



Detección de terneras persistentemente infectadas (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (vDVB), en tres hatos de producción lechera del cantón Mejía – Ecuador

Rivadeneira Espinoza, Patricia Mishell

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Dr. Ron Román, Jorge Washington, PhD.

23 de febrero del 2022



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación **“Detección de terneras persistentemente infectadas (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (vDVB), en tres hatos de producción lechera del cantón Mejía – Ecuador”** fue realizado por la señorita **Rivadeneira Espinoza, Patricia Mishell**, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangoquí, 23 de febrero de 2022



Firmado electrónicamente por:
**JORGE
WASHINGTON RON
ROMAN**

Ron Román, Jorge Washington, PhD.

C.C: 1709505125



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Responsabilidad de Autoría

Yo, Rivadeneira Espinoza, Patricia Mishell, con cédula de identidad N° 1600482879, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Detección de terneras persistentemente infectadas (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (vDVB), en tres hatos de producción lechera del cantón Mejía – Ecuador”**; es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí. 23 de febrero de 2022

Rivadeneira Espinoza, Patricia Mishell

C.C: 1600482879



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Autorización de Publicación

Yo, **Rivadeneira Espinoza, Patricia Mishell**, con cédula de ciudadanía N° 1600482879, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, publicar el trabajo de titulación: **“Detección de terneras persistentemente infectadas (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (vDVB), en tres hatos de producción lechera del cantón Mejía – Ecuador”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

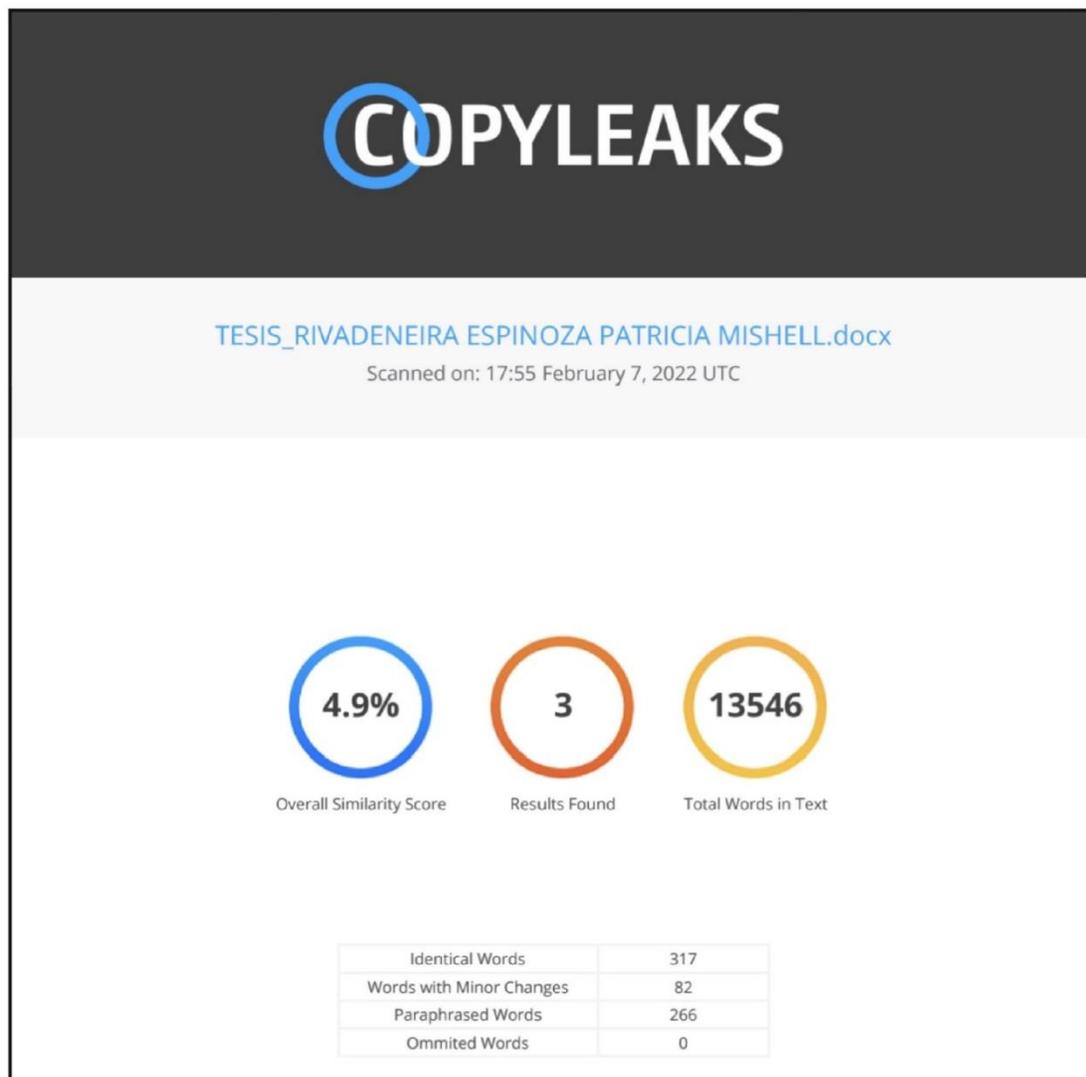
Sangolquí, 23 de febrero de 2022



Rivadeneira Espinoza, Patricia Mishell

C.C: 1600482879

Reporte de verificación de similitud de contenidos



Ron Román, Jorge Washington, PhD.

