva del patógeno de interés (no presente reacciones cruzadas con otros patógenos), sea inmunogénica (para detectar anticuerpos) o esté presente en altas concentraciones (para la detección de antígenos); se dirige a una proteína que se sabe que está estrechamente asociada con la prevención de enfermedades y siempre estará presente. Desafortunadamente, la mayoría de estos criterios son desconocidos y se puede obtener fácilmente una sola proteína y encontrarla en una muestra o mezcla de múltiples proteínas (virales o bacterias completas) utilizadas. Aunque el uso de virus o bacterias enteras pueda ser fácil, es más probable que produzcan reacciones cruzadas con otros patógenos. (Ramirez, 2022)

2.10.1.2. Pasos generales del proceso.

Paso 1. Se recubren previamente los micropocillos con los antígeno(s) objetivo

(para detectar anticuerpos) o anticuerpos (para detectar antígenos).

Paso 2. Se añaden las muestras a analizar e incubar para permitir la unión entre los antígenos y los anticuerpos.

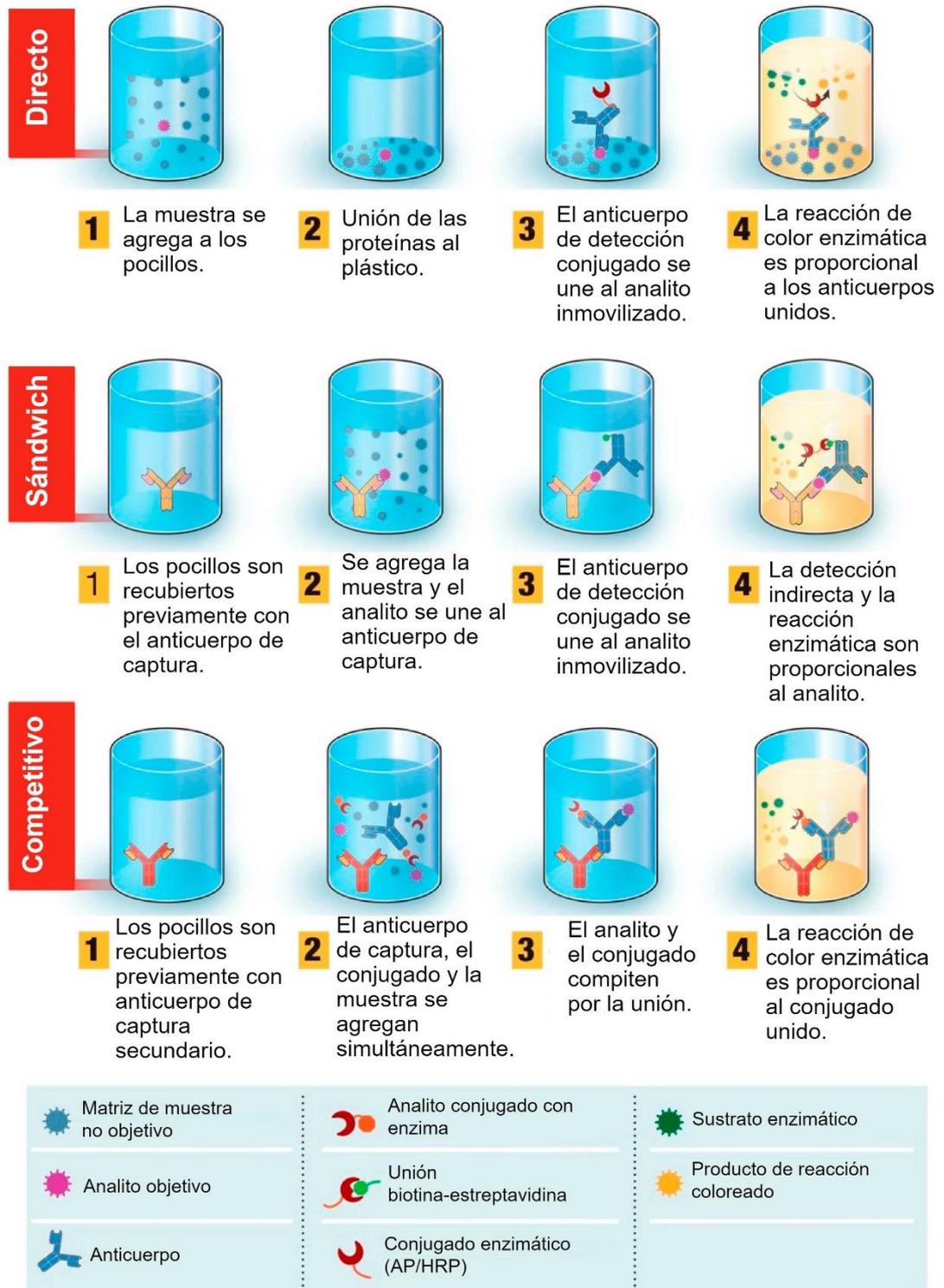
Paso 3. Se retira la muestra y se añaden los anticuerpos especiales que se adherirán al lado opuesto de los anticuerpos (parte inferior de la “Y” del anticuerpo en la detección de anticuerpos) o de los antígenos (parte superior de la “Y” en la detección de antígenos). Entonces se incuba la muestra para permitir la unión y se lava para asegurarnos de que se eliminan los anticuerpos o antígenos que no se hayan adherido (es decir, los no objetivo).

Paso 4. Se añade el anticuerpo que está marcado con un detector que emite fluorescencia y se adherirá a los anticuerpos especiales del paso 3 (se adhieren a la parte inferior de la “Y” del anticuerpo; es el mismo objetivo tanto para la detección de antígenos o de anticuerpos). En ese momento la muestra se incuba de nuevo para permitir la unión y se vuelve a lavar para asegurarnos de eliminar los anticuerpos marcados que no se hayan adherido.

Paso 5. Se añade el reactivo que desencadenará la fluorescencia de los anticuerpos marcados que se hayan adherido y luego se incuba para asegurar la unión.

Paso 6. Se lee la muestra, normalmente usando una máquina especial calibrada a una longitud de onda específica para cuantificar el cambio de color (referido como absorbancia). Hay algunas ligeras variaciones en este proceso dependiendo de si es un ELISA directo, indirecto o sándwich; cada tipo tiene sus ventajas y desventajas (que no exponemos aquí) pero, al final, todas obtienen los mismos resultados; cuanto mayor sea la absorbancia, o cambio de color, mayor será la concentración esperada del antígeno o anticuerpo objetivo en la muestra analizada. (Ramirez, 2022) **sacado de la misma pagina**

Figura 5. Pasos generales del proceso.



