



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA (DVB) EN BOVINOS FENOTIPO
LECHERO MEDIANTE ANÁLISIS DE ELISA COMPETITIVO”**

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

AUTOR: ALEX FABIAN YANZAGUANO CACERES

TUTOR: ING. MAURICIO XAVIER SALAS RUEDA, MGTR.

Cuenca - Ecuador

2022

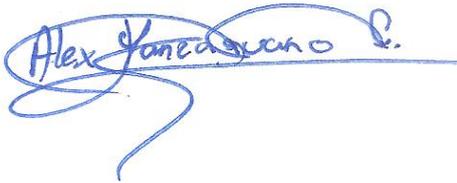
CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Alex Fabian Yanzaguano Caceres, con documento de identificación N° 0150665842, 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, 07 de noviembre del 2022

Atentamente,



Alex Fabian Yanzaguano Caceres

0150665842

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

Yo, Alex Fabian Yanzaguano Caceres con documento de identificación N° 0150665842, 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 (DVB) en bovinos fenotipo lechero mediante análisis de ELISA competitivo”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Médico Veterinario Zootecnista, 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, 07 de noviembre del 2022

Atentamente,



Alex Fabian Yanzaguano Caceres

0150665842

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 (DVB) EN BOVINOS FENOTIPO LECHERO MEDIANTE ANÁLISIS DE ELISA COMPETITIVO”, realizado por Alex Fabian Yanzaguano Caceres con documento de identificación N° 0150665842, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción de Trabajo experimental, que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 07 de noviembre del 2022

Atentamente,



Ing. Mauricio Xavier Salas Rueda, Mgtr.
0603329681

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo se lo dedico primeramente a mi madre Celia Isabel Cáceres Orellana, que gracias a todo el esfuerzo que día a día realiza me ha podido brindar el apoyo incondicional para seguir cada día formándome como persona y como profesional, se lo agradezco de lo más inmenso de mi corazón, por demostrarme y guiarme por el camino correcto, por todo el sacrificio a la distancia que realiza, por sus consejos, por sus regaños, por su amor, por siempre buscar y brindarme lo mejor, y en segundo le agradezco a mi tía Ana Cáceres, por siempre estar presente en todo mi camino de formación, por el apoyo y cuidado que me ha brindado, por sus consejos, por su cariño incondicional, y en tercero agradezco a mis hermanos, primas, primos, cuñada, sobrinas, por siempre apoyarme y brindarme consejos y fuerzas para siempre salir adelante y siempre luchar por mis sueños.

También quiero agradecer a mis maestros por inculcarme con buenos valores y sobre todo por compartir conocimientos, para formar personas de bien y con grandes conocimientos para la vida profesional y por ser una guía para el futuro.

AGRADECIMIENTO

Me gustaría agradecer a mis amigos, a mis maestros y en especial a mi familia por todo el apoyo que me han brindado, pero a mi madre en especial por todo el tiempo dedicado hacia mí, y por todo su apoyo incondicional y por ser el pilar fundamental por el que lucho día tras día. Por creer en mí y por siempre estar en todo momento siempre cuando he necesitado ese empujón para no rendirme.

Agradezco a los docentes que forman la Carrera de Medicina Veterinaria, por ser un pilar fundamental y guías para ser buenos profesionales.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.2 Problema	16
1.3 Delimitación.....	16
1.3.1 Temporal.....	16
1.3.2 Espacial.....	16
1.3.3 Académica	17
1.4 Explicación del problema.	17
1.5 Objetivos	18
1.5.1 Objetivo General.....	18
1.5.2 Objetivos específicos	18
1.6 Hipótesis	18
1.6.1 Hipótesis alternativa	18
1.6.2 Hipótesis nula	18
1.7 Fundamentación Teórica.....	18
2. REVISION Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL.....	19
2.1 Definición de la Diarrea Viral Bovina.	19
2.2 Historia.....	20
2.3 Etiología y estructura	21

2.4	Biotipos	23
2.4.1	Citopáticos	23
2.4.2	No Citopáticos	24
2.5	Genotipos	24
2.6	Epidemiología.....	26
2.7	Patogenia.....	26
2.8	Tipos de infecciones	27
2.8.1	Complejo Respiratorio.....	27
2.8.2	Infección Aguda	27
2.8.3	Infección Subclínica.	28
2.8.4	Infección Persistente.....	28
2.8.5	Infección Neonatal.....	28
2.8.6	Infección Venérea.....	29
2.8.7	Enfermedad de las Mucosas	29
2.9	Síntomas.....	30
2.10	Lesiones.....	30
2.10.1	Lesiones Macroscópicas	30
2.10.2	Lesiones Microscópicas	31
2.11	Diagnóstico.....	31
2.12	Métodos de Diagnóstico.....	32
2.12.1	Aislamiento Viral.....	32
2.12.2	Detección del ácido nucleico (RT-PCR).....	32

2.12.3	Inmunohistoquímica	32
2.13	ELISA de detección de antígenos.	32
2.13.1	ELISA Competitivo	33
2.13.2	ELISA no competitivo	34
2.13.3	ELISA sándwich	35
2.14	Prevención y Control.....	35
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1	Materiales.....	37
3.1.1	Físicos.....	37
3.1.2	Químicos.....	38
3.1.3	Biológicos.....	38
3.2	Diseño estadístico	38
3.3	Metodología estadística	38
3.4	Población.....	39
3.4.1	Selección y tamaño de la muestra.....	39
3.4.2	Obtención de la muestra	39
3.4.3	Toma de registro y datos	40
3.4.4	Procesamiento de la muestra	40
3.5	Operacionalización de variables	41
3.5.1	Variables independientes	41
3.5.2	Variables dependientes	41
3.6	Consideraciones éticas	42

4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	43
4.1	Prevalencia Total	43
4.2	Prevalencia por Procedencia	44
4.3	Prevalencia por Raza.....	45
4.4	Prevalencia por Sexo.....	46
4.5	Prevalencia por Edad	47
4.6	Prevalencia por Abortos.....	48
4.7	Prevalencia por Estado de Desarrollo	49
4.8	Prevalencia por Parto	49
4.9	Prevalencia por tipo de Reproducción	51
5	Conclusiones y Recomendaciones	52
5.1	Conclusiones	52
5.2	Recomendaciones	52
6	Bibliografía.....	54
7	Anexos.....	62

ÍNDICE DE FIGURA

<i>Figura 1.</i> Ubicación: Parroquia San Gerardo- Azuay	16
<i>Figura 2.</i> Ubicación: Universidad Politécnica Salesiana, Sede-Cuenca	17
<i>Figura 3.</i> ELISA directo vs indirecto	34
<i>Figura 4.</i> Toma de Muestras	62
<i>Figura 5.</i> Manejo de hatos ganaderos	62
<i>Figura 6.</i> Colocación de muestra y conservación	62
<i>Figura 7.</i> Centrifugación y obtención de suero	63
<i>Figura 8.</i> Procesamiento Kit ELISA	63
<i>Figura 9.</i> Obtención de resultados	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Materiales Físicos</i>	37
Tabla 2. <i>Materiales Químicos</i>	38
Tabla 3. <i>Materiales Biológicos</i>	38
Tabla 4. <i>Variables independientes: Suero de origen Bovino</i>	41
Tabla 5. <i>Variables dependientes: Elisa para DVB</i>	41
Tabla 6. <i>Prevalencia Total</i>	43
Tabla 7. <i>Prevalencia por Procedencia (Dudoso)</i>	44
Tabla 8. <i>Prevalencia por Procedencia (Positivo)</i>	44
Tabla 9. <i>Prevalencia por Raza (Dudoso)</i>	45
Tabla 10. <i>Prevalencia por Raza (Positivo)</i>	45
Tabla 11. <i>Prevalencia por Sexo (Dudoso)</i>	46
Tabla 12. <i>Prevalencia por Sexo (Positivo)</i>	46
Tabla 13. <i>Prevalencia por Edad (Dudoso)</i>	47
Tabla 14. <i>Prevalencia por Edad (Positivo)</i>	47
Tabla 15. <i>Prevalencia por Abortos (Dudoso)</i>	48
Tabla 16. <i>Prevalencia por Abortos (Positivo)</i>	48
Tabla 17. <i>Prevalencia por Estado de Desarrollo (Dudoso)</i>	49
Tabla 18. <i>Prevalencia por Estado de Desarrollo (Positivo)</i>	49
Tabla 19. <i>Prevalencia por Parto (Dudoso)</i>	49
Tabla 20. <i>Prevalencia por Parto (Positivo)</i>	50
Tabla 21. <i>Prevalencia por tipo de Reproducción (Dudoso)</i>	51
Tabla 22. <i>Prevalencia por tipo de Reproducción (Positivo)</i>	51

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en la provincia del Azuay, Cantón Girón, zona San Gerardo, con el objetivo de conocer la prevalencia de Diarrea Viral Bovina (DVB) en diferentes hatos lecheros, considerando que es una zona de alta producción lechera, se obtuvieron 186 muestras para la determinación de anticuerpos contra DVB, mediante la prueba de ELISA, en 6 sectores diferentes de San Gerardo, la recolección de muestra se realizó de la vena yugular y mamaria principalmente, el procesamiento de la muestra y el Kit de ELISA se realizó en los laboratorios de la clínica veterinaria Polivet de la Universidad Politécnica Salesiana. En los resultados finales se obtuvo una prevalencia total respecto a Diarrea Viral Bovina de 44,62% (83/186) de casos positivos y 3,23% (6/186) de animales dudosos, indicándonos la presencia de la enfermedad en la zona de San Gerardo.

ABSTRACT

The present research was carried out in the province of Azuay, Canton Girón, San Gerardo area, with the aim of knowing the prevalence of Bovine Viral Diarrhea (DVB) in different dairy herds, considering that it is an area of high dairy production, 186 samples were obtained for the determination of antibodies against DVB, by means of the ELISA test, in 6 different sectors of San Gerardo, the sample collection was carried out from the jugular and mammary vein mainly, the processing of the sample and the ELISA Kit was carried out in the laboratories of the Polivet veterinary clinic of the Salesian Polytechnic University. In the final results, a total prevalence was obtained with respect to Bovine Viral Diarrhea of 44.62% (83/186) of positive cases and 3.23% (6/186) of doubtful animals, indicating the presence of the disease in the area of San Gerardo.