C.C: 1709505125

Dedicatoria

A mis padres, Cosme Rivadeneira y Nelly Espinoza, por su gran amor y comprensión, por creer siempre en mi capacidad de crecer como persona, por ser mi sustento y fortaleza en todo este tiempo de estudios, que nunca se rindieron y me dieron su máxima confianza que este día llegaría pronto y se sientan muy orgullosos de lo que soy y seré en un futuro cercano.

Patricia Mishell Rivadeneira Espinoza

Agradecimientos

En primera instancia, quiero enfatizar mis agradecimientos:

Al Dr. Julio César Paredes Muñoz, porque sin su ayuda no hubiera sido posible la realización de este proyecto de investigación, además de contar con su apoyo para el acceso a las haciendas y encaminarme en mi formación profesional.

A mi tutor, Dr. Jorge Ron Román, y guías Ing. Diego Vela Tormen y Dr. Armando Reyna Bello por ser pacientes y amables en el desarrollo de este trabajo y proporcionarme conocimientos y consejos en la elaboración de mi tesis de grado.

A cada uno de los trabajadores de las haciendas por su apoyo en la toma de muestras sanguíneas y a los administradores por proporcionarme de la información primordial para culminar con la investigación.

Al Dr. Euclides de la Torre e Ing. Carla Moreno por su ayuda prestada para la realización y culminación de mi tesis de grado.

Gracias al laboratorio TIER-ZENTRUM, con la adquisición de equipos, reactivos e insumos indispensables para el diagnóstico serológico.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, en especial a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria – IASA 1 por la confianza, enseñanzas, conocimientos y valores adquiridos a lo largo de esta etapa profesional que es y será esencial en mi vida.

Patricia Mishell Rivadeneira Espinoza

Índice de contenidos

Carátula.....	1
Certificación	2
Responsabilidad de Autoría	3
Autorización de Publicación	4
Reporte de verificación de similitud de contenidos.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos.....	8
Índice de tablas.....	12
Índice de figuras.....	13
Resumen.....	14
Abstract.....	15
Capítulo I.....	16
Introducción.....	16
Antecedentes	16
Justificación.....	17
Objetivos	18
Objetivo General	18
Objetivos Específicos	18
Hipótesis.....	19
Hipótesis nula	19
Hipótesis alternativa	19
Capítulo II.....	20
Revisión de la Literatura	20

Ganadería en el Ecuador.....	20
Ganadería en el cantón Mejía, provincia de Pichincha.....	20
Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina en Ecuador	21
Factores de riesgo en la sanidad animal.....	21
Virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB).....	22
Biotipos	23
Genotipos	24
Fuentes de infección.....	25
Modos de transmisión.....	25
Transmisión vertical	25
Transmisión horizontal	26
Patogénesis.....	26
Signos clínicos	27
Infección aguda.....	27
Infección persistente	28
Infección en hembras gestantes.....	30
Infección en terneros recién nacidos	30
Enfermedades de las mucosas.....	31
Diagnóstico del vDVB	31
Pruebas para el diagnóstico del virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB)	32
Aislamiento viral	32

	10
Inmunohistoquímica	32
Detección del ácido nucleico (RT-PCR)	33
ELISA de detección de antígenos.....	33
Control y prevención	34
Capítulo III.....	35
Metodología	35
Trabajo de campo	35
Área de estudio	35
Ubicación geográfica.....	37
Determinación del tamaño de la muestra.....	38
Aplicación de encuesta epidemiológica.....	40
Recolección de información de terneras muestreadas (registros)	40
Obtención de muestras sanguíneas.....	41
Materiales, equipos y reactivos.....	41
Procedimiento	41
Trabajo de laboratorio.....	42
Obtención de suero sanguíneo.....	42
Materiales, equipos y reactivos.....	42
Procedimiento	43
ELISA Sándwich de captura de antígeno para DVB.....	43
Materiales, equipos y reactivos.....	43
Procedimiento	44