Fuente: (Ramirez, 2022) adaptado de Ghaffari et al. 2020.

2.10.2. ELISA indirecto

ELISA indirecto corresponde a una configuración de inmunoensayo en la que el antígeno estándar o comercial se une a los pocillos de la placa para detectar o "cribar" anticuerpos en muestras de suero. Estas pruebas a menudo se denominan pruebas serológicas o, en este caso, ELISA serológicas. Luego, el complejo inmunitario se detecta mediante un anticuerpo secundario conjugado con una enzima catalítica. (Gan & Patel, 2013)

En la interpretación del ensayo se debe tener en cuenta que, la concentración de antígeno específico presente en el suero se correlaciona directamente con la intensidad del color que resulta de la acción de la enzima sobre su sustrato. Una desventaja principal del ELISA indirecto es que el método de inmovilización del antígeno no es específico. Cuando se utiliza suero como antígeno de prueba, todas las proteínas de la muestra pueden adherirse a los pocillos de una placa de microtitulación. Esta limitación, sin embargo, se puede superar utilizando un anticuerpo de captura único para el antígeno de prueba específico para seleccionarlo del suero, como se ilustra en la técnica sándwich a continuación. (Gan & Patel, 2013)

2.10.3. ELISA directo.

Los antígenos de los virus unidos a una fase sólida plástica se detectan mediante la adición de un anticuerpo conjugado. (Ramírez, 2022) El ensayo directo corresponde a un tipo de formato en el cual, el antígeno presente es una muestra clínica de interés, es la molécula que se adhiere a la placa para reaccionar posteriormente con un anticuerpo específico dispensando en los pozos y que esta conjugado directamente con una enzima reveladora. Este tipo de ensayos se usa generalmente para la valoración de un antígeno

específico en una muestra, este tipo no es muy usado. (Abyntek, 2019)

2.10.4. ELISA competitivo

El evento clave en ELISA competitivo es la reacción competitiva entre el antígeno en la muestra y el antígeno unido a los pocillos de la placa de microtitulación del anticuerpo primario. En primer lugar, el anticuerpo primario se incubó con el antígeno de la muestra y el complejo antígeno-anticuerpo resultante se añadió a los pocillos recubiertos con el mismo antígeno. Después del período de incubación, los anticuerpos no unidos se eliminan por lavado. Cuantos más antígenos haya en la muestra, más anticuerpos primarios se unirán a los antígenos de la muestra. Como resultado, habrá menos anticuerpos primarios para unirse al antígeno recubierto en el pocillo. Se agrega un anticuerpo secundario conjugado con enzima, seguido de un sustrato para obtener una señal cromogénica o de fluorescencia. La ausencia de color indica la presencia de antígeno en la muestra. (Gan & Patel, 2013)

2.10.5. Elisa sándwich en la prevalencia de la enfermedad.

El formato ELISA Sándwich, es utilizado para identificar un antígeno específico en una muestra, usando anticuerpos específicos contra diferentes epítopos del mismo antígeno, lo que le confiere una muy alta especificidad a la prueba. En este caso a diferencia del anterior, el inmunocomplejo (sándwich) es reconocido por un anticuerpo secundario conjugado con una enzima catalizadora. (Gan & Patel, 2013)

Las pruebas, llamadas ELISA de sándwich, utilizan dos anticuerpos específicos contra un antígeno para capturarlo como un sándwich en una placa de detección. En el

primer paso, el antígeno de interés se agrega al anticuerpo primario montado en la placa. Durante la segunda incubación, el anticuerpo secundario se agrega al complejo antígeno-anticuerpo primario formado en el primer paso. Los anticuerpos secundarios pueden conjugarse directamente con la enzima, lo que requiere solo la adición de un sustrato, o pueden unirse a un marcador, lo que requiere la adición de un segundo compuesto que reaccionará directamente con el sustrato.(Leon, 2019)

Cuando se agrega un sustrato cromogénico a un ensayo de desarrollo de color, las muestras antigénicas altas producirán más señales que las muestras antigénicas bajas, produciendo una señal proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra. Para estimar la concentración de antígeno presente en la muestra, la medida se extrapola utilizando una curva estándar. Sandwich ELISA es altamente específico porque utiliza un par de anticuerpos para la captura y detección, en lugar de inmovilizar directamente el antígeno en una placa de plástico como en ELISA directo. Esto permite que el antígeno de interés se concentre en la superficie de la placa, incluso si está presente en concentraciones muy bajas en la mezcla inicial. (Leon, 2019)

2.11. Resumen del estado del arte del estudio del problema

Mediante el trabajo de investigación realizado se puede dar a concluir que no existen proyectos de investigación relacionados de la Universidad Politecnica Salesiana y el grupo de investigación GLOBAGEN, en cuanto al tema de ELISA Sandwich..

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Materiales físicos de campo.

Tabla 7. *Equipos físicos de campo.*

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Bretes	1	Unidad
Narigueras	1	Unidad
Sogas	2	Unidad
Agujas vacutainer 20G	200	Unidad
Guantes	2	Caja
Algodón	1	Caja
Alcohol	1	Litro
Tubos vacutainer –	200	Unidad
Etiquetas	200	Unidad
Cooler	1	Unidad
Overol	1	Unidad

3.1.2. Material biológico de campo.

Tabla 8. *Equipos biológicos de campo.*

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD
Bovinos	182

3.1.3. Material de laboratorio.

Tabla 3. *Equipos físicos de laboratorio.*

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Papel	1	Rollo
Tubos eppendorf	1	Caja
Gradilla de laboratorio	3	Unidad
Temporizador	1	Unidad
Botella de lavado	1	Unidad
Pipetas	2	Unidad
Jeringas	1	Unidad
Lector de ELISA	1	Unidad

Tabla 9. *Equipo personal de laboratorio.*

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Mandil	1	Unidad
Cofia	1	Unidad
Guantes	2	Caja
Mascarilla	1	Unidad

3.1.4. Material químico.

Tabla 10. *Material químico de laboratorio.*

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Kit ELISA	1	Unidad
Alcohol etílico	1	Litro

Tabla 11. *Material biológico de laboratorio.*

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD
Sangre de bovinos	182

3.1.5. Materiales de oficina.

Tabla 12. *Materiales de oficina.*

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Hojas de papel bond	1	Resma
Esferos	1	Unidad
Hojas de registro	1	Unidad
Carpeta	1	Unidad
Cinta adhesiva	1	Unidad
Laptop	1	Unidad
Tinta de impresión	1	Unidad

3.2. Metodología

El presente trabajo de investigación corresponde a un estudio epidemiológico causal, descriptivo, prospectivo, transversal que determina la presencia de anticuerpos contra un patógeno en el primer ingreso y luego calcula la prevalencia de la enfermedad en la población de estudio.