1. INTRODUCCIÓN

En el ámbito ganadero existen diferentes problemas que están relacionadas con enfermedades virales, bacterianas, que afectan de manera directa en la producción, generando infertilidades, problemas en las formaciones, por lo que la falta de control de las entidades encargadas ha hecho que se tenga un manejo inadecuado en los ámbitos ganaderos.

La diarrea viral bovina es una enfermedad de distribución mundial y endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas y es responsable de ocasionar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones, siendo los trastornos reproductivos los de mayor impacto económico. (Lértora, 2003), Por lo que existe una predisposición para la Diarrea Viral Bovina (DVB) a nivel de Ecuador, la cual genera impactos económicos ya sea en producción de ganado lechero o de carne.

Es importante evitar el comercio de animales con viremia, considerando que el ganado serológicamente positivo sin viremia está sano, siempre que no esté grávido. El ganado grávido que es positivo a los anticuerpos y que gesta fetos IPI es transmisor importante del virus dentro de los rebaños. Alrededor del 15% de los animales con viremia persistente tienen anticuerpos frente a la proteína NS/2. Sin embargo, el ser seropositivos no equivale a estar sano. (David, y otros, 1994)

Si se conoce el manejo del ganadero y los factores que aumentan el riesgo de infección por VDVB, se puede mejorar la capacidad de controlar y prevenir la transmisión al minimizar los efectos adversos de la infección por el VDVB en el rebaño nos proporcionará salud y productividad. (Hamel, Wasylyshen, & Nayar, 1995)

1.2 Problema

La Diarrea Viral Bovina, es una enfermedad que afecta en gran cantidad a los hatos lecheros, hatos de carne, en la actualidad no hay registro de estudios respecto a la prevalencia de la DVB en la zona ganadera de San Gerardo, en cuanto a los animales infectados tiende a producir diferentes problemas de salud, generando un riesgo para los diferentes animales sanos que tengan contacto con los animales infectados.

La presente investigación tiene la finalidad de determinar la prevalencia de DVB, en diferentes hatos productores de leche, mediante pruebas de ELISA que garantizaran los diferentes resultados a obtener, teniendo en cuenta para un control previo.

1.3 Delimitación

1.3.1 Temporal

El proceso investigativo abarcó una duración de 400 horas, distribuidas en el trabajo experimental y la redacción del informe final.

1.3.2 Espacial

“San Gerardo se encuentra ubicado geográficamente entre las coordenadas -3.13838, -79.20268 al Sur de Cuenca” (Ecuador, 2022). “La parroquia San Gerardo tiene una extensión de 5189.29 ha que representan el 14.81% del territorio del cantón Girón y se encuentra localizada al noroeste de la cabecera cantonal” (Gerardo, 2015).

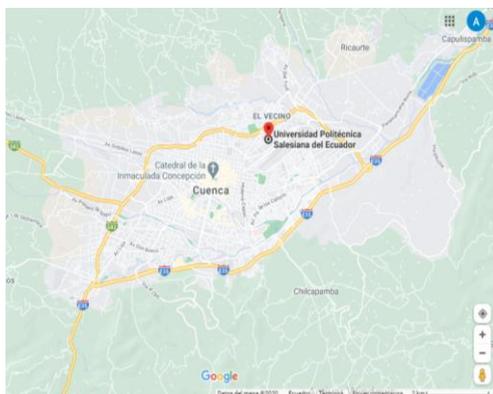
Figura 1. Ubicación: Parroquia San Gerardo- Azuay



Fuente: (Fernando, 2019)

Realización de Test de Elisa en el laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede-Cuenca.

Figura 2. Ubicación: Universidad Politécnica Salesiana, Sede-Cuenca



Fuente (Maps, 2022)

1.3.3 Académica

La presente propuesta investigativa cubre el área de Epidemiología, dentro de la Medicina Veterinaria, por lo tanto, esta investigación fortalecerá el conocimiento respecto al tema en beneficio para los profesionales, personas afines al tema, obteniéndose la prevalencia de DBV en hatos lecheros de la zona de San Gerardo.

1.4 Explicación del problema.

La diarrea viral bovina es una enfermedad que produce diferentes complicaciones en los hatos ganaderos y por lo tanto pérdidas productivas, generando un impacto económico, llegando a generar incluso hasta la muerte de los animales infectados, es una enfermedad que se da en cualquier zona climática, ya sea; tropical, subtropical, templada y fría.

Generalmente los pequeños productores por desconocimiento de las diferentes enfermedades zoonóticas que puedan afectar a los animales, y por un mal manejo sanitario, en relación con vacunación, desparasitaciones, cuarentenas, etc., hacen que la enfermedad de la DVD sea un peligro en las producciones ganaderas por su fácil transmisión.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General.

Determinar la prevalencia de Diarrea Viral Bovina (DVB) en bovinos fenotipo lechero en producción, en la provincia del Azuay, Cantón Girón, zona San Gerardo.

1.5.2 Objetivos específicos

Determinar la prevalencia de anticuerpos dirigidos para DVB en bovinos fenotipo lechero.

Calcular la prevalencia de DVB en bovinos fenotipo lechero.

1.6 Hipótesis

1.6.1 Hipótesis alternativa

La prevalencia de DVB en bovinos de leche de la zona de San Gerardo es alta.

1.6.2 Hipótesis nula

La prevalencia de DVB en bovinos de leche de la zona de San Gerardo es baja.

1.7 Fundamentación Teórica

El presente trabajo está enfocado en determinar la prevalencia de diarrea viral bovina en hatos lecheros en la zona de San Gerardo, en el cantón Girón. Haciendo énfasis en que la misma es una enfermedad infecto-contagiosa, que afecta de animal a animal, y por lo tanto como médicos, debemos incentivar a los productores a realizar una mejoría en el manejo de la producción ganadero, buscando el bienestar de los mismos.

Los resultados obtenidos de la presente investigación será información importante para los ganaderos, quienes están en contacto día a día con los animales, por lo que les permitirá mejorar en la normativa de enfermedades de declaración respecto a los hatos posiblemente infectados.

2. REVISION Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL

2.1 Definición de la Diarrea Viral Bovina.

“La DVB es una enfermedad de etiología viral que ataca las mucosas: es considerada una de las principales afecciones que interfiere en los procesos reproductivos. Su distribución es mundial y difundida en nuestro país” (Roger & Blowey, 2004).

La diarrea viral bovina (DVB) representa un problema de ámbito mundial que causa considerables pérdidas tanto en ganado de carne como lechero, afectándolo de diversas formas las cuales están supeditadas a la edad del animal, estado inmunológico y momento de la gestación en el que se produce la infección. (Rondón, 2006)

La prevalencia de la infección varía entre los diferentes estudios realizados en diversos países, ella tiende a ser endémica en la mayoría de los países con población bovina importante, de modo que el 60-80% del ganado presenta anticuerpos frente al agente y entre el 1 al 2 % está persistentemente infectado. (Houe, 1999)

La infección con el virus de la BVD/MD tiene efectos distintos dependientes del estado inmunitario y estadio de gestación de la madre, el estado inmunitario del rebaño, el genotipo o biotipo del agente etiológico y su virulencia. Se pueden distinguir básicamente dos formas: Infección posnatal transitoria de bovinos inmunocompetentes, curso clínico; inmunosupresión transitoria y eventualmente infecciones secundarias; trastornos de la coagulación sanguínea y/o diarrea. Infección Transplacentaria del embrión/feto, muerte del fruto, aborto, nacimiento de terneros malformados (síndrome oculocerebelar); nacimiento de terneros con infección persistente. (Dirksen, Grunder, & Stober, 2005, p.521)

Hasta el presente se han caracterizado dos Genotipos de virus: genotipo 1 y genotipo II. El primero está asociado a la enfermedad clásica vDVB con sus diferentes presentaciones clínicas; en la naturaleza se aíslan dos Biotipos que se diferencian por su capacidad de producir efecto

citopático en cultivos celulares: cepas citopáticas y cepas no citopáticas (vDVB CP y vDVB NCP respectivamente). Asimismo, dentro de estos biotipos existen cepas antigénicamente homólogas y otras parcialmente heterólogas. El Genotipo II fue aislado por primera vez en 1992 y está asociado a cuadros agudos severos y hemorrágicos digestivos agudos en adultos. A este genotipo también se lo aísla de animales infectados persistentemente y de suero fetal. En Argentina se han aislado los dos Genotipos y los dos biotipos del genotipo 1. Recientes estudios sobre el genoma del vDVB CP indican que estas cepas producen un polipéptido no estructural llamado p80/NS3, el cual es considerado como un marcador bioquímico de las cepas de vDVB CP. Las cepas NCP no poseen este marcador. Por otro lado, se demostró que la presencia del p80/NS3 en el virus estimula la replicación del mismo e incremento la actividad enzimática de helicasas y proteasas (enzimas favorecedoras de la difusión del virus dentro del organismo y la modulación de un eficiente desarrollo viral). Las cepas CP aisladas de Enfermedad de Border en ovinos también producen p80/NS3. (Bolin R & Grooms L, 2004)

2.2 Historia.

En 1940 fue descrita en Saskatchewan, Canadá, una enfermedad en bovinos la cual se caracterizaba por una severa diarrea, depresión, anorexia, leucopenia y ulceración de las mucosas de la cavidad bucal a la cual se la denominó «enfermedad X» por la dificultad en la identificación del agente causal y fallas en el intento de reproducirla experimentalmente. (Childs, 1946)

Según Olafson, Maccallum, & Fox (1946): “La Diarrea Viral Bovina (DVB) fue descrito por primera vez en Nueva York (EE.UU.) en el año de 1946, como una gastroenteritis acompañada de diarrea suave, úlceras en mucosa oral y nasal, y abortos en hembras gestantes”.