Validación e interpretación de resultados	45
Determinación de la prevalencia de la enfermedad vírica (vDVB)	46
Análisis de datos	47
Determinación de los factores de riesgo	47
Difusión de los resultados.....	49
Capítulo IV	50
Resultados y Discusión	50
Estadística descriptiva de las muestras	50
Distribución de las terneras muestreadas por hacienda	50
Distribución de las terneras muestreadas por edad.....	50
Distribución de las terneras muestreadas por raza	51
Prevalencia general de antígenos al virus de la diarrea viral bovina (vDVB).....	52
Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina por hacienda	54
Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina por edad.....	55
Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina por tipo de raza.....	56
Datos generales de las haciendas de producción lechera	57
Factores de riesgo para el virus de la diarrea viral bovina	58
Socialización de resultados y recomendaciones sobre el control del vDVB	61
Capítulo V	62
Conclusiones y Recomendaciones	62
Conclusiones.....	62
Recomendaciones	63
Bibliografía	64

Índice de tablas

Tabla 1	<i>Número de terneras muestreadas de cada hato ganadero</i>	40
Tabla 2	<i>Tabla tetracórica en estudio de caso y control</i>	48
Tabla 3	<i>Número de terneras muestreadas por hacienda</i>	50
Tabla 4	<i>Número de terneras muestreadas por edad.....</i>	51
Tabla 5	<i>Número de terneras muestreadas por tipo de raza.....</i>	52
Tabla 6	<i>Análisis a la detección de antígenos del virus de la diarrea viral bovina (vDVB) en terneras.....</i>	53
Tabla 7	<i>Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina por hacienda.....</i>	54
Tabla 8	<i>Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina por edad.....</i>	55
Tabla 9	<i>Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina por raza.....</i>	56
Tabla 10	<i>Factores de riesgo asociados con la infección persistente del virus de la diarrea viral bovina en las terneras.....</i>	59
Tabla 11	<i>Factores de riesgo asociados a los animales persistentemente infectados con el virus de la diarrea viral bovina a nivel de hato.....</i>	60

Índice de figuras

Figura 1	<i>Ternero PI principal fuente de infección en el rebaño.....</i>	<i>29</i>
Figura 2	<i>Ubicación geográfica de la parroquia Alóag, cantón Mejía, provincia de Pichincha– Ecuador.</i>	<i>35</i>
Figura 3	<i>Ubicación geográfica de la parroquia Uyumbicho, cantón Mejía, provincia de Pichincha – Ecuador.</i>	<i>36</i>
Figura 4	<i>Ubicación geográfica del Centro de Investigación y Diagnóstico Veterinario TIER – ZENTRUM, parroquia San Pedro de Taboada, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha – Ecuador.....</i>	<i>37</i>

Resumen

El virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) ha tenido gran importancia desde su aparición en el año 1946 hasta la actualidad ocasionando problemas productivos y reproductivos que conlleva a grandes pérdidas económicas en la ganadería bovina. La manifestación subclínica de este virus es muy perjudicial en el hato bovino por su difícil detección, por lo que, en los laboratorios se utilizan pruebas serológicas y moleculares para identificar al agente viral y eliminar a los animales Persistentemente Infectados (PI), bovinos que son la principal fuente de infección y constituyen el principal reservorio del virus en la naturaleza. La presente investigación tuvo como objetivo determinar la presencia de terneras PI infectadas con el vDVB en tres hatos de producción lechera, ubicados en el cantón Mejía, de la provincia de Pichincha. Se recolectaron 85 muestras sanguíneas de terneras de 0 hasta 120 días de edad, no inmunizadas activamente con vacunas comerciales. Se analizaron los sueros por medio del Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA) tipo Sándwich de captura del vDVB. Se obtuvo una prevalencia del 0% de circulación viral tanto por finca como por raza y edad. No se encontraron factores de riesgo asociados al vDVB en los tres predios de producción lechera. Los resultados obtenidos se pueden relacionar con el programa sanitario establecido para control de vDVB y las normas de bioseguridad que evitan el ingreso de animales que podrían ser portadores de enfermedades infectocontagiosas.

Palabras clave: terneras, persistentemente infectado (PI), virus de la diarrea viral bovina (vDVB), prevalencia, ELISA de captura de antígenos.

Abstract

The Bovine Viral Diarrhea virus (vDVB) has had great importance since its appearance in 1946 until today, causing productive and reproductive problems that lead to great economic losses in cattle ranching. The subclinical manifestation of this virus is very harmful in bovine herd because of its difficult detection, so serological and molecular tests were used in laboratories to identify the viral agent and eliminate persistently infected animals (PI's). Cattle that are the main source of infection and constitute the main reservoir of the virus in nature. The aim of this investigation was to determine the presence of PI calves infected with vDVB in three dairy herds, located in the Mejia canton of Pichincha province. 85 blood samples were collected from calves aged 0 to 120 days, not actively immunized with commercial vaccines. Serums were analyzed through the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) type vDVB trapping sandwich. A prevalence of 0% of viral circulation was obtained both by farm and by race and age. No risk factors associated with vDVB were found in the three dairy farms. The results obtained can be related to the health program established for the control of vDVB and the biosecurity standards that prevent the entry of animals that could be carriers of infectious diseases.