Dicho proceso experimental tendrá como objetivo 182 muestras de sangre extraídas de bovinos del cantón San Fernando este proceso experimental se llevara a cabo en los laboratorios de ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana

3.3. Proceso de la investigación.

3.3.1. Selección de los animales

Los animales serán elegidos en fincas y pequeños productores que son pertenecientes al cantón San Fernando, teniendo en cuenta la edad, el sexo y el sector a la que pertenecen. Los animales seleccionados serán aquellos que demuestren síntomas clínicos a la cual corresponda aparentemente a Diarrea Viral Bovina.

3.3.2. Recolección de las muestras

- Limpieza y desinfección del área.
- Extracción de sangre a través de la vena coccígea/yugular aproximadamente 5 ml por bovino con aguja calibre 16G con la ayuda de personal capacitado y personas del lugar.
- Se colocará la muestra en tubos vacutainer sin anticoagulante y posteriormente se dejará a temperatura ambiente hasta la formación del

- coagulo. - Identificaremos cada muestra con su respectivo número, la edad del animal, sexo y el sector.
- Posteriormente se refrigerará las muestras en un cooler con geles a temperatura de aproximadamente 5°C.

3.4. Análisis estadístico

En este proyecto de investigación, el diseño estadístico empleado en la misma será un análisis descriptivo-prospectivo de corte transversal y causal, este proyecto tendrá para evaluar la prevalencia de diarrea viral bovina en muestras de sangre tomadas con suero bovino del área de San Fernando y alrededores. La población a muestrear es de un total de 182 animales bovinos denominados unidades experimentales obtenidos a partir de un muestreo aleatorio simple (MAS) que corresponde a un muestro simple para poblaciones no identificadas. Para el análisis de los resultados de esta enfermedad se debe considerar parámetros tal como, edad, sexo, raza, estado de desarrollo, tipo de reproducción, antecedentes de abortos, número de partos y estado de vacunación.

3.5. Población y muestra

3.5.1. Población de datos

El estudio se realizará en las fincas, criaderos y ganaderías que existe dentro del cantón San Fernando y sus alrededores, tomando en cuenta parámetros tales como edad, sexo, raza, estado de desarrollo, tipo de reproducción, antecedentes de abortos, número de partos y estado de vacunación.. Para realizar el presente estudio

se utilizará un análisis estadístico descriptivo seguido de diferentes gráficos de comparación.

Para el diseño estadístico se establecerá un muestreo aleatorio simple, considerando un tamaño mínimo de la muestra, con un cálculo de prevalencia estimada de un 13% con un margen de error de 5% y un nivel de confianza de 95% en cada uno de los campos respectivos. Dándonos como resultado un total de 182 muestras a obtener.

3.5.2. Muestra

La muestra será de 182 sueros de bovinos que corresponden al cálculo del TMM, tomando en cuenta la prevalencia esperada de 13% de acuerdo con el histórico de prevalencias en investigaciones similares en condiciones geográficas y ambientales similares al Cantón San Fernando. Para el cálculo de la prevalencia de Diarrea Viral Bovina se utilizará la fórmula de MAS (muestreo aleatorio simple) para poblaciones infinitas o no conocida.

$$N = \frac{Z^2 * p * q}{i^2}$$

Donde:

Z: nivel de confianza 95%: (1.96)²

P: probabilidad de prevalencia 13%: (0.137)

Q: 1-p: (0.87)

D: error estimado 5%: (0.05)

$$N = \frac{(1.96)^2 * (0.137) * (0.86)}{0.05^2} = 182$$

Para el cálculo del TMM el número de animales a evaluar será de un total de 182 bovinos, para el trabajo de estudio se tomará en consideración la validez de incorporar 2 animales más para un muestreo total de 184, así mismo para el aprovechamiento del total del kit de diagnóstico.

3.5.3. Procedimiento de la muestra

Colocar todos los reactivos a temperatura ambiente 21°C antes de ser utilizados y homogenizarlos por vortex o por inversión.

Muestras de suero o plasma

1. Distribuir:

- 50 µl de Diluyente 2 en cada pocillo.
 - 20 µl de Control negativo en los pocillos A1 y B1.
 - 20 µl de Control positivo en los pocillos C1 y D1
 - 50 µl de cada muestra a analizar en cada uno de los pocillos restantes.
2. Cubrir la placa, agitar con un agitador de placas por 1 minuto (a 500 rpm) e incubar 60 min \pm 6 min a 37C (\pm 2°C).

Pasos comunes a todo tipo de muestras

1. Vaciar los pozos, lave cada pocillo 5 veces con al menos 300ul de la solución de lavado evitar el desecado de los pocillos entre los lavados
2. Preparar el conjugado 1x diluyendo el conjugado concentrado 10x al 1-10 en diluyente 12.
3. Distribuir 100 ul del conjugado 1x a todos los pocillos.
4. Cubrir la placa e incubar 30 min a 37C.

5. Vaciar los pocillos lavar 3 veces cada pocillo con aproximadamente 300 ul de solución de lavado
6. Distribuir 100 ul de la solución de revelación a cada pocillo
7. Cubrir la placa e incubar 15 min en oscuridad
8. Agregar 100 ul de solución de parada a cada pocillo para detener la reacción.
9. Leer a una D.O a 450 nm.