En los años 90 los relevamientos en Alemania mostraban que en ese país y en Suiza reaccionaban seropositivamente el 74-96% de los rebaños lecheros. El agente está algo menos presente en algunas regiones de Austria, así como en los países escandinavos. En estos últimos

desde comienzo de la década de 1990 se logró limitar la distribución del virus de la BVD/MD a través de medidas de combate racionalizadas. (Dirksen, Grunder, & Stober, 2005, p.521)

2.3 Etiología y estructura

“El agente etiológico de la DVB es un virus de la familia Flaviviridae, emparentado con los virus de la peste porcina clásica y la “border disease” de los lanares” (Sigales, 2016, p.341).

Los virus de DVB citopáticos vacuolizan el citoplasma de las células e inducen su muerte, mientras que los virus no citopáticos infectan las células sin ocasionar efectos adversos. En forma individual o combinada, estos biotipos de virus causan problemas clínicos en los sistemas linfáticos, entérico, respiratorio y reproductivo del animal. (Bosque, 2010, p.285)

El virus de la BVD tiene estructura esférica, su diámetro es de unos 40-50 nm. Está recubierto y con ello resulta sensible a desinfectantes relativamente suaves y también a sustancias tensioactivas. El genoma viral consiste en una cadena ARN polar positiva. Este ácido nucleico codifica para 11 proteínas, 4 de ellas son componentes estructurales del virión (3 glucoproteínas de la envoltura y 1 nucleoproteína). Según (Dirksen, Grunder, & Stober, 2005, p. 521), entre las proteínas más importantes que conforman la estructura de la partícula tenemos:

- “Npro/p20: Es la primera proteína no estructural traducida del ORF y cumple la función de autoproteasa, generado del extremo N terminal de la proteína C/p14 Esta proteína no es requerida para la replicación del ARN viral” (Goyal & Ridpath, 2008, p.71).
- C/p14: Es la segunda proteína generada y es la más abundante. Constituye la cápside y antígeno del grupo viral. Su función es empaquetar el ARN genómico y proveer las interacciones necesarias donde se anclará la envoltura del virión. Esta proteína no provoca una respuesta de anticuerpos en el ganado. (Chase, Elmowalid, & Yousif, 2004)
- “Erns/E0/gp48: Glicoproteína bien conservada que induce altos niveles de anticuerpos, aunque con escasa capacidad neutralizante. Es una ARNasa secretada al

espacio extracelular por exocitosis durante la replicación viral” (Chase, Elmowalid, & Yousif, 2004).

- “E1/gp25: Es otra glicoproteína de envoltura que se ha encontrado en viriones covalentemente unidos al E2/gp53 por puentes disulfuro. Esta proteína no induce una respuesta humoral significativa” (Chase, Elmowalid, & Yousif, 2004).
- E2/gp53: Es la principal glicoproteína y objetivo antigénico de los anticuerpos. Esta glicoproteína es muy antigénica e induce la producción de anticuerpos neutralizantes luego de una infección o vacunación con vacunas vivas o muertas. Además, está asociada con otras actividades biológicas, incluyendo unión al receptor de la célula y ensamblaje viral (Chase, Elmowalid, & Yousif, 2004).
- “p7: Es una proteína no estructural que parece ser esencial para la producción y ensamblaje de virus infeccioso. Esta proteína no es requerida para la replicación del ARN viral” (Goyal & Ridpath, 2008, p.84)
- NS2-3/p125: Es una proteína no estructural altamente conservada entre todos los pestivirus, posee propiedades de helicasa y proteasa, indispensable en la replicación viral; cuenta con dos dominios que actúan por separado, NS2/p54 y NS3/p80, cada uno con distintas propiedades químicas. El ganado infectado o vacunado con virus modificado desarrolla una fuerte respuesta humoral contra este polipéptido; mientras que la vacuna a virus muerto produce una respuesta insignificante. Los anticuerpos contra NS2-3/p125 producen reacción cruzada entre VDVB, VPPC y VEF. (Chase, Elmowalid, & Yousif, 2004)
- “NS2/p54: Es un producto proteolítico de la NS2-3/p125. Esta proteína tiene una actividad de unión en el ARN. Posee un dominio tipo Zincfinger” (Goyal & Ridpath, 2008).

- NS3/p80: Es un producto proteolítico de la NS2-3/p125, determinando el fenotipo del VDVB. Esta proteína tiene actividad de NTPasa en el extremo amino terminal y de helicasa en el extremo carbono terminal. La NS3/p80 es una proteína altamente conservada en el biotipo CP, 2005 y se produce por mutaciones o recombinaciones entre el ARN del VDVB y ARN celular o duplicaciones del ARN viral. La proteína NS3 es un antígeno inmunodominante en las respuestas de anticuerpo en terneros inmunizados. (Goyal & Ridpath, 2008)
- “NS4A/p10: Es una proteína no estructural hidrofóbica que participa como un esencial cofactor de la NS2-3/p125 y la serina proteasa NS3/p80” (Goyal & Ridpath, 2008).
- NS4B/p32: Es una proteína no estructural hidrofóbica. Es un importante modulador de la citopatogenicidad de la cepa NADL del VDVB y se encuentra asociado a la producción del NS3/p80 del fenotipo CP. Esta proteína es un componente de la replicasa. (Goyal & Ridpath, 2008)
- “NS5A/p58: Es una fosfoproteína serina que está íntimamente asociada con una o más quinasas. También, es un componente de la replicasa” (Goyal & Ridpath, 2008).
- “NS5B/p75: Es el ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp). Esta proteína ha sido directamente implicada en la morfogénesis del VDVB” (Goyal & Ridpath, 2008).

2.4 Biotipos

“Según su comportamiento in vitro se distinguen dos tipos de virus: uno pertenece a una cepa citopática (cp) y el otro a una cepa no citopática (cnc)” (Sigales, 2016, p.341).

2.4.1 Citopáticos

Los virus de DVB citopáticos vacuolizan el citoplasma de las células e inducen su muerte. “El biotipo CP se aísla únicamente de animales con enfermedad mucosa y se originan por mutación a partir del biotipo NCP” (Health & University, 1996); en forma individual o

combinada, estos biotipos de virus causan problemas clínicos en los sistemas linfáticos, entérico, respiratorio y reproductivo del animal” (Bosque, 2010, p 285); “El VDVB-CP infecta de manera predominante células epiteliales” (Rondón, 2006).

2.4.2 No Citopáticos

“Los virus no citopáticos infectan las células sin ocasionar efectos adversos” (Bosque, 2010, p. 285). “Ya que el VDVB-NCP presenta afinidad por células linfocitarias” (Rondón, 2006).

Según Bolin R & Grooms L (2004): “El VDVB-NCP sirve como virus matriz desde el cual se producirá el VDVB-CP luego de recombinaciones homólogas o heterólogas en el ARN viral no citopático”; Este biotipo es considerado el más importante porque al infectar vacas gestantes durante el primer tercio de la gestación, cuando el sistema inmune del feto es inmaduro, puede dar lugar al nacimiento de animales inmunotolerantes al virus y con infección persistente (PI); estos animales PI emiten grandes cantidades de VDVB durante toda su vida y sirven como una fuente efectiva. (Gripshover, y otros, 2007)

2.5 Genotipos

Mientras que el fenotipo se basa en diferencias de rasgos expresados como la citopatología en cultivo celular, el genotipo se refiere a diferencias en el genoma viral. Existen dos genotipos: el VDVB 1 y el VDVB 2, pudiendo ambos existir como cualquiera de los dos biotipos. (Huamán, 2006)

En la práctica, la relevancia de los genotipos se basa en sus importantes diferencias biológicas, aun cuando poseen muchas similitudes, haciendo que la infección aguda en adultos con cualquiera de ellos conlleve a una infección benigna o subclínica, hay diferencias significativas entre ambos, siendo lo más importante su diferenciación genómica. Los primeros VDVB 2 caracterizados fueron aislados de animales PI nacidos de madres que habían sido

vacunadas con vacunas de VDVB 1. Los VDVB NCP aislados de ambos genotipos pueden originar infecciones persistentes. (Ridpath J. F., 2003)

“Esta diversidad genética del VBDV está asociada con la propensión de los virus RNA a modificaciones genómicas como mutaciones y recombinaciones” (Vargas, Jaime, & Vera, 2009).

Una posterior clasificación del virus VDVB, basada en diferencias encontradas en la secuencia genética de una región del genoma, conocida como región 5'UTR, determina la existencia de los genogrupos I y II, existiendo diferencias a nivel molecular y en cuanto a la severidad de los signos clínicos que se producen. (Reinhardt, Carrasco, Tadich, & Riedemann, 2001)

Según Ridpath, Bolin, & Dubovi (1994): mencionan que comparando las secuencias de las regiones 5' UTR del genoma de más de 140 aislados del VDVB, consideraron agruparlas en genotipos 1 y 2, donde ambos están conformados por cepas del VDVB ncp y cp. El genotipo 1, corresponde al que fue reconocido por décadas, y está constituido por cepas de VDVB de referencia, utilizadas en preparación de vacunas, como antígeno en pruebas diagnósticas e investigación.