Keywords: calves, persistently infected (PI), bovine viral diarrhea virus (BVDv), prevalence, antigen capture ELISA test.

Capítulo I

Introducción

Antecedentes

A mediados del año 1946, en Canadá, apareció por primera vez la “enfermedad X”, denominada de esta manera por ser de origen desconocido en el medio ganadero. Esta enfermedad afectaba comúnmente al ganado bovino joven con presencia de lesiones en las mucosas (Childs, 1946). En el mismo año, un problema similar se registró en EE. UU, en la ciudad de New York, en vaconas de entre 8 a 14 meses de edad. La enfermedad se manifestó con síntomas de fiebre y abundante diarrea, y por sus características clínicas se la denominó como diarrea viral bovina (Olafson et al, 1946). Esta enfermedad de origen viral afecta a todas las razas y edades del ganado bovino, así como también a otros rumiantes y animales domésticos (Yarnall & Thrusfield, 2017).

El vDVB tiene distribución mundial con gran incidencia en la ganadería bovina por tal motivo, estudios realizados en varios países han determinado datos de prevalencia de aproximadamente un 0,5% a 2% de animales persistentemente infectados (PI) con vDVB y del 60% al 85% de bovinos que presentan anticuerpos contra vDVB (Houe, 1999).

En el Ecuador, se realizó un estudio en la zona de Vilcabamba, utilizando una prueba Inmunoensayo Ligado a Enzimas “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) de tipo indirecto para detección de anticuerpos, obteniendo porcentajes de seropositividad en un rango de 24,7% a 87,8% (Labanda, 2015). La ausencia del diagnóstico y detección temprana de animales PI ha impedido que exista un control efectivo en ganaderías bovinas para una adecuada eliminación de este tipo de bovinos.

Para el diagnóstico del vDVB, existen técnicas moleculares que permiten tipificar el virus. Las pruebas de diagnóstico pueden ser de tipo moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT – PCR) o por métodos serológicos indirectos o directos como es la prueba ELISA. La prueba diagnóstica ELISA de captura de antígeno, es la que mayormente se utiliza, por ser una prueba rápida y económica para la detección de animales PI (OIE, 2018).

Los bovinos PI se generan cuando la vaca es infectada con un biotipo no citopático (NCP) del vDVB en el tercer mes de gestación, donde la inmunidad en el feto es muy susceptible a la infección viral (Chase, 2013; Grooms, 2004). En esta etapa, el feto bovino no responde inmunológicamente con la generación de anticuerpos contra el vDVB.

La falta de respuesta inmune en el feto bovino infectado, se debe a que su sistema inmune identifica a las proteínas virales como propias de su organismo, por consiguiente, al nacimiento estos bovinos denominados PI son los principales diseminadores de virus en todo el hato bovino susceptible (Houe, 1999).

Los animales PI forman el principal reservorio del virus en la naturaleza y son los que infectan a todo el ganado bovino. Por esta razón, es importante detectarlos en sus primeros meses de vida para lograr tener un control efectivo de la infección (OIE, 2018).

Justificación

La Diarrea Viral Bovina es una enfermedad viral infectocontagiosa que ocasiona problemas en el sistema reproductivo en los predios de producción láctea y cárnica lo cual retrasa el mejoramiento genético, baja la productividad e incrementa los gastos en la sanidad animal (Baker, 1990).

En el Ecuador, la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario (AGROCALIDAD) manifiesta que el vDVB es de notificación obligatoria; sin embargo, no

existe un control oficial estructurado o un lineamiento técnico que facilite un adecuado sistema de prevención ante la mencionada enfermedad viral (AGROCALIDAD, 2020).

La presente investigación se enfocó en diagnosticar la presencia de terneras PI infectadas con el vDVB no mayores de 120 días de edad que no han sido inmunizadas con vacunas vivas atenuadas o muertas o inactivadas, provenientes de tres hatos de producción lechera ubicados en el cantón Mejía de la provincia de Pichincha – Ecuador.

El propósito de esta investigación, fue además incentivar a los productores a establecer programas de diagnóstico, control y eliminación temprana de terneras PI y contribuir en la mejora sanitaria del sector ganadero del país.

Objetivos

Objetivo General

Determinar la presencia de terneras persistentemente infectadas (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (vDVB) en tres hatos de producción lechera del cantón Mejía – Ecuador.

Objetivos Específicos

Determinar la prevalencia del vDVB y su distribución en función de variables independientes (raza y edad), mediante la prueba serológica ELISA Sándwich para captura de antígeno (ID Screen® BVD P80 Antigen Capture).