3.5.4. Interpretación de los resultados.

Validación

- La prueba se valida si el valor medio de la densidad óptica de los controles positivos es superior a 0.500
- El cociente entre la media de los controles positivos y la media de los controles negativos es superior a 3.3

Interpretación

- $S/P \% = \frac{DO_{muestra} - DO_{cn} - DO_{cp} - DO_{cn}}{DO_{cp} - DO_{cn}} * 100$
- Las muestras que presenten un S/P% inferior al 35% son considerados negativos
- Superior o igual a 35% son considerados positivos. (ID. Vet. BVD P80 Antigen Capture. 2020)

3.6. Operalización de variables

3.6.1. Variable Independiente

Tabla 8. *Variable Independiente: Suero de origen Bovino*

Concepto	Categorías	Indicadores	Variables
Unidad experimental que facilitara los indicadores.	Físico	- Número de hembras	- Numérico - ml
	Biológico	- Cantidad de sangre - Cantidad de suero - Positivo - Negativo	- Numérico

3.6.2. Variable dependiente

Tabla 9. *Variable dependiente: ELISA para DVB*

Concepto	Categorías	Indicadores	Variables
Método analítico que depende de la reacción Ag-Ac	Biológico	Cantidad uniones Ag-Ac mediante kit ELISA sándwich	- Numérico

3.7. Consideraciones éticas

Para llevar a cabo el trabajo de investigación se contemplara los aspectos éticos en cuanto a Bienestar animal como prioridad. Al tratar de encontrar el agente causal de la

molestia que presenta el paciente, evitando al máximo el estrés, fatiga u otras acciones que puedan deprimir aún más al paciente.

Ética profesional: la búsqueda constante de nuevas técnicas y actualizaciones en la profesión de Medicina Veterinaria es vital para el mantenimiento de la competencia técnica profesional, la mejora continua de su práctica y bienestar animal y con ello nos lleve a fórmanos como unos grandes profesionales de la salud. (Ulloa, 2018)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Prevalencia total

Tabla 10. *Prevalencia total.*

Prevalencia total	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
NEGATIVO	176	96,70%	92,96%	98,78%
POSITIVO	6	3,30%	1,22%	7,04%
TOTAL	182	100,00%		

De acuerdo con el trabajo de investigación realizado en la zona de San Fernando, de las 182 muestras obtenidas para determinar la prevalencia de diarrea viral bovina, mediante la técnica de ELISA SANDWICH, como se puede observar en la tabla 10, se obtuvo 3,30% (6/182) de casos positivos y el 96,70% (176/182) de animales negativos.

Datos cercanos al lugar de la investigación nos dice (Yanzaguano, 2022) en un estudio realizado en la Zona de San Gerardo, ha obtenido un 44,62% de casos positivos y el 3,23% de animales dudosos. De igual forma (Pacheco, 20221) en la comunidad de San Pedro de Cañar obtuvo un 31,52% de casos positivos y un 67,39% de animales negativos a la enfermedad.

En comparación con los resultados obtenidos en la evaluación de la enfermedad según (Gonzales Carbajal, 2016) se aprecia que la prevalencia de la DVB del cantón Saraguro es de 27,92% a comparación con la prevalencia del cantón San Fernando que es de un 3,30% siendo menos que en dicho cantón. Según (Moreno Peña, 2019) su investigación dio como resultado un total de 16 animales positivos a la presencia de

anticuerpos de diarrea viral bovina representando el 11,04% del total muestreado, considerado como positivo mientras que los Negativos son de 129 animales representados con un 88,97%. De igual manera en el cantón de Santa Rosa (Carrillo Correa, 2019) nos dice que la población muestreada fue un total de 100 animales tomados de 3 fincas del Cantón Santa Rosa, cuyas muestras fueron trabajadas con la técnica molecular PCR y arrojaron un 100% de Negativos a la presencia del virus de DVB. Dándonos a entender que la prevalencia de DVB en estos sectores es relativamente baja, pero debemos tener en cuenta el número de animales muestreados, el lugar y el método de evaluación.

De acuerdo con la tabla 11, el lugar con mayor prevalencia de diarrea viral bovina es en San Fernando con un 3,30% (6/182), siendo que, en comparación con el sector de San Pablo, no existe prevalencia de la enfermedad. Dado que los positivos de este lugar son nulos, la información de esta nos aporta para generar una información útil para los ganaderos y profesionales veterinarios que trabajan en esta zona, así también para que se recomiende el establecimiento de calendarios sanitarios que permitan el control de esta enfermedad.

Con respecto a los resultados de la tabla 12, de acuerdo al sexo nos dice que, de los 182 animales muestreados, 6 hembras (6/182) es decir el 3,30% de la población muestreada resulta positivo a la prevalencia de la enfermedad, y por tanto el 97,93% es decir (176/1782) permanecen negativos a la presencia de la enfermedad.

Igualmente en los datos investigados de (Pacheco, 20221) se encuentra una mayor prevalencia en hembras con un total de 98,28%, mientras que en machos solo existe el 1,72%, seguido de (Yanzaguano, 2022) con una prevalencia de 100% siendo en hembras el contagio más común. Según los datos descritos, toda la población muestreada representa totalmente por hembras, ya que por la descripción de la enfermedad, prevalece y afecta principalmente a las hembras, de igual forma en el estudio de (Moreno Peña, 2019) nos dice que a las hembras y los machos no tiene una igualdad en el muestreo debido a que solo existen 2 animales machos con el 1,4% y el resto son hembras 98,6% por lo tanto realizan una estadística descriptiva.

En la tabla 13, los resultados de la prevalencia de esta enfermedad de acuerdo a la edad nos dicen que, en la edad de 3 años existe únicamente un animal positivo a la enfermedad (1/6) con una prevalencia del 0,55%, en la edad de 4 años existe 4 (4/6) con una prevalencia acumulada de 2,20% animales positivos y en la edad de 5 años de igual manera existe un animal positivo a Diarrea Viral bovina (1/6) con un 0,55%. Esto dándonos como resultado total de 3,30% de animales positivos a la enfermedad. En esta investigación nos da que entre los animales de 4 años de edad puede presentar una mayor prevalencia de la enfermedad a comparación con las otras edades.

(Gonzales Carbajal, 2016) Menciona que en su estudio de investigación Vacas \geq a 8 años presentaron un alto porcentaje de positividad con un 35,71% en comparación con las vacas de menor edad, que tienen menor tendencia a estar contagiadas del virus. Sin embargo (Moreno Peña, 2019) en su trabajo de investigación los animales que tienen un porcentaje mayor de positivos y sospechosos son los que están en los rangos de 1 a 4 años debido a su mayor porcentaje 5,52%. Igualmente (Pacheco, 20221) nos dice que mayores de 25 meses con un total de 84,48% (49/58), seguido de vaconas entre 3 a 24 meses 13,46% (8/58), se encontró 1 caso positivo en torete de 7 a 12 meses de edad, mientras que en terneros de 0 a 6 meses y toro de 1 a 5 años no se encontró ningún caso positivo de VDVB, (Jara, 2008) También menciona que con respecto a la presencia de DVB por edades, tenemos que existe una mayor presencia de la misma en animales desde los 1 a los 4 años, sin descartar la presencia en animales con mayor o menor edad y prevalencia, hay que recalcar que animales de hasta 6 meses de edad pueden ser positivos por anticuerpos maternos, Y finalmente (Yanzaguano, 2022) reporta que los animales muestreados presentaban edades desde los 3 -5 años, obteniéndose casos

positivos en 83 de los 186. Teniendo en cuenta que en edad de 4 años es la que más prevalencia presenta con un 51,81%(43/83) casos positivos.