El genotipo 2 corresponde al VDVB que fue identificado a fines de la década del 80 en EEUU y Canadá asociado a un síndrome hemorrágico agudo y hasta fatal, pero también por cepas aisladas de animales PI nacidos de madres vacunadas contra el VDVB y cepas aisladas de sueros fetales. Cepas del genotipo 2 han sido reconocidas esporádicamente en algunos países europeos y en países de América Latina como Brasil, Argentina y Chile (Ridpath, Bolin, & Dubovi, 1994)

2.6 Epidemiología.

“Estudios de prevalencia en todo el mundo, demuestran que el VDVB está ampliamente distribuido y se encuentra presente en la mayoría de países donde exista la crianza de ganado vacuno como enuncia” (Bautista, 2011). En encuestas realizadas en distintos países a nivel mundial, en la mayoría de poblaciones bovinas se obtuvo como resultado que esta enfermedad alcanza niveles de 0,5 a 2% de bovinos persistentemente infectados y del 60 a 80% de bovinos seropositivos como nos menciona. (Lértora, 2003)

Según la OIE, (2012): “En el Ecuador hay casos de infección, pero sin manifestaciones clínicas, siendo la provincia de Pichincha la que más casos reportó en los últimos años”. En un estudio realizado en hatos lecheros conformados: por ganado lechero y doble propósito de las provincias de Azuay, Manabí, Santo Domingo, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo, se demuestra la presencia de la enfermedad en estas provincias, ya que se recolectaron 2367 de suero sanguíneo y se las analizó obteniendo una prevalencia del 32%. (Saa, y otros, 2012)

2.7 Patogenia

El virus de la DVB, infecta primordialmente a los bovinos, en su forma aguda se presenta en animales seronegativos de más o menos de 6 a 24 meses de edad, esto afecta a su sistema respiratorio y digestivo. Estos patógenos también podemos encontrar en ovejas, cabras y rumiantes salvajes en el cual pueden actuar como reservorio del virus y estar el mayor tiempo en el cuerpo. (Rondón, 2006)

Este virus tiene afinidad por las células Diana (monocito-macrófago, linfocitos, células dendríticas). También tienen afinidad a los órganos Diana, el periodo clínico del virus es corto, el vDVB tiene la facilidad de inmunosuprimir al animal lo que los hace más susceptibles a enfermarse por otros factores presentes en el medio. (García & Zafra, 2019, p. 24)

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 superinfección posnatal por un biotipo cp antigénicamente homólogo al biotipo ncp que dio lugar a la inmunotolerancia. (García & Zafra, 2019, p. 24)

2.8 Tipos de infecciones

2.8.1 Complejo Respiratorio

La infección con DVB en animales inmuno competentes y seronegativos tiene escasa trascendencia; sin embargo, si como un agente inmunosupresor. El DVB potencia a otras infecciones virales y bacterianas como: Parainfluenza tipo 3, Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Rotavirus, Pasteurella spp., Salmonella spp., Coccidia, etcétera; produciendo un cuadro de patología respiratoria severa nombrado complejo respiratorio bovino, que pertenece a los inconvenientes responsables de monumentales pérdidas económicas a nivel Nacional e Internacional. (Escudero, 2015)

2.8.2 Infección Aguda

La forma aguda se caracteriza por ser leve, pero el animal puede presentar fiebres ligeras, leucopenia, lesiones discretas en la mucosa oronasal y una mayor susceptibilidad a infecciones secundarias. El efecto del virus en el tracto reproductivo tiene impacto económico ya que puede inducir infertilidad temporal, muerte embrionaria, abortos, malformaciones congénitas, y nacidos débiles o con infección persistente, dependiendo del periodo de la gestación, del biotipo y virulencia de la cepa viral infectante. La mayoría de las infecciones agudas están causadas por el biotipo NCP; generalmente ocurre en animales entre 6 meses y 2 años de edad. (Quispe, Cama, Rivera, & Araínga, 2008)

2.8.3 Infección Subclínica.

El 70 a 90% del ganado maduro es susceptible y puede contraer a la DVB subclínico. El lapso de incubación es de 5 a 7 días después aparece los síntomas como una ligera fiebre y leucopenia, que no es visible ante el veterinario o ganadero siendo esto seguido por una producción de anticuerpos neutralizantes. Generalmente es raro que el VDVB cause patología en animales inmuno competentes; no obstante, gracias a su rol inmunosupresor el VDVB puede potenciar o promover el desarrollo de infecciones secundarias. (Cauti, 2002)

2.8.4 Infección Persistente

Un animal persistente infectado (PI) es aquel en que es posible aislar el virus de la sangre o tejido en dos ocasiones sucesivas con un intervalo no menor a dos semanas. Estos animales son virémicos durante toda su vida y no producen anticuerpos contra la cepa que les origino inmunotolerancia. La infección persistente debe ser considerada en todo ternero pequeño al nacimiento, con escaso desarrollo y ganancia de peso, débil y con cuadro recurrente de enfermedad respiratoria y digestiva. (Lértora, 2003)

Los animales PI pasan desapercibidos en el hato ganadero por no presentar sintomatología evidente de estar infectados con vDVB. Por este motivo se atribuye que son la principal fuente de infección y reservorio del virus de forma permanente en el rebaño. (Grooms, 2004)

2.8.5 Infección Neonatal

El VDVB, raramente causa enfermedad en animales menores de 6 meses de edad. Los terneros recién nacidos infectados con VDVB pueden padecer de severas enteritis que son ocasionalmente de curso fatal. Experimentalmente se ha demostrado que en terneros que tomaron tarde el calostro, la infección que resultó fue una enfermedad clínica benigna con rápido restablecimiento. (Giraudó, 2000)

El ternero puede infectarse en la fase perinatal, o sea en el último lapso de la gestación o luego de nacer, por consiguiente, es viable que DVB juegue un papel en la presentación de la patología entérica en terneros recién nacidos. Los anticuerpos que el ternero obtiene de la mamá a través del calostro y leche se agotan entre los 105 a 230 días de edad, luego del cual el crecimiento del título de anticuerpos podría ser gracias a una infección natural o a la vacunación. (Rivera, 1993)

2.8.6 Infección Venérea

Los toros infectados en forma aguda o PI, producen semen infectado con el VDVB, como consecuencia de la replicación del virus en la vesícula seminal y glándula prostática, el cual sirve como medio para la transmisión del virus a vacas susceptibles. La calidad del semen infectado por el VDVB, es caracterizado por el decrecimiento de la motilidad, incremento del porcentaje de anomalías morfológicas de las células espermáticas. (Cauti, 2002)

Dichos toros tienen la posibilidad de remover el virus por medio del semen a lo largo de periodos prolongados en el tiempo (meses). Es por esa razón que se ofrece la exploración de semen anterior a inseminaciones artificiales o cualquier otra estrategia de desempeño de preñez en el hato y poder disminuir el contagio en las vacas y evitar malformaciones. (Rivera, 1993)

2.8.7 Enfermedad de las Mucosas

La Enfermedad de las Mucosas (EM) suele ocurrir con exclusividad en animales PI. 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. (Zapata & Vargas, 2013)

2.9 Síntomas

A menudo, la enfermedad se presenta en forma subclínica, pero cuando lo hace en forma clínica, se observa una amplia variedad de signos:

Fiebre; Depresión. Salivación (A consecuencia de las úlceras); Anorexia; Descarga nasal; Tos; Polipnea; Diarreas profusas de olor fétido que pueden contener moco o sangre. Esto a consecuencia de las úlceras en estómago e intestino. En casos agudos, la muerte se presenta en 48 horas. (Huarona, 2004, p.76)

La enfermedad puede durar de 3 – 7 semanas y hasta varios meses de forma intermitente, provocando que el ganado pierda mucho peso a consecuencia del daño a las mucosas. En algunas ocasiones se puede complicar con infecciones secundarias, como necrobacilosis o micosis. En el 10% de los casos, se presenta cojera, enrojecimiento con inflamación de piel y tejidos subyacentes de la pezuña, frecuentemente, estos síntomas cursan con laminitis. En las hembras gestantes producen abortos. (Huarona, 2004, p.76)

2.10 Lesiones

2.10.1 Lesiones Macroscópicas

Las lesiones macroscópicas de la forma clásica son representadas por necrosis y erosiones/ulceraciones de la nariz y los labios, mucosa bucal, encías y lengua. También se observa erosiones edematosas o hemorrágicas. Las lesiones cutáneas probablemente estarán presentes en la mayoría de los casos, son frecuentes en la región del cuello en la parte cervical, en la región perineal y son caracterizadas por eczema, hiperqueratosis y paraqueratosis, acompañadas de alopecia y también puede haber lesiones costrosas o bien delimitadas en el área perineal pueden surgir erosiones cutáneas alrededor de la abertura prepucial y vulvar. Estas lesiones también son comunes en el espacio interdigital y en la zona de inserción de las uñas,

siendo susceptibles a infecciones secundarias bacterianas que resultaran en un cuadro de pododermatitis. (Latino, 2008, p.763)

2.10.2 Lesiones Microscópicas

Las lesiones microscópicas son representadas por necrosis, erosiones y ulceraciones en el esófago, pilares ruminales, retículo, en la parte proximal, las placas de Peyer estarán hemorrágicas o necróticas. El timo podrá presentarse atrofiado, y su parénquima tendrá apenas las trabéculas de tejido epitelial infiltrado por tejidos grasos, con ausencia de células linfoides. (Latino, 2008, p.763)

Las lesiones son infiltraciones intersticiales mononucleares focales en los riñones, infiltraciones monocitarias hepáticas, necrosis microfocales en el epitelio de la lengua y el esófago. En la parte del sistema nervioso central la hipoplasia cerebral, en el sistema ocular ocurre coriorretinitis con despigmentación de la retina, perdida de las células del cono y bastones y atrofia del nervio óptico, el cristalino puede verse afectado. (Latino, 2008, p.761)

2.11 Diagnóstico

Para el diagnóstico de esta enfermedad se puede aislar el virus de diversos tejidos del animal, lo cual no es complicado. La técnica de diagnóstico más rápida es la detección del antígeno del virus en las muestras de tejido, por medio de la tinción fluorescente de anticuerpos. La prueba serológica estándar para diagnosticar esta enfermedad es la prueba de neutralización. Otras técnicas de diagnóstico es la detección de anticuerpos o antígenos a través de inmunoensayos con enzimas. Una muestra de sangre de estos animales es suficiente para aislar el virus. (Bosque, 2010, p. 286)

“El diagnóstico clínico es de carácter presuntivo-orientativo, no puede ser categórico por más que con los datos recogidos el clínico pueda situarse muy cerca del diagnóstico etiológico o definitivo” (Sigales, 2016, p.342).

2.12 Métodos de Diagnóstico

2.12.1 Aislamiento Viral

Considera la prueba de oro estándar, la cual utiliza principalmente para su diagnóstico tres cultivos celulares proveniente del cornete nasal (BT), riñón de bovino (MDBK) y testículos de bovinos (Btest). También se puede aislar el virus en muestras de sangre, extrayendo la capa leucocitaria. (Saliki & Dubovi, 2004)

“Para la detección y aislamiento del agente viral en animales PI se toman muestras de heces, hisopado de fosas nasales o sangre donde se identifican de mejor manera la presencia del virus” (Saliki & Dubovi, 2004).

2.12.2 Detección del ácido nucleico (RT-PCR)

“Esta prueba es mayormente utilizada para conocer el tipo, genotipo y subgenotipos de vDVB que predominan en el ganado vacuno” (Sandvik, 1999).