Identificar los posibles factores de riesgo asociados a esta enfermedad viral por medio de la aplicación de una encuesta epidemiológica dirigida a los propietarios del predio.

Dar a conocer los resultados y recomendaciones para el control del vDVB a productores de los tres hatos lecheros muestreados del cantón Mejía – Ecuador.

Hipótesis

Hipótesis nula

No se demuestra la presencia de terneras persistentemente infectadas (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (vDVB), en los tres hatos lecheros muestreados utilizando un ELISA Sándwich.

Hipótesis alternativa

Se demuestra la presencia de terneras persistentemente infectadas (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (vDVB), en los tres hatos lecheros muestreados utilizando un ELISA Sándwich.

Capítulo II

Revisión de la Literatura

Ganadería en el Ecuador

Según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) y Estadísticas Agropecuarias (ESPAC), en el año 2017 en el Sector Pecuario del Ecuador se llegó a estimar un total de 4'190.611 de cabezas de ganado bovino, destacándose la región Sierra con un 48,87% superior a las demás regiones del país (ESPAC, 2017). Adicionalmente la provincia de Pichincha, obtuvo la mayor producción láctea con aproximadamente 835.663 litros en el año 2017.

En el área de producción bovina, en los últimos años, se han introducido programas de manejo sanitario y métodos de diagnóstico que facilitan el diagnóstico, detección y la prevención de enfermedades infectocontagiosas que afectan la salud de los bovinos. Estos programas sanitarios se reflejan por un crecimiento del 9% en producto interno bruto (PIB) (ESPAC, 2017) en la ganadería bovina, sea ésta de producción de carne, leche o doble propósito.

Ganadería en el cantón Mejía, provincia de Pichincha

El III Censo Agropecuaria realizado en el cantón Mejía, arrojó datos considerables sobre la tenencia de tierras de 79.901 hectáreas, de los cuales un 40,72% son utilizados para cultivos de pastos lo que permite confirmar un aprovechamiento promedio para la explotación ganadera (MAG, 2014).

Según datos obtenidos del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) en el año 2012, el cantón Mejía cuenta con alrededor de 55.600 cabezas de ganado vacuno y con una producción de leche mensual promedio de 654.750 litros siendo el cantón

Mejía, uno de los principales cantones de gran producción lechera de la sierra ecuatoriana.

Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina en Ecuador

El vDVB ha tenido gran trascendencia en los últimos años por ser una enfermedad poco conocida en la ganadería bovina del Ecuador. En el país, en diferentes provincias con la finalidad de dar a conocer la seroprevalencia del vDVB, se han realizado estudios serológicos direccionados a la detección de anticuerpos contra el vDVB.

Un estudio realizado por González (2016), determinó una prevalencia de 27,92% a anticuerpos mediante la utilización de un ELISA indirecto en vacas lecheras de 2 a 8 años de edad ubicadas en el cantón Saraguro de la provincia de Loja.

En el trabajo realizado por Saa et al. (2011), se obtuvo una seroprevalencia del 36,2% (857/2367), utilizando un kit comercial de ELISA competitivo para detección de anticuerpos, provenientes de 346 hatos ganaderos distribuidos en 7 provincias del Ecuador (Pichincha, Azuay, Manabí, Chimborazo, Tungurahua, Cotopaxi, Santo Domingo).

Mientras que, una prevalencia del 42,31% se obtuvo mediante la utilización de un ELISA competitivo para la detección de anticuerpos contra el vDVB en 4 parroquias del cantón El Pangui de la provincia de Zamora Chinchipe (Aguirre, 2021).

Factores de riesgo en la sanidad animal

La probabilidad de padecer o desarrollar un fenómeno ajeno al organismo o de presentar características indeseables en un animal o grupo de animales se conoce como factor de riesgo. Este puede ser de tipo biológico, ambiental, económico y socio cultural (Pita et al, 2002).

En sanidad animal, se toma en cuenta tres factores asociados a cualquier enfermedad infectocontagiosa:

- Factor animal (hospedero), que puede variar su afectación por edad, raza, sistema inmune, estado productivo.
- Factor patógeno, por propagación (patogenia).
- Factor ambiental, el más perjudicial porque ayuda en la difusión del patógeno y causa graves trastornos en el hospedero (Pita et al, 2002).

El principal factor de riesgo es la ausencia de detección de hembras gestantes infectadas con vDVB que puedan generar terneros PI, la introducción al predio de animales externos sin registro sanitario (Mainar-Jaime et al, 2001).

Algunas formas de transmisión tales como aplicación inadecuada de vacunas, semen contaminado, transferencia de embriones contaminados con el vDVB y la más común, la interacción de bovinos sanos con bovinos enfermos son precursoras de causar infecciones agudas en su gran mayoría (Houe, 1995).