Con los resultados obtenidos de acuerdo al estado de desarrollo en la tabla 14, nos dice que en el estado de lactación presenta el total de positivos en este estudio (6/176) que corresponde al 3,30% de la población muestreada. Debemos tener en cuenta que la mayoría de los animales muestreados en el estudio se encuentra en estado de lactación, por lo tanto, la prevalencia de esta enfermedad está relacionada con la mayoría de casos positivos. Con el dato más cercano al lugar de estudio (Yanzaguano, 2022) dice en el grupo de lactación tenemos una prevalencia del 98,80% (82/83) de casos positivos.

De acuerdo a la tabla 15, la prevalencia por antecedentes de abortos de esta enfermedad, nos dice que de los 6 animales que resultaron positivos, (6/176) ninguno de ellos ha presentado abortos (0/6). Teniendo en cuenta los resultados de la tabla 14, podemos deducir que la existen animales persistentemente infectados y probablemente al ser una enfermedad que el comportamiento sintomático es ondulante, al momento de este estudio probablemente reaccionaron como falsos negativos por sus cargas de anticuerpos bajas para la enfermedad. Según (Pacheco, 20221) se puede comprobar que de los 58 animales que resultaron positivos solo 14 de ellos presentaron abortos lo que corresponde a 24,14%, mientras que 44 no presentaron correspondiente a 75,68%. De igual manera (Yanzaguano, 2022) nos dice que de los 83 animales positivos, solo 1 animal presento abortos, determinando una prevalencia de 1,20% del total de animales positivos.

Con respecto a la evaluación de esta enfermedad, en la tabla 16 nos describe la prevalencia de acuerdo con dos tipos de reproducción, dándonos como resultado que de los 6 animales que resultaron positivos (6/176), 3 animales (3/6) dieron positivos a la enfermedad por el método de inseminación, mientras que los otros 3(3/6) nos dan positivo mediante la monta natural. Según (Pacheco, 20221) los animales que tienen una reproducción de tipo monta natural presentan una prevalencia de 63,79%(37/58) siguiendo la reproducción de tipo mixta con 24,14(14/58) y por último la de tipo inseminación 12,07%(7/58). De igual manera (Yanzaguano, 2022) nos dice que por monta natural, existe una prevalencia de 67,47%(56/83) de casos positivos, así como también en reproducción mixta con Con respecto a la evaluación de esta enfermedad, en la tabla 16 nos describe la prevalencia de acuerdo con dos tipos de reproducción, dándonos como resultado que de los 6 animales que resultaron positivos (6/176), 3 animales (3/6) dieron positivos a la enfermedad por el método de inseminación, mientras que los otros 3(3/6) nos dan positivo mediante la monta natural. Según (Pacheco, 20221) los animales que tienen una reproducción de tipo monta natural presentan una prevalencia de 63,79%(37/58) siguiendo la reproducción de tipo mixta con 24,14(14/58) y por último la de tipo inseminación 12,07%(7/58). De igual manera (Yanzaguano, 2022) nos dice que por monta natural, existe una prevalencia de 67,47%(56/83) de casos positivos, así como también en reproducción mixta con una prevalencia de 21,69%(18/83) casos positivos y por último por inseminación tenemos una prevalencia de 10,84%(9/83) casos positivos.

En base a estos resultados, podemos deducir que en los dos tipos de reproducción no existe una seguridad como tal, esto puede ser debido a la falta de bioseguridad con la presencia de los machos y la falta de evaluación para la monta o inseminación. Es por eso que en este estudio los resultados nos dan a la par.

(Gonzales Carbajal, 2016) Describe que, en su investigación, las fincas donde someten a sus vacas a la Inseminación Artificial fueron las que más porcentaje de positividad obtuvieron con un 40%, y los ganaderos que utilizan Monta Natural la positividad fue menor con un 27,08%.

(Odeon, 2001) Manifiesta que, en el caso de la inseminación artificial, el virus resiste la temperatura de congelación, el semen contaminado resulta ser una fuente de diseminación de la enfermedad a otros animales, por lo cual se evidencia que puede ser un factor de riesgo para la predisposición de la enfermedad en estos hatos. Concordando con resultados hechos por Lavanda (2015), en donde menciona que la inseminación artificial es un método de reproducción en los cuales los animales se han visto afectados.

De acuerdo con la tabla 17, el estudio de la prevalencia de esta enfermedad se evaluó en cuatro razas diferentes, siendo Brown Swiss, Holstein, Holstein F1 y Jersey. Los resultados obtenidos en esta tabla describen que, en la raza Brown Swiss existe un solo positivo (1/11) de los animales muestreados, en la raza Holstein prevalece la enfermedad en dos animales (2/38), en Holstein F1 igualmente prevalece en dos animales (2/113) estudiados, seguido de Jersey que igualmente un solo positivo (1/14) prevalece la enfermedad de esta raza. Según estos datos, la raza que más prevalencia obtiene es en la raza Holstein y Holstein F1, ya que en el cantón Santa Rosa la mayoría de los animales existentes corresponden a esta raza siendo estos los que han presentado mayor susceptibilidad a la prevalencia de esta enfermedad.

(Gonzales Carbajal, 2016) Menciona que la raza Jersey presentó el más alto de positividad con un 66,67%, el tipo Holstein mestizo presentó una prevalencia de 34,69%, seguido de la raza Brown Swiss con un 25%, en cuanto a las criollas con un 23,75% y la raza Holstein presentó un 22,22%. De igual manera (Pacheco, 2022) nos dice que la prevalencia en vacas de raza Holstein con 77,59% (45/58) seguido de la raza Jersey con una prevalencia de 18,97% (11/58). De la misma manera (Yanzaguano, 2022) nos comenta que la raza Holstein tiene una mayor prevalencia siendo esta de 90,36% (75/83) casos positivos, seguido de la raza Jersey con una prevalencia de 7,23% (6/83) casos positivos y por último la raza Brown Swiss con una prevalencia de 2,41% (2/83) casos positivos.