2.12.3 Inmunohistoquímica

El vDVB infecta a 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 realizan biopsias de la piel de preferencia del pabellón auricular, las cuales son útiles para la detección de animales persistentemente infectados. (OIE, 2018)

2.13 ELISA de detección de antígenos.

El ensayo de inmunoadsorción ligado a una enzima de captura de antígenos (ELISA Ag) consta de un amplio reconocimiento y utilización para la detección del vDVB. Su uso se debe a su alta sensibilidad y especificidad (100% y 99,6% respectivamente). (Edmondson, y otros, 2007). “Además de ser una prueba rápida y económica. También puede utilizarse de manera masiva principalmente en la identificación y eliminación de animales PI” (Khodakaram & Farjanikish, 2017).

Los sistemas ELISA Ag de captura pueden dar falsos positivos en la detección de animales PI. Estos bovinos pueden ser animales que están pasando o iniciando una infección transitoria o aguda. Por esta razón se sugiere otro muestreo luego de 2 a 3 semanas posteriores para determinar si es una infección aguda o persistente. (Pecora & Pérez, 2017)

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. (Abul k, Andrew H, & Shiv, 2008)

El desarrollo de la prueba ELISA de manera completa, incluyendo la sumatoria de Igm + IgG + IgA, es el procedimiento de mayor sensibilidad para diagnosticar la presencia de anticuerpos, siendo su principal dificultad, la carencia de experiencias clínicas, que permitan correlacionar los resultados con la evolución clínica respectiva. (Saceda, 2020)

Los anticuerpos utilizados en el método ELISA son de origen monoclonal o policlonal que se suministran como antisuero no fraccionado o fracciones de inmunoglobulina purificada, pueden ser solubles o estar inmóviles en un soporte sólido, son empleados como conjugados no marcados o enzimáticos y por último reaccionan con determinante antigénico específico de un antígeno o de un anticuerpo ligando-específico (anticuerpo primario) según el protocolo de análisis. (Hernandez B, 2007)

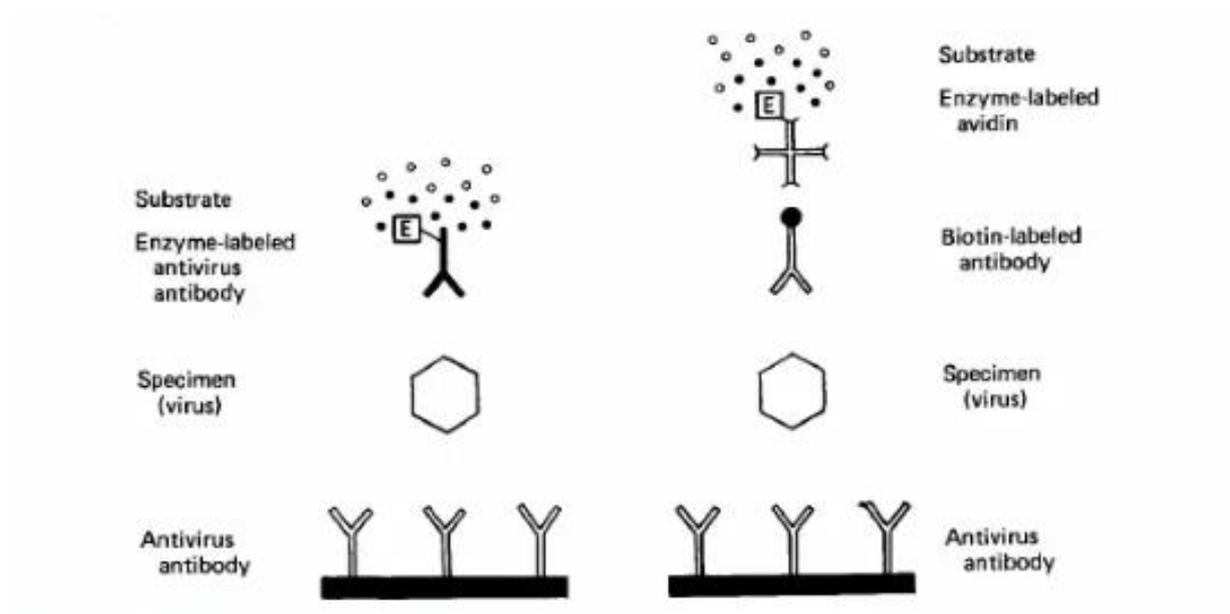
2.13.1 ELISA Competitivo

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. (Abul k, Andrew H, & Shiv, 2008)

2.13.2 ELISA no competitivo

Se enfrenta la muestra con el antígeno o anticuerpo que está en la fase sólida, la positividad de este test es dada 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 que detectan el antígeno y los Indirectos que detectan anticuerpos. (Abul k, Andrew H, & Shiv, 2008)

Figura 3. ELISA directo vs indirecto



Fuente (Murphy, Gibbs, Horzinek, & Studdert, 1999)

3.13.2.1 ELISA directo

El ensayo ELISA 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 dispensado en los pozos y que está 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. (Cultek, 2006)

3.13.2.2 ELISA indirecto

El ensayo ELISA indirecto corresponde a una configuración del inmunoensayo en el cual un antígeno estándar o comercial se adhiere a los pozos de la placa para la detección o “screening” de anticuerpos en muestras de suero. Estos ensayos se conocen convencionalmente como pruebas serológicas o en este caso ELISA serológico. El inmunocomplejo es posteriormente detectado por un anticuerpo secundario conjugado con la enzima catalizadora. En la interpretación del ensayo se debe tener en cuenta que, la concentración de anticuerpo específico presente en el suero se correlaciona directamente con la intensidad del color que resulta de la acción de la enzima sobre su sustrato. (Gan & Patel, 2013)

“Este procedimiento guarda cierta similitud con el desarrollado de en el ELISA directa, pero lo que varía, es que se procede en primer lugar, a agregar un anticuerpo sin enzima y luego uno con enzima” (Zegovia, 2017).

2.13.3 ELISA sándwich

En este procedimiento, dentro de cada uno de los recipientes, se procede a añadir un anticuerpo y luego, la muestra a analizar. Esto, permitirá que los antígenos se alojen en el fondo del pocillo, para posterior a ello, agregar el anticuerpo con la enzima, siendo referida como la modalidad de mayor eficiencia al momento de diagnosticar la presencia de la infección por brucelosis. (Reinhardt, 2018)

2.14 Prevención y Control

Dentro de las estrategias para prevenir y controlar la infección por el VDVB se incluyen medidas de bioseguridad para evitar la introducción de animales infectados en el rodeo, cuarentena de los animales sospechosos, diagnóstico y eliminación de animales persistentemente infectados y la vacunación como nos señala. (Brock, 2004)

“Se recomienda la vacunación de las vacas 30 días antes de la cruce y en los toros a los 5 o 6 meses de edad” (Lesur, 2005).

“Vacunar a los terneros de entre 6 y 10 meses de edad e a las vacas gestantes. Los animales que ya están padeciendo la enfermedad deben ser aislados” (Huarona, 2004, p.77).

“Desinfectar los locales y evitar las visitas, eliminar vectores, agrupar a los animales por edades y vacunar a las hembras en periodo abierto y a las vaquillas que van a reproducirse por primera vez” (Huarona, 2004, p.77).

“Es importante recordad que la vacunación en hembras gestantes provoca efectos teratogénicos. Existen vacunas vivas e inactivadas. Las vacunas modificadas son peligrosas si se usan en vacas gestantes” (Huarona, 2004, p.77).

2.15 Resumen del estado del arte del estudio del problema.

Dentro de los proyectos relacionados de la Universidad Politécnica Salesiana y el grupo de investigación GLOBAGEN, no existen trabajos que tengan vinculación con respecto a la investigación sobre Prevalencia de Diarrea Viral Bovina (DVB) en bovinos fenotipo lechero, mediante análisis de Elisa competitivo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Físicos

Tabla 1. *Materiales Físicos*

Descripción	Unidad	Cantidad
Hojas de papel Boom (A4)	Unidad	150
Computadora	Unidad	1
Cámara Digital	Unidad	1
Esferos	Unidad	3
Libreta	Unidad	1
Guantes de Examinación	Caja	2
Mascarilla	Caja	2
Overol	Unidad	1
Mandil	Unidad	1
Hielera Cooler	Unidad	1
Pipetas desechables	Unidad	200
Agujas #18 x1	Unidad	200
Jeringas 10ml	Unidad	200
Tubos eppendorf	Unidad	200
Tubos Vacutainer	Unidad	200
Nariguera	Unidad	1
Rotulador	Unidad	1
Soga	Unidad	1
Lector de ELISA	Horas	4

3.1.2 Químicos

Tabla 2. *Materiales Químicos*

DESCRIPCION	UNIDAD	CANTIDAD
Kist para determinación de DVB.	Unidad	1
Alcohol	Unidad	2

3.1.3 Biológicos

Tabla 3. *Materiales Biológicos*

DESCRIPCION	UNIDAD	CANTIDAD
Hembras Bovinas	Unidad	186

3.2 Diseño estadístico

En este trabajo por sus características no se realizarán análisis estadísticos paramétricos y pruebas de significancia, sino más bien un análisis objetivo de tipo numérico y proporcional. Para el cálculo de la prevalencia de Diarrea Viral Bovina, se aplicará la siguiente formula:

$$PA = \frac{\text{Total de muestras positivas}}{\text{Total de muestras}} * 100$$

3.3 Metodología estadística

La metodología aplicada en la presente investigación para el cálculo de los resultados y la tabulación de los datos, fue el software EpiInfo 7.2.5.0, con la base de datos diseñada en el software Excel.

3.4 Población

La población a probar será de 186 animales, en los hatos ganaderos de la zona de San Gerardo, cada una de las muestras tendrá su respectiva rotulación indicándonos los datos del animal muestreado.

3.4.1 Selección y tamaño de la muestra

En la selección de muestra la fórmula empleada:

$$n = \frac{z^2 * p * q}{d^2}$$

Donde

- p = 0.863 Prevalencia referencial
- q = (1-p) Probabilidad de que no ocurra el evento.
- Z = 1.96 Nivel de confianza al 95%
- E = 0.05 Error máximo permisible.
- n= Número mínimo de muestra.