Otro factor a considerar en la transmisión e infección del vDVB, es la densidad de la población bovina principalmente en sistemas de confinamiento, densidad de vacas en el establo o salas de ordeño, ferias ganaderas, presencia de otros rumiantes infectados, fincas ganaderas aledañas y abortos o problemas reproductivos; por esta razón, una encuesta epidemiológica es de mucha ayuda para el procesamiento de la información que generen datos a fin de evitar el apareamiento de la enfermedad en el hato ganadero (Pita et al, 2002).

Virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB)

El vDVB pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*, es una enfermedad infectocontagiosa de sintomatología variable (SAG, 2018) denominada Diarrea Viral Bovina (DVB). La DVB está involucrada no solo en el ámbito productivo y

reproductivo sino también afecta el sistema respiratorio provocando grandes pérdidas económicas en el hato ganadero (Houe, 1999).

Biotipos

El vDVB se clasifica en dos biotipos: Citopático (CP) y No Citopático (NCP) (Meyers & Thiel, 1996). Del 70 al 90% de los virus aislados pertenecen al biotipo NCP, que es el que predomina en el hato bovino (Saliki & Dubovi, 2004).

La sintomatología de los virus no citopáticos (NCP) son poco visibles en el hato ganadero llegando a presentarse como una enfermedad subclínica (Deregt & Loewen, 1995).

En forma clínica, provoca infecciones en hembras gestantes causando abortos o en algunos casos una infección fetal. Este biotipo NCP, tiene la facilidad de atravesar la membrana placentaria generando en el feto una infección persistente. En algunas ocasiones en hembras gestantes se produce muerte embrionaria, muerte del animal al nacimiento y en algunos casos el feto llega a desarrollarse con una infección persistente convirtiéndose en un transmisor del virus altamente perjudicial para el rebaño (OIE, 2018).

El mecanismo por el cual se generan los terneros PI, se debe a que el feto reconoce a las proteínas virales como propias (Bolin & Grooms, 2004; OIE, 2018).

En cultivos celulares susceptibles, el vDVB del biotipo CP produce vacuolización citoplasmática y muerte celular extensiva (Bolin et al, 1985). La combinación del virus NCP con el virus CP causa la enfermedad denominada Enfermedad de las Mucosas (EM). Esta enfermedad es predominante en bovinos que padecen una infección persistente (Bolin & Ridpath, 1992).

Genotipos

El vDVB, según su comportamiento en cultivo celular, se encuentra clasificado en dos genotipos (1 y 2) (Gillespie et al, 1960).

Dentro de estos dos genotipos, se han localizado 15 subgenotipos diferentes para vDVB tipo 1 y 4 subgenotipos para vDVB tipo 2 (Nagai et al, 2007).

El vDVB tipo 1, asociado con el biotipo NCP, se presenta en bovinos con una sintomatología mayormente visible en vacas gestantes. Esta sintomatología provoca en pocas ocasiones abortos, o a su vez heredando la enfermedad a la cría y procreando un animal persistentemente infectado (PI) (Baule et al, 2001). El vDVB tipo 2 presenta en el bovino, un cuadro clínico grave con hemorragias agudas, respiración difícil, diarreas hemorrágicas y degeneración sistémica lo que provoca la muerte del animal (Bolin & Ridpath, 1992).

En la actualidad, se han realizado estudios donde evidencian un vDVB tipo 3 también conocido como “HoBi-like” o Pestivirus atípico (Larska et al, 2012; Liu et al, 2009; Schirrmeier et al, 2004), el cual fue detectado por primera vez en el año 2004 en Brasil. Este virus fue aislado proveniente de suero bovino fetal utilizado como medio de enriquecimiento en cultivo celular (Bauermann et al, 2013).

Existen varios reportes en países de Europa entre ellos Italia donde se informó la sintomatología que provocó el vDVB tipo 3 en terneros de entre 6 a 8 meses de edad. La sintomatología descrita es la presencia de temperatura corporal que oscila entre los 39,4°C a 40,1°C, además de problemas respiratorios (Bauermann et al, 2013).

La diferenciación de un genotipo con otro, está bien marcado en su genoma. La diferenciación se establece de acuerdo a un análisis en la glicoproteína E2, en la región 5' UTR y la proteína no estructural NS3, estructuras seleccionadas para análisis específicos mediante la RT-PCR para su tipificación (Timurkan & Aydin, 2019).

Fuentes de infección

La principal fuente de infección entre bovinos son los terneros PI. Estos constituyen el principal reservorio de propagación del vDVB en el ganado vacuno (Brock et al, 1991). Los animales PI arrojan grandes cantidades de virus mediante exudados corporales como son la orina, heces fecales, contenido y exudado nasal, semen en machos y leche en hembras en producción (Houe, 1995).