Coincidiendo con (Labanda Gonzales, 2015) en donde destacan que las vacas Holstein y con sus respectivos mestizos son las que en mayor número se encuentran en las ganaderías lecheras, la mayoría de ellas han pasado por procesos de mestizaje con el fin de mejorar su

genética y por ende la producción de leche en la granja. Pudieron haber ingresado animales de otros sitios con el fin de realizar esta actividad y sabiendo que el 70 % o más de bovinos infectados con el vDVB desarrollan la enfermedad subclínica Por lo que un bovino infectado subclínica mente puede ser transportado de un lugar a otro.

Con los resultados obtenidos de la tabla 18, nos dice que para el estudio de esta enfermedad se ha evaluado desde 1 a 4 partos en las que nos da a interpretar que en la tabla 17, que por dos partos nos da una prevalencia del 3,30% de animales positivos a la enfermedad (6/6) de los casos positivos en este proyecto de investigación.

Esto nos puede dar a entender que, se puede presentar un riesgo debido a que la presencia de los animales persistentemente infectados puede producir un aumento de la Diarrea Viral Bovina. Hay que tener en cuenta que el factor edad estaría relacionado directamente con el número de parto, ya que a mayor edad mayor cantidad de partos y por consiguiente mayor susceptibilidad de la enfermedad.

Con la tabla 19, la prevalencia por vacuna nos indica que la presencia de la enfermedad se presenta en 6 animales muestreados (6/176) es decir que la prevalencia de DVB, es de un 3,30% de casos positivos, y una 96,70% de casos negativos a la presencia de la misma. Con esta tabla podemos indicar que la presencia de la enfermedad es casi nula debido a la eficiencia de la vacuna por lo cual, si el hato ganadero presenta su calendario de vacunación, la evolución del virus será casi imperceptible. (Moreno Peña, 2019) En su investigación menciona que existen animales previamente vacunados en contra del virus, pero se toma en cuenta el periodo de inmunización del animal y la vacunación con virus muerto y por lo tanto existe un 61,38% de animales no vacunados, obteniendo 7,59% y 3,45% de animales positivos y sospechosos respectivamente. Considerando que la vacuna formaría parte de la bioseguridad del hato ganadero en si (Jara, 2008) menciona a que este podría ser un factor determinante en los ganaderos al momento de la compra de bovinos regularmente, sin una adecuado análisis clínico y confirmación en laboratorio, cuarentena ni manejan registros, y control al momento de la movilización por lo cual no se realizan descartes de animales PI infectados. Teniendo así los focos de infección.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- De los 182 animales muestreados en el cantón de San Fernando, el 96,70% (176/182) resultaron negativos a la presencia de la enfermedad y solo 6 animales 3,30% (6/182) fueron positivos.
- Según el estudio realizado en la prevalencia de la enfermedad de acuerdo al estado de desarrollo, los 6 animales que resultaron positivos se encontraban en estado de lactación.
- De acuerdo con el tipo de reproducción; de los 6 animales que resultaron positivos, es decir, el 3,30% de ellos tuvieron la presencia del virus tanto por monta natural, como por inseminación artificial.
- En base al estudio de la prevalencia del virus por vacuna nos da como resultado que, de los 182 animales muestreados, 176 fueron negativos a la enfermedad y solo 6 positivos, indicándonos que un plan regulado de vacunación previene la presencia del DVB.

5.2. Recomendaciones

- Realizar campañas de bioseguridad a productores para determinar la importancia de la enfermedad y el daño que genera la presencia en un hato ganadero.
- Amplificar la importancia del calendario de vacunación para que en los hatos ganaderos del cantón no se propague el virus.
- Adquirir animales con el respectivo análisis de su perfil reproductivo. Ya que la presencia de la enfermedad de acuerdo al tipo de reproducción puede ser una variable alta para la evolución del virus.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A. K., Litchman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular*. USA: Elsevier.
- Abyntek. (27 de Junio de 2019). *Abyntek at the service of research*. Obtenido de Abyntek Biopharma S.L : <https://www.abbyntek.com/tipos-de-elisa/>
- Baker, J. (1990). Clinical aspects of bovine virus diarrhoea virus infection. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, 9(1), 25-41.
- Boehringer Ingelheim. (2021). *Diarrea Viral Bovina (DVB), El enemigo oculto*. Obtenido de <https://www.boehringer-ingelheim.com/sa/salud-animal/animales-de-produccion/diarrea-viral-bovina-dvb-el-enemigo-oculto>
- Burbano C., H., Vera A., V. J., & Ramírez N, G. (2006). Detección de biotipos del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) a través de RT-PCR. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1(11), 7-14. Obtenido de <https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1131&context=mv>
- Carrillo Correa, L. M. (2019). DETERMINACION DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB) EN EL CANTON SANTA ROSA MEDIANTE EL METODO MOLESCULAR PCR. (*Tesis de Grado*). Universidad Tecnica de Machala Facultad de Ciencias Agrovecuarias, Machala, Ecuador. Obtenido de http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/15060/1/DE00005_TRABAJODE TITULACION.pdf

Combessies, G. (2016). DIARREA VIRAL BOVINA: ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENO. *Sitio Argentino de Producción Animal*(159), 2. Obtenido de https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/190-Diarrea_Viral_Bovina.pdf

Cuervo, S. (2017). Programa de monitoreo de Diarrea Viral Bovina y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en leche de tanque. (*Tesis de grado*). Corporación Universitaria Lasallista, Caldas.

FAO. (1985). Manual de técnicas de diagnóstico viral. *Brasil: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*.

Gan, S., & Patel, K. (Septiembre de 2013). Inmunoensayo enzimático y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 1-3. doi:<https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>

García Bocanegra, I., & Zafra Leva, R. (2019). *Enfermedades infectocontagiosas en rumiantes: Manuales clínicos de Veterinaria*. Elsevier.