Sustitución de la fórmula: $n = \frac{1.96^2 * (0.863) * (1 - 0.863)}{0.05^2}$

Según la fórmula utilizada, el número estimado de muestras a recolectar es de 181.6 muestras, para ajustar a un número divisible se trabajará con 186 muestras.

3.4.2 Obtención de la muestra

Para la recolección se utilizarán tubos sin anticoagulante, agujas (18x1) marca vacutainer, viales de plástico para depositar el suero, hoja de registro para animales muestreados, marcador para rotular los tubos y kit comercial ELISA.

La muestra de sangre se extraerá de la vena yugular, coccígea, con agujas marca vacutainer, depositándola en tubo sin coagulante dejándola reposar de 30 a 45 minutos para la separación del suero.

En una hoja se registrará todos los datos pertenecientes a los animales muestreados, tales como: hato del cual proviene, edad, número de identificación individual o alguna característica.

El suero se conservará en refrigeración entre 2 y 4 °C con hielo y será trasladado en vehículo hasta el laboratorio de la Clínica Veterinaria PoliVet para su análisis.

3.4.3 Toma de registro y datos

Se empleó fichas en las que constaba los datos de los animales muestreados, datos del propietario, esto nos ayudó a tener un control sobre las muestras obtenidas.

3.4.4 Procesamiento de la muestra

Se procede a centrifugar la muestra por 5-10 minutos a 3500 revoluciones por minuto, hasta la obtención del suero, posterior a esto se coloca el suero en los tubos eppendorf, se mantiene en temperatura ambiente hasta su procesamiento en los pocillos, los reactivos se deben ya mantener a temperatura de 21°C, antes de utilizarlos.

A continuación, se debe añadir 90 ul de diluyente 19 en cada pocillo, 10ul para el control positivo en los pocillos A1 y B1, 10ul para el control negativo en los pocillos C1 y D1, a continuación, 10ul de cada muestra a analizar en los pocillos restantes, posterior a esto se debe cubrir la placa e incubar 45 minutos \pm 5 minutos a 37°C (\pm 3°C). A continuación, se vacía los pocillos y se lava 3 veces cada pocillo con al menos 300ul de Solución de lavado, y se debe evitar el secado en cada lavado.

Después se debe añadir 100ul de conjugado listo para usar a cada pocillo, a continuación, se debe cubrir la placa e incubar por 30 min \pm 3 minutos a 21°C. Después se debe vaciar los pocillos y lavar 3 veces cada pocillo con al menos 300ul de solución de lavado y evitar el desecado, después añadir 100ul de la Solución de revelación a cada pocillo y cubrir la placa e incubar por 15min \pm 2 min a 21°C en la oscuridad. Por último, se debe distribuir 100ul de

Solución de parada a cada pocillo, para parar la reacción, a continuación, leer la microplaca a 450nm.

3.5 Operacionalización de variables

3.5.1 Variables independientes

Tabla 4. *Variables independientes: Suero de origen Bovino*

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

3.5.2 Variables dependientes

Tabla 5. *Variables dependientes: Elisa para DVB*

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

3.6 Consideraciones éticas

En la presente investigación los animales muestreados no sufrieron ningún tipo de maltrato, ya que se prioriza el bienestar animal, desde la limpieza de la zona a realizar la punción, hasta los equipos estériles para la obtención de la muestra.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Prevalencia Total

Tabla 6. *Prevalencia Total*

Prevalencia Total	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
DUDOSO	6	3,23%	1,19%	6,89%
NEGATIVO	97	52,15%	44,72%	59,51%
POSITIVO	83	44,62%	37,35%	52,07%
TOTAL	186	100,00%		

De acuerdo con el trabajo investigativo realizado en la Zona de San Gerardo, de las 186 muestras obtenidas para determinar la prevalencia de diarrea viral bovina, mediante la técnica de ELISA COMPETITIVO, como se puede observar en la tabla 6, se obtuvo 44,62% (83/186) de casos positivos y el 3,23% (6/186) de animales dudosos. Por la inexistencia de información respecto a la prevalencia de diarrea viral bovina en la zona de San Gerardo, es imposible comparar los datos obtenidos en el trabajo investigativo, sin embargo, estos datos son un aporte inicial para los ganaderos y veterinarios, que tienen ahora una línea base de información respecto a la diarrea viral bovina.

Según MORENO PEÑA (2019): nos indica que en el año 2019 obtuvo una prevalencia de 11,04% de casos positivos en el cantón Santa Rosa, en zonas dedicadas a la producción de leche. Según BURGASÍ CRUZ (2014) en su estudio titulado; DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ENDOPARASITARIAS EN HATOS LECHEROS DE PEQUEÑOS PRODUCTORES, EN LAS COMUNIDADES DE TAXOJALÓ Y GUANTUALÓ, DEL CANTÓN SIGCHOS PROVINCIA DE COTOPAXI, menciona que obtuvo una prevalencia de 30,48% en 98 animales muestreados. Según Bautista (2011), en su estudio: SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA EN LAS CUENCAS GANADERAS DE CINCO

DISTRITOS DE LA REGION AYACUCHO, nos indica que obtuvo un prevalencia total de $75,3 \pm 4,3\%$ (290/385) de casos positivos.

Debemos tener en cuenta que las investigaciones de los otros autores, se dieron con diferentes factores, uno de ellos la cantidad de animales muestreados.

4.2 Prevalencia por Procedencia

Tabla 7. *Prevalencia por Procedencia (Dudoso)*

PREVALENCIA TOTAL = DUDOSO				
PROCEDENCIA	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
Bestion	2	33,33 %	4,33 %	77,72 %
Cristal Aguarongos	0	0,00 %	0,00 %	45,93 %
Cristal Minas De Lastre	2	33,33 %	4,33 %	77,72 %
Hacienda Palacio De Cristal	1	16,67 %	0,42 %	64,12 %
San Gerardo	1	16,67 %	0,42 %	64,12 %
Yerba Buena	0	0,00 %	0,00 %	45,93 %
TOTAL	6	100,00 %		

Tabla 8. *Prevalencia por Procedencia (Positivo)*

PREVALENCIA TOTAL = POSITIVO				
PROCEDENCIA	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
Bestion	13	15,66 %	8,61 %	25,29 %
Cristal Aguarongos	9	10,84 %	5,08 %	19,59 %
Cristal Minas De Lastre	15	18,07 %	10,48 %	28,05 %
Hacienda Palacio De Cristal	6	7,23 %	2,70 %	15,07 %
San Gerardo	33	39,76 %	29,17 %	51,10 %
Yerba Buena	7	8,43 %	3,46 %	16,61 %
TOTAL	83	100,00 %		

Como se puede observar en la tabla 8, la localidad con mayor prevalencia de diarrea viral bovina es San Gerardo con un 39,76% (33/83) de casos positivos, seguido de Cristal Minas de Lastre con un 18,07% (15/83) casos positivos, seguida de Bestion con 15,66% (13/83) casos positivos, luego le sigue la localidad de Cristal Aguarongos con 10,84% (9/83), seguida de Yerba Buena con 8,43% (7/83) casos positivos, y por último la localidad de Hacienda Palacio

de Cristal con 7,23% (6/83) casos positivos respectivamente. Como se observa en la tabla 7, las localidades de Bestion y Cristal Minas de Lastre presentan un 33,33% (4/6), seguida de la Hacienda Palacio de Cristal y San Gerardo que presentan un 16,67% (2/6) respectivamente.

Esta variable no se puede comparar debido a que no existen datos bibliográficos respecto a la DVD en la zona muestreada.

4.3 Prevalencia por Raza

Tabla 9. *Prevalencia por Raza (Dudoso)*

PREVALENCIA TOTAL = DUDOSO				
RAZA	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
BROWN SWISS	0	0,00 %	0,00 %	45,93 %
HOLSTEIN F1	6	100,00 %	54,07 %	100,00 %
JERSEY	0	0,00 %	0,00 %	45,93 %
TOTAL	6	100,00 %		

Tabla 10. *Prevalencia por Raza (Positivo)*

PREVALENCIA TOTAL = POSITIVO				
RAZA	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
BROWN SWISS	2	2,41 %	0,29 %	8,43 %
HOLSTEIN F1	75	90,36 %	81,89 %	95,75 %
JERSEY	6	7,23 %	2,70 %	15,07 %
TOTAL	83	100,00 %		

En base a las muestras obtenidas de los hatos ganaderos, la prevalencia por raza se clasifico en Brown Swiss, Holstein F1 y Jersey. De acuerdo a la tabla 10, la raza Holstein F1 tiene una mayor prevalencia, siendo esta de 90,36% (75/83) casos positivos, seguida 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. En cuanto a los animales dudosos se obtuvo un 100% (6/6) en la raza Holstein F1, como se puede evidenciar en la tabla 9.

Según González Carbajal (2016), en su estudio titulado: “ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA EN GANADERÍAS DEL CANTÓN SARAGURO, PROVINCIA DE LOJA”; menciona que la raza Jersey presentó el porcentaje 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%.

Debemos tener presente que la raza Holstein F1 es la más común en la zona de San Gerardo, y fue en esta raza la que mayor cantidad de muestras se obtuvo, por lo tanto, se relaciona la cantidad de casos positivos.

4.4 Prevalencia por Sexo

Tabla 11. *Prevalencia por Sexo (Dudoso)*

PREVALENCIA TOTAL = DUDOSO				
SEXO	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
HEMBRA	6	100,00 %	54,07 %	100,00 %
TOTAL	6	100,00 %		

5.

Tabla 12. *Prevalencia por Sexo (Positivo)*

PREVALENCIA TOTAL = POSITIVO				
SEXO	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
HEMBRA	83	100,00 %	95,65 %	100,00 %
TOTAL	83	100,00 %		

Como se evidencia en la tabla 12, 83 hembras bovinas presentan una prevalencia del 100% de casos positivos, debemos tener en cuenta que el contagio es más común en hembras, por lo que la probabilidad aumenta, en comparación con los machos bovinos. Esto debido a que los ganaderos generalmente manejan ya sea uno o varios padrotes para todas las vacas.