Un animal que haya padecido una infección aguda también es otra fuente de propagación del vDVB. Estos animales excretan grandes cantidades del virus a través de exudados nasales y oculares durante un periodo de 4 a 10 días donde puede contagiar a más de un animal en el hato (Brownlie et al, 1987).

Una fuente importante de infección causada por el vDVB en bovinos es la presencia de cabras u ovejas que conviven en un mismo predio. Los ovinos y caprinos pueden estar infectados del Virus de la Frontera. Este importante virus también pertenece al género *Pestivirus* y puede contagiar al ganado vacuno (French et al, 1974) (Houe, 1995).

Modos de transmisión

El vDVB presenta dos tipos de transmisión, una de forma vertical y otra de forma horizontal (Houe, 1995).

Transmisión vertical

La transmisión vertical se produce en hembras gestantes entre los primeros 40 a 120 días de gestación y es causado generalmente por el biotipo NCP. Este biotipo atraviesa la placenta y da lugar a una infección fetal lo que ocasiona que se genere una cría PI (Houe, 1999).

Si bien esta cría puede morir en los primeros meses de vida, también es posible que pueda llegar a una etapa adulta y reproducirse. Los bovinos que llegan a

reproducirse son la razón de generar varias líneas familiares o varias generaciones afectadas (Houe & Meyling, 1991).

Transmisión horizontal

La transmisión horizontal se produce de forma directa o indirecta (Fredriksen et al, 1999). La forma directa es la más rápida de contagio. Se produce cuando existe un animal PI en el rebaño, el cual propaga el virus a animales sanos, generalmente cuando existe hacinamiento de los animales en los corrales (Houe, 1995).

Por otra parte, en la forma de transmisión indirecta, existen varios modos de contagio. El contagio proviene de animales con infecciones persistentes que a su vez infectan a otros bovinos mediante la ingesta de alimento contaminado, por la ingestión de restos de fetos abortados y restos placentarios, como también por la ingesta de secreciones como son la orina y heces depositadas en los pastizales (Gasque, 2008).

Patogénesis

Según Baker (1995) y Vanroose et al (1998), mencionan que las células epiteliales y las del tracto digestivo son las que soportan la descarga viral lo cual trae como consecuencia que el animal presente varios trastornos clínicos dependiendo de la cepa actuante o el biotipo de virus.

El vDVB ocasiona infecciones agudas (frecuentemente en animales de corta edad), (Baker, 1995; OIE, 2018). En hembras adultas ocasiona infecciones intrauterinas (hembras reproductoras), infecciones persistentes (animales PI), enfermedad de las mucosas y en machos contaminación del semen y de embriones (OIE, 2018).

Signos clínicos

El vDVB presenta varias sintomatologías clínicas que dependiendo de la cepa actuante en el bovino en la mayoría causan problemas productivos y reproductivos (OIE, 2018).

El vDVB atraviesa el saco embrional transfiriendo el virus de la madre al feto. Esta transferencia viral, causa en algunas ocasiones muerte intrauterina y abortos espontáneos. En ocasiones, de acuerdo a Houe (1999), los animales nacen persistentemente infectados (PI) y frecuentemente pasan desapercibidos en el rebaño.

Estos animales no presentan manifestaciones clínicas que indiquen ser portadores de la enfermedad. La ausencia de manifestaciones clínicas y su alta capacidad infectiva al ganado vacuno, ocasiona en el rebaño un riesgo sanitario que puede generar grandes pérdidas económicas productivas y reproductivas.

Infección aguda

Las infecciones agudas son más frecuentes en bovinos de corta edad, entre los 6 a 15 meses. Los síntomas clínicos que se observan son problemas respiratorios, diarreas y en raras ocasiones la muerte repentina (OIE, 2018). Sin embargo, en algunas ocasiones, la sintomatología puede ser subclínica con una viremia transitoria que inicia alrededor del día 3 después de la infección con vDVB, hasta desarrollar inmunidad que la obtienen alrededor de la segunda a tercera semana post infección (Lanyon et al, 2014).

En la infección aguda, el vDVB ataca a los linfocitos T y B. Este tipo de infección causa inmunosupresión ocasionando debilitamiento del animal y haciéndolo susceptible a otras enfermedades (Bolin et al, 1985; Chase, 2013; Lanyon et al, 2014).

Según Khodakaram-Tafti & Farjanikish (2017), el vDVB tipo 2 causa gran afectación clínica. La infección aguda está asociada con leucopenia, trombocitopenia, alteraciones en la función plaquetaria, pirexia y diarreas.