GARDEN Decorexpro.com. (2015). Obtenido de DIARREA VIRAL EN TERNEROS Y VACAS: <https://gardenlux-es.designluxpro.com/hozyajstvo/zhivotnovodstvo/virusnaya-diareya-telyat-i-korov.html#i-2>

Glauber, C. (2013). Diarrea Viral Bovina (DVB) Atención con este virus en el tambo. *Sitio Argentino de Producción Animal*., 3. Obtenido de https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/190-Diarrea_Viral_Bovina.pdf

animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/81-DVB.pdf

Gobierno de España. (2023). *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*. Obtenido de https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/diarrea-viral-bovina/Diarrea_viral_bovina.aspx

Gomes Fernandes, L., Maristela Pituco, E., Hellmeister de Campos Nogueira Romaldini, A., De Stefano, E., Jose Clementino, I., Alves Maia, A. R., . . . Santos de Azevedo, S. (2018). Spatial analysis for bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus type 1 infections in the state of Paraíba northeastern Brazil. *BMC Veterinary Research*, 14(102), 1-9. Obtenido de <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1412-5>

Gonzales Carbajal, K. (2016). “ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA EN GANADERÍAS DEL CANTÓN SARAGURO, PROVINCIA DE LOJA”. (*Tesis de Grado*). Universidad Nacional de Loja Area Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, Loja, Ecuador. Obtenido de [https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/11259/1/tesis%20final%20ESTUDIO%20DE%20LA%20PREVALENCIA%20DE%20DIARREA%20VIRAL%20BOVINA%20EN%20GANADER%20DEL%20CANT%20SARAGURO%20PROVINCIA%20DE%20LOJA.pdf](https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/11259/1/tesis%20final%20ESTUDIO%20DE%20LA%20PREVALENCIA%20DE%20DIARREA%20VIRAL%20BOVINA%20EN%20GANADER%c3%8dAS%20DEL%20CANT%c3%93N%20SARAGURO%2c%20PROVINCIA%20DE%20LOJA%e2%80%9d.pdf)

Jara, D. (2008). Estudio de seroprevalencia de diarrea viral bovina (DVB) y rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) en la provincia de Loja UTPL (Ecuador) por medio de enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) y su distribución epidemiológica geoespacial.

(*Tesis de grado*). Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador. Obtenido de <https://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1778/3/Jara%20Chamba%2c%20Diego%20Vinicio.pdf>

Labanda Gonzales, J. (2015). “PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA EN VACAS LECHERAS DE LAS GANADERÍAS DEL CANTÓN LOJA”. (*Tesis de grado*). Universidad Nacional de Loja Area Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables. Carrea de Medicina Veterinaria y Zootecnia., Loja. Obtenido de <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/10258/1/tesis%20Jorge%20Amable%20Labanda%20Gonz%C3%A1lez.pdf>

Leon, I. (17 de Abril de 2019). *All Science Ciencia, Tecnologia y Ambiente*. Obtenido de All Science: <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/elisa-que-es-en-que-consiste-que-son-los-distintos-tipos-de-este-ensayo-y-en-que-se-diferencian#:~:text=ELISA%20S%C3%A1ndwich%3A,primario%20unido%20a%20una%20placa>.

Medina Leiva, D. E., & Saballos Soza, O. R. (2017). Prevalencia de Diarrea Viral Bovina (DVB) en hembras mayores de 3 años de la raza Reyna, en la finca Santa Rosa de la Universidad Agraria. (*Tesis de Grado*). Universidad Nacional Agraria. Facultad de Ciencia Animal., Managua, Nicaragua. Obtenido de <https://repositorio.una.edu.ni/3658/1/tnl73m491p.pdf>

Mora Zapata, A. L., & Salgado Vargas, L. E. (2013). Detección de bovinos permanentemente infectados (PI) por el virus de la Diarrea Viral Bovina (BVD) en fincas del sector Salinas Grandes durante el período de Agosto a Noviembre del año 2012. (*Tesis de Grado*).

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA UNAN-LEÓN.
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA, Leon, Nicaragua. Obtenido de
<http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/3310/1/225914.pdf>

Moreno Peña, L. A. (2019). ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA, EN EL CANTÓN SANTA ROSA POR MEDIO DE ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA). (*Tesis de Grado*). Universidad Tecnica de Machala (UTMACH). Facultad de Ciencias Agropecuarias, Machala, Ecuador. Obtenido de http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/15063/1/DE00008_TRABAJODE TITULACION.pdf

Odeon, A. C. (2001). Seroprevalencia de la diarrea viral bovina, herpesvirus bovino y virus sincicial respiratorio en Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*, 82(4), 216-220.

OIE. (2007). Diarrea Viral Bovina. *Organizacion Mundial de Sanidad Animal*, 24. Obtenido de https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.07_BVD.pdf

OIE. (2023). *Organizacion Mundial de Sanidad Animal*. Obtenido de <https://www.woah.org/es/enfermedad/diarrea-viral-bovina/>

Organizacion Mundial de la Salud Animal. (2018). Rinotraqueitis Infecciosa Bovina IBR en leche de tanque. *Manual Terrestre de la OIE*. Obtenido de https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.11_IBR_IPV.pdf

Pacheco, D. A. (20221). PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA (DVB) EN BOVINOS DE LECHE MEDIANTE ANALISIS DE ELISA COMPETITIVO. (*Tesis de Grado*). UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA, Cuenca, Ecuador. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/23776/1/UPS-CT010191.pdf>

Paredes Galarza, B. (2022). Determinación de bovinos infectados con el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) en la parroquia San Pedro de Suma del cantón El Carmen de la provincia de Manabí – Ecuador. (*Tesis de grado*). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/26979/1/UCE-FMVZ-SUB-PAREDES%20BRUNA.pdf>

Pecora, A., & Perez, M. (2017). *Actualización en diarrea viral bovina, herramientas diagnósticas y estrategias de prevención*. Buenos Aires: INTA.

Pedraza, M., Risalde, M., Romero Trevejo, J., Da Silva, A., Nuñez, A., Ruiz Villamor, E., . . . Sanchez Cordon, P. (2007). DIARREA VÍRICA BOVINA: ETIOLOGÍA, FORMAS CLÍNICAS, DISTRIBUCIÓN DEL VIRUS Y PATOGENIA. *Real Academia De Ciencias Veterinarias De Anda Lucia Oriental*, 20(1), 24. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2973184>

Ramirez, A. (22 de Agosto de 2022). El test ELISA como herramienta de diagnóstico (1/2): Principios básicos. *3tres3.com Comunidad Profesional Porcina*, 2. Obtenido de https://www.3tres3.com/latam/articulos/elisa-como-herramienta-de-diagnostico-1-2-principios-basicos_14334/

Rivera, H. (1993). EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (BVD). *INVESTIGACIONES PECUARIAS*, 6 (1). Obtenido de https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/veterinaria/v06_n1/virusd.htm#:~:text=En%201946%2C%20cuando%20BVD%20fue,pueden%20presentar%20esta%20forma%20cl%C3%ADnica.

Rivera, H. (2008). Evolución del conocimiento sobre la enfermedad de la diarrea viral bovina y su agente etiológico. *Rev. investig. vet. Perú*, 19(2), 93-112.