4.5 Prevalencia por Edad

Tabla 13. *Prevalencia por Edad (Dudoso)*

PREVALENCIA TOTAL = DUDOSO				
EDAD (AÑOS)	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
3	1	16,67 %	0,42 %	64,12 %
4	3	50,00 %	11,81 %	88,19 %
5	2	33,33 %	4,33 %	77,72 %
TOTAL	6	100,00 %		

Tabla 14. *Prevalencia por Edad (Positivo)*

PREVALENCIA TOTAL = POSITIVO				
EDAD (AÑOS)	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
3	25	30,12 %	20,53 %	41,18 %
4	43	51,81 %	40,56 %	62,92 %
5	15	18,07 %	10,48 %	28,05 %
TOTAL	83	100,00 %		

Como se observa en la tabla 14, 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, seguida de la edad de 3 años con una prevalencia de 30,12% (25/83) casos positivos y por último la edad de 5 años con una prevalencia de 18,07% (15/83) casos positivos. En la tabla 13, también se puede evidenciar que existe 3 casos dudosos en el grupo de edad de 4 años con una prevalencia de 50,00% (3/6), seguido de 2 casos en el grupo de edad de 5 años con una prevalencia de 33,33% (2/6) y por último 1 caso dudoso en el grupo de edad de 3 años con una prevalencia de 16,67% (1/6). Según Jara Chamba (2009): En su trabajo investigativo nos indica que presenta una prevalencia mayor en animales desde los 1 a los 4 años de edad, esto sin descartar animales con mayor o menor edad y prevalencia, debemos tener en cuenta que animales desde los 6 meses de edad ya pueden ser positivos. En el estudio de Quispe, Ccama, Rivera, & M (2008): Nos indica que la prevalencia en animales de hasta dos años fue de 36,6% (56/153) casos positivos

y en animales mayores de dos años fue de 56,7% (110/194). Por lo tanto, para determinar una prevalencia por edades, lo más recomendable sería realizarlas por diferentes grupos y evaluar a los animales de todas las edades.

4.6 Prevalencia por Abortos

Tabla 15. *Prevalencia por Abortos (Dudoso)*

PREVALENCIA TOTAL = DUDOSO				
ABORTOS	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
NO	6	100,00 %	54,07 %	100,00 %
SI	0	0,00 %	0,00 %	45,93 %
TOTAL	6	100,00 %		

Tabla 16. *Prevalencia por Abortos (Positivo)*

PREVALENCIA TOTAL = POSITIVO				
ABORTOS	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
NO	82	98,80 %	93,47 %	99,97 %
SI	1	1,20 %	0,03 %	6,53 %
TOTAL	83	100,00 %		

Como se puede observar en la tabla 16, de los 83 animales positivos, solo 1 animal presento abortos, determinando una prevalencia de 1,20% del total de animales positivos, también podemos observar en la tabla 15, que los 6 casos dudosos en ninguno se presentaron algún aborto.

Debemos tener en cuenta que, de los 183 animales muestreados, dos animales presentaban abortos, solo uno de los dos casos marco positivo a la enfermedad de diarrea viral bovina, por lo que el aborto generado en la vaca negativa pueda deberse a otra enfermedad.

4.7 Prevalencia por Estado de Desarrollo

Tabla 17. *Prevalencia por Estado de Desarrollo (Dudoso)*

PREVALENCIA TOTAL = DUDOSO					
ESTADO DE DESARROLLO	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%	
LACTACION	6	100,00 %	54,07 %	100,00 %	
PREÑADA NO SECA	0	0,00 %	0,00 %	45,93 %	
TOTAL	6	100,00 %			

Tabla 18. *Prevalencia por Estado de Desarrollo (Positivo)*

PREVALENCIA TOTAL = POSITIVO					
ESTADO DE DESARROLLO	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%	
LACTACION	82	98,80 %	93,47 %	99,97 %	
PREÑADA NO SECA	1	1,20 %	0,03 %	6,53 %	
TOTAL	83	100,00 %			

Como se puede observar en la tabla 18, en el grupo de Lactación tenemos una prevalencia del 98,80% (82/83) de casos positivos. De igual manera el grupo de preñada no seca indicándonos una prevalencia de 1,20% (1/83) de casos positivos. También podemos observar en la tabla 17, que el grupo de Lactación presenta 6 casos dudosos. Debemos tener en cuenta que la mayoría de animales muestreados se encontraban en estado de Lactación, por lo tanto, la prevalencia estará relacionada con la mayoría de casos positivos.

4.8 Prevalencia por Parto

Tabla 19. *Prevalencia por Parto (Dudoso)*

PREVALENCIA TOTAL = DUDOSO				
NUMERO DE PARTO	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
1	1	16,67 %	0,42 %	64,12 %
2	3	50,00 %	11,81 %	88,19 %
3	2	33,33 %	4,33 %	77,72 %
4	0	0,00 %	0,00 %	45,93 %
TOTAL	6	100,00 %		

Tabla 20. *Prevalencia por Parto (Positivo)*

PREVALENCIA TOTAL = POSITIVO				
NUMERO DE PARTO	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
1	25	30,12 %	20,53 %	41,18 %
2	43	51,81 %	40,56 %	62,92 %
3	12	14,46 %	7,70 %	23,89 %
4	3	3,61 %	0,75 %	10,20 %
TOTAL	83	100,00 %		

En el trabajo investigativo se muestreo a vacas desde 1 a 4 partos, como se puede observar que los animales con mayor prevalencia son los de primer y segundo parto, debemos tener en cuenta que algunos de los animales muestreados nacieron siendo portadores de la enfermedad, por lo que se debe implementar un mayor control para disminuir la prevalencia de la enfermedad. Como se puede evidenciar en la tabla 20, los animales que tienen 2 partos presentan una prevalencia de 51,81% (43/83) de casos positivos, así también los de 1 parto, con una prevalencia de 30,12% (25/83) de casos positivos, los animales con 3 partos presentan una prevalencia de 14,46% (12/83) casos positivos, y por último por 4 partos con una prevalencia de 3,61% (3/83) casos positivos. Además, según la tabla 19, nos indica que, por 2 partos, existe una prevalencia de 50,00% (3/6) de casos dudosos, seguida por 3 partos con una prevalencia de 33,33% (2/6) casos dudosos, y, por último, por 1 parto tenemos una prevalencia de 16,67% (1/6) casos dudosos. Según (Nava, Bracamonte, Hidalgo, & Escobar, 2013) en su estudio nos indica que; en vacas ≤ 2 partos se obtuvo una prevalencia de 56,6% (96/170), mientras que en el grupo de vacas ≥ 3 partos hubo una prevalencia de 70,7% (106/150) casos positivos. Debemos tener en cuenta que el factor edad estaría relacionado directamente con el número de parto, ya que mientras a más edad mayor cantidad de partos y por consiguiente mayor probabilidad de presentar la enfermedad.

4.9 Prevalencia por tipo de Reproducción

Tabla 21. *Prevalencia por tipo de Reproducción (Dudoso)*

PREVALENCIA TOTAL = DUDOSO				
TIPO DE REPRODUCCION	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
INSEMINACION	1	16,67 %	0,42 %	64,12 %
MIXTA	1	16,67 %	0,42 %	64,12 %
MONTA NATURAL	4	66,67 %	22,28 %	95,67 %
TOTAL	6	100,00 %		

Tabla 22. *Prevalencia por tipo de Reproducción (Positivo)*

PREVALENCIA TOTAL = POSITIVO				
TIPO DE REPRODUCCION	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
INSEMINACION	9	10,84 %	5,08 %	19,59 %
MIXTA	18	21,69 %	13,39 %	32,09 %
MONTA NATURAL	56	67,47 %	56,30 %	77,35 %
TOTAL	83	100,00 %		

Durante la toma de muestras se tabularon 3 tipos de reproducciones las cuales son, inseminación, monta natural y mixta, estas son el medio principal para la diseminación de la enfermedad, como observamos en la tabla 22, 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 la tabla 21 tenemos los casos dudosos respecto al tipo de reproducción, por lo tanto, en monta natural tenemos una prevalencia de 66,67% (4/6) casos dudosos, seguido de inseminación y reproducción mixta con un 16,67% (2/6) respectivamente de casos dudosos.

En base a los resultados no podemos determinar con exactitud cuál es el método más seguro para evitar el contagio, ya que, por mal manejo de bioseguridad de los ganaderos, el resultado de la enfermedad será el mismo.

5 Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en la presente investigación, se llega a la conclusión que:

De los 186 animales muestreados en la Zona de San Gerardo, se determinó una prevalencia de 44,62%, es decir 83 animales positivos.

En el estudio realizado en la Zona de San Gerardo, se encontró la presencia de Diarrea Viral Bovina en la raza Holstein F1, con una prevalencia de 90,36%, a comparación con la raza Jersey y Brown Swiss, teniendo en cuenta que es la raza más común de la zona.

De todos los animales muestreados en relación con abortos, se obtuvo que, de los 83 animales positivos, solo 1 vaca presento aborto.

En base al tipo de reproducción se concluye que la monta natural tiene una mayor prevalencia de la enfermedad en la Zona de San Gerardo con un 67,47%, en comparación con inseminación (10,84%) y mixta (21,69%).

La falta de registros de los ganaderos genera mayor dificultad al momento de llevar un registro y así mismo un bajo control de bioseguridad, afectando de manera directa a los animales.

5.2 Recomendaciones

Realizar charlas capacitadoras para los ganaderos, enfocadas en las enfermedades más comunes que afectan a los animales (bovinos), para intentar minimizar el contagio.

Al momento de realizar la adquisición de animales nuevos, realizar el respectivo análisis de enfermedades., así como también cuarentena hasta obtener resultados.

Se recomienda la intervención de las entidades de control, para obtener más información respecto a la enfermedad, para así generar un manejo y control adecuado en los hatos ganaderos.

Se recomienda la realización de protocolos de vacunación, teniendo en cuenta la edad, estado de salud del animal, tipo de vacuna, con el fin de minimizar el contagio de la enfermedad.

Se recomienda el descarte de los animales positivos a DVB muestreados en los diferentes sectores, con el fin de evitar el contagio y reducir el % de prevalencia en la zona de San Gerardo.