Rondon, I. (2006). Diarrea Viral Bovina: Patogénesis e inmunopatología. *MVZ Cordova*, 11(1), 694-704. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/mvz/v11n1/v11n1a03.pdf>

SAG. (2022). *Ministerio de Agricultura*. Obtenido de Gobierno de Chile: https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/f_tecnica_diarrea_viral_bov.pdf

Serrano, M. (Noviembre de 2019). *BM Editores*. Obtenido de Estrategias de diagnóstico para detección del virus de diarrea viral bovina: <https://bmeditores.mx/ganaderia/estrategias-de-diagnostico-para-deteccion-del-virus-de-diarrea-viral-bovina/>

Soto Quispe, A. (2010). Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina en el centro de investigación y producción Carolina UNA Puno. (*Tesis de grado*). Universidad Nacional del Altiplano, Perú. Obtenido de https://www.lareferencia.info/vufind/Record/PE_f1aabbaf745091d307af19398729f7ba

Ulloa, D. (2018). Incidencia de Anaplasmosis en caninos. (*Tesis de grado*). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca.

Vargas, D., Jaime, J., & Vera, V. (2009). Perspectivas para el control de el virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.*, 22(4), 677-688. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902009000400011

Velasquez Quinaluisa, J. F., & Toro Molina , B. M. (Agosto de 2022). Seroepidemiologia de la Diarrea Viral Bovina en los cantones Latacunga, La Mana y Sigchos. (*Tesis de Grado*). Universidad Tecnica de Cotopaxi., Latacunga Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/9625/1/PC-002538.pdf>

Velasquez, J. (2022). Seroepidemiologia de la Diarrea Viral Bovina en los cantones Latacunga, La Mana y Sigchos. (*Tesis de Grado*). Universidad Tecnica de Cotopaxi., Latacunga Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/9625/1/PC-002538.pdf>

Walz, P., Bell, T., Wells, J., Grooms, D., Kaiser, L., Maes, R., & Baker, J. (2001). Relationship between degree of viremia and disease manifestation in calves with experimentally induced bovine viral diarrhoea virus infection. *American Journal of Veterinary Research*, 62(7), 1095-1103. Obtenido de <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1095>

Yanzaguano, A. F. (2022). PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA (DVB) EN BOVINOS FENOTIPO LECHERO MEDIANTE ANALISIS DE ELISA COMPETITIVO. (*Tesis de grado*). Universidad Politecnica Salesiana, Cuenca, Ecuador. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/23769/1/UPS-CT010187.pdf>

7. ANEXOS

Figura 6. Obtención de las muestras

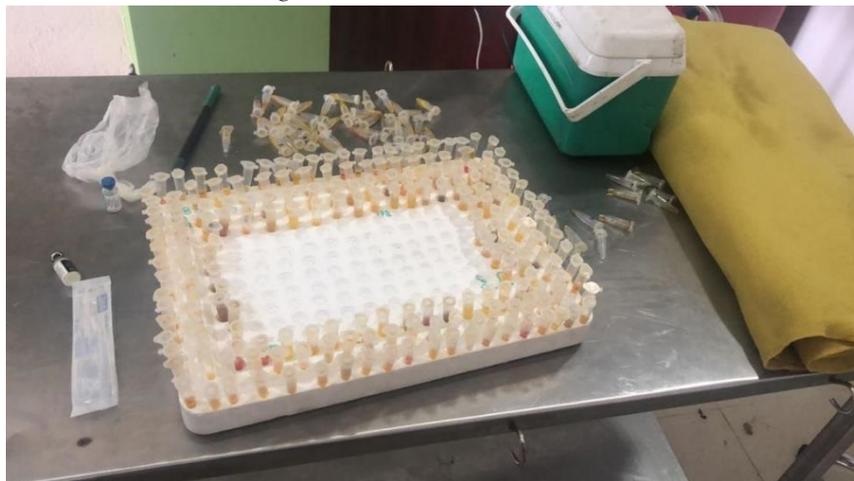


Figura 7. Análisis de las muestras



Figura 8. Interpretación de las nuestras mediante el método de ELISA sándwich.

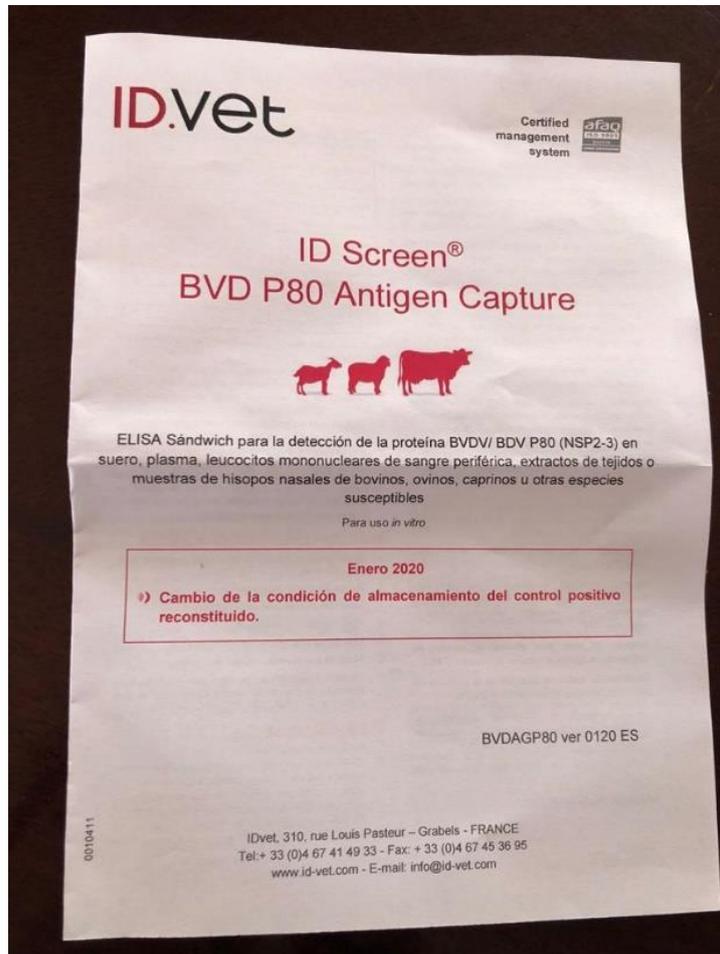


Figura 9. Selección de los animales.