6 Bibliografía

- Abul k, A., Andrew H, L., & Shiv, P. (2008). *INMUNOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR*. USA: Elseiver. Obtenido de <http://www.untumbes.edu.pe/vcs/biblioteca/document/varioslibros/0870.%20Inmunolog%C3%ADa%20celular%20y%20molecular.pdf>
- Bautista, F. (2011). Seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en las cuencas ganaderas de cinco distritos de la región Ayacucho. (*Tesis de grado*). Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho.
- Bolin R, S., & Grooms L, D. (2004). Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 20(1), 51-68.
- Bosque, M. M. (2010). *Producción de leche en zonas templadas y tropicales*. México D.F: Trillas.
- BURGASÍ CRUZ, E. G. (2014). DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ENDOPARASITARIAS EN HATOS LECHEROS DE PEQUEÑOS PRODUCTORES, EN LAS COMUNIDADES DE TAXOJALÓ Y GUANTUALÓ, DEL CANTÓN SIGCHOS PROVINCIA DE COTOPAXI. (*TESIS DE GRADO*). Universidad Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba.
- Cauti, S. M. (2002). Detección de Terneros con Infección congénita con el virus de la diarrea viral bovina en dos hatos lecheros de la provincia de Arequipa. (*Tesis de Grado*). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Chase, C. C., Elmowalid, G., & Yousif, A. A. (2004). The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantly changing picture. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 20(1), 95-114.

- Childs, T. (1946). X Disease of Cattle-Saskatchewan. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, 10(11), 316-319.
- Cultek. (2006). *Fundamentos y Tipos de ELISAs*. Obtenido de <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>
- David, G. P., Crawshaw, T. R., Gunning, R. F., Hibberd, R. C., Lloyd, G. M., & Marsh, P. R. (1994). Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *The Veterinary record*, 134(18), 468-472. doi:<https://doi.org/10.1136/vr.134.18.468>
- Dirksen, G., Grunder, H.-D., & Stober, M. (2005). *Medicina Interna y Cirugía del Bovino*. Buenos Aires: Inter-Médica.
- Ecuador, C. P. (2022). *CodigoPostalEcuador.com*. Obtenido de <http://www.codigopostalecuador.com/san-gerardo-giron-504>
- Edmondson, M. A., Givens, M. D., Walz, P. H., Gard, J. A., Stringfellow, D. A., & Carson, R. L. (2007). Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhoea virus in diagnostic samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(4), 376-381. doi:<https://doi.org/10.1177/104063870701900406>
- Escudero, G. (2015). Prevalencia de Diarrea Viral Bovina en vacas lecheras de las ganaderías del cantón Loja. (*Tesis de Grado*). Universidad Nacional De Loja, Loja.
- Fernando, G. P. (2019). *Gad Parroquial San Gerardo*. Obtenido de <https://sangerardo.gob.ec/azuay/datos-generales/>
- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(9).

- García, I., & Zafra, R. (2019). *Enfermedades infectocontagiosas en rumiantes: Manuales clínicos de Veterinaria*. Barcelona: Elsevier.
- Gerardo, G. A. (2015). *ODS Territorio Ecuador*. Obtenido de https://odsterritorioecuador.ec/wp-content/uploads/2019/04/PDOT_PARROQUIA_SAN_GERARDO_2015-2019.pdf
- Giraud, J. A. (2000). Diarrea Viral Bovina. *Jornada sobre enfermedades emergentes del bovino*. Universidad Nacional De Río Cuarto, Córdoba.
- González Carbajal, K. J. (2016). ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA EN GANADERÍAS DEL CANTÓN SARAGURO, PROVINCIA DE LOJA. (TESIS DE GRADO). Universidad Nacional de Loja, Loja.
- Goyal, S. M., & Ridpath, J. F. (2008). *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control*. John Wiley & Sons.
- Gripshover, E. M., Givens, M. D., Ridpath, J. F., Brock, K. V., Whitley, E. M., & Sartin, E. A. (2007). Variation in Erns viral glycoprotein associated with failure of immunohistochemistry and commercial antigen capture ELISA to detect a field strain of bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Microbiology*, *125*(1-2), 11-21.
- Grooms, D. L. (2004). Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, *20*(1), 5-19.
- Hamel, A. L., Wasylyshen, M. D., & Nayar, G. P. (1995). Rapid detection of bovine viral diarrhea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, *33*(2), 287-291.

- Health, P. A., & University, C. (1996). *International Symposium: Bovine Viral Diarrhea Virus, a 50 Year Review, June 23-25, 1996, at the College of Veterinary Medicine, Cornell University*. New York: The College.
- Hernandez B, D. (2007). Estandarización de la técnica de ELISA para cuantificar cortisol en saliva, elaborando los reactivos biológicos. (*Tesis de Grado*). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Houe, H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*, 64(2-3), 89-107.
- Huamán, J. C. (2006). Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina, y animales persistentemente infectados con el virus, en hatos productores de leche de la irrigación de Majes, Arequipa. (*Tesis de Grado*). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Huarona, J. (2004). *Sanidad de vacunos de leche*. Lima: Empresa Editorial Macro.
- Jara Chamba, D. V. (2009). Estudio de seroprevalencia de Diarrea Vírica Bovina (DVB) y Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) en la provincia de Loja (Ecuador) por medio de Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) y su distribución epidemiológica geoespacial. (*TESIS DE GRADO*). Universidad Particular de Loja, Loja.
- Khodakaram, T. A., & Farjanikish, G. (2017). Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. *Iranian Journal Of Veterinary Reserch*, 18(3), 154-163.
- Latino, G. (2008). *Manual del ganadero actual*. Colombia: Grupo Latino Editores.
- Lértora, W. J. (2003). Diarrea viral bovina: actualización. *Rev. Vet*, 14(1), 40-48.
- Lesur, L. E. (2005). *Manual del Ganado Bovino para Leche*. México D.F: Trillas.

Maps, G. (2021). *Google*. Obtenido de <https://www.google.com/maps/place/Universidad+Polit%C3%A9cnica+Salesiana+del+Ecuador/@-2.8874515,-78.9923681,17.96z/data=!4m5!3m4!1s0x91cd1826d90c7e47:0x8eb47b6b0138cb74!8m2!3d-2.8869248!4d-78.9892568?hl=es>

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, Machala.

Murphy, F., Gibbs, E., Horzinek, M., & Studdert, M. (1999). *Veterinary Virology*. California: Elseiver.

Nava, L. Z., Bracamonte, P. M., Hidalgo, D. M., & Escobar, R. T. (2013). Seroprevalencia de la diarrea viral bovina en rebaños lecheros de dos municipios del estado Barinas, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 33(2), 162-168.

OIE. (2012). *Mapas de distribucion mundial de la Diarrea Viral Bovina*. Obtenido de http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap

OIE. (2018). *Diarrea Viral Bovina. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los animales terrestres*. Obtenido de <https://www.oie.int/es/enfermedad/diarrea-viral-bovina/>

Olafson, P., Maccallum, A. D., & Fox, F. H. (1946). AN APPARENTLY NEW TRANSMISSIBLE DISEASE OF CATTLE. *Veterinary College*, 36, 205-213.

- Pecora, A., & Pérez, M. S. (2017). *Actualización en diarrea viral bovina, herramientas diagnósticas y estrategias de prevención*. Buenos Aires: INTA.
- Quispe, R., Cama, A., Rivera, H., & Araínga, M. (2008). El virus de la diarrea viral en bovinos criollos de la provincia de melgar, Puno. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 19(2), 176-182.
- Quispe, R., Ccama, A., Rivera, H., & M, A. (2008). EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL EN BOVINOS CRIOLLOS DE LA PROVINCIA DE MELGAR, PUNO. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 19(2), 176-182.
- Reinhardt, G. (2018). Utilización del Método de Elisa en la detección directa de antígeno de virus diarrea viral bovina en muestras de suero sanguíneo de bovinos. *Archivos de medicina veterinaria*, 35(1), 89-93. Obtenido de https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732003000100009
- Reinhardt, G., Carrasco, L., Tadich, N., & Riedemann, S. (2001). Comparación entre dos técnicas de diagnóstico para diarrea viral bovina (dvb) en 50 predios de la x región, Chile: Seroneutralización y enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA-i). *Archivos de medicina veterinaria*, 32(2), 173-183.
- Ridpath, J. F. (2003). BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 31(2), 127-131.
- Ridpath, J. F., Bolin, S. R., & Dubovi, E. J. (1994). Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, 205(1), 66-74.
- Rivera, H. (1993). EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (BVD). *Revistas de investigaciones Veterinarias del Perú*, 6(1).

- Roger, W., & Blowey, A. D. (2004). *Atlas a color de enfermedades y transtornos del ganado vacuno*. Madrid: Elseiver.
- Rondón, I. (2006). DIARREA VIRAL BOVINA: PATOGÉNESIS E INMUNOPATOLOGÍA. *Revista MVZ Córdoba*, 11(1), 694-704.
- Saa, L. R., Perea, A., García-Bocanegra, I., Arenas, A. J., Jara, D. V., Ramos, R., & Carbonero, A. (2012). Seroprevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. *Tropical animal health and production*, 44(3), 645-649.
- Saceda, D. (2020). *ELISA*. Obtenido de Web Consultas - Rev de Salud y Bienestar : <https://www.webconsultas.com/pruebas-medicas/elisa-germen>.
- Saliki, J. T., & Dubovi, E. J. (2004). Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20(1), 69-83.
- Sandvik, T. (1999). Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary microbiology*, 64(2-3), 123-134.
- Sigales, J. M. (2016). *Patología y Clínica Bovina: Recopilación de clases y relatos de la experiencia práctica de un veterinario de campo*. Buenos Aires: Inter-Médica.
- Vargas, D. S., Jaime, J., & Vera, V. J. (2009). Perspectivas para el control del virus de la diarrea viral bovina (BVDV). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22(4), 677-688.
- Zapata, A. L., & 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, León.

Zegovia, P. (2017). *Prueba elisa en animales*. Obtenido de SlideShare:
<https://es.slideshare.net/MendezPau/prueba-elisa-en-animales>

7 Anexos

Figura 4. Toma de Muestras*Figura 5. Manejo de hatos ganaderos**Figura 6. Colocación de muestra y conservación*