Infección persistente

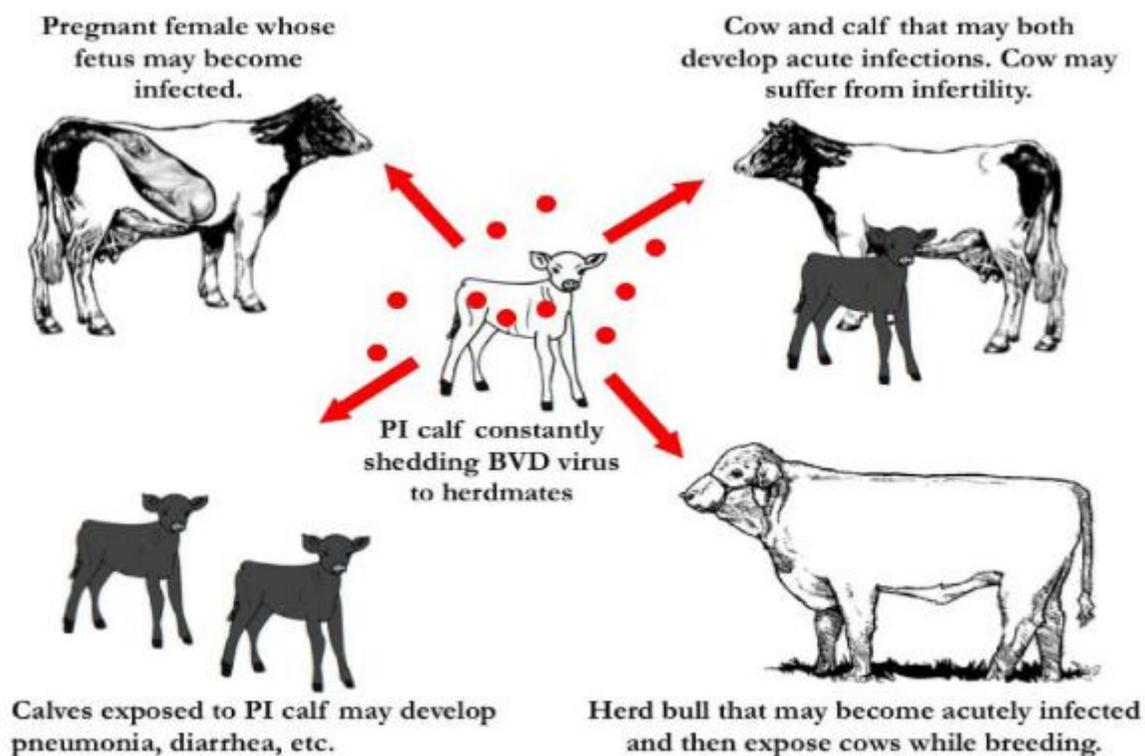
La infección persistente se produce cuando el animal ha sido infectado por el biotipo NCP del vDVB. Este tipo de infección, generalmente ocurre en el primer trimestre de gestación, donde el feto empieza a desarrollar su sistema inmunológico y este reconoce al vDVB como propio y perdurará por el resto de su vida en su organismo (Brock, 2003; Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017).

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). Como se observa en la Figura 1, los terneros PI son el gran problema de infección dentro del ganado vacuno.

La carga viral en estos animales es alta y excretan el virus a lo largo de su vida a través de orina, heces, mucosidad, semen y leche. Esta característica de la infección motiva a que se detecte a estos bovinos lo más rápido posible y se proceda a eliminar del rebaño a estos animales denominados terneros PI (Brownlie et al, 1987; Fray et al, 2000).

Figura 1

Ternero PI principal fuente de infección en el rebaño



Nota. Adaptado de Persistent bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle herds, (p. 157), por Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017, Iranian Journal of Veterinary Research.

La probabilidad de obtener animales PI sin tener un apropiado control del vDVB dentro de un hato ganadero es alrededor de un 30% (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017; Peterhans et al, 2003)

Otro factor que incide en la alta prevalencia de animales PI es la monta directa con toros infectados o la inseminación artificial (I.A.) con semen de toros de dudosa procedencia como también con semen de centros de I.A. que no posean certificación de centro genético libre del vDVB (Voges et al, 1998).

Infección en hembras gestantes

La infección en hembras gestantes depende del tiempo de gestación en el cual se infectó con vDVB (OIE, 2018). Son varias las causas y problemas más frecuentes en tiempos específicos de preñez:

- Una infección temprana de alrededor de los primeros 25 días de gestación, puede causar una muerte embrionaria induciendo al aborto el cual puede retrasarse por varias semanas (McGowan & Kirkland, 1995; OIE, 2018).
- La infección entre los 45 a 90 días de gestación, el feto se convertirá en un animal persistentemente infectado (PI), etapa donde el feto adquiere competencia inmunológica no detectable al momento del nacimiento, llegando a ser normales y peligrosos para el rebaño (Ridpath et al, 1994).
- Una infección posterior entre los 150 y 175 días de gestación, puede ocasionar malformaciones en nacimiento como hipoplasia pulmonar, defectos oculares, desgaste óseo, retrasos en el crecimiento que conducen a animales susceptibles a otras enfermedades infectocontagiosas (Moennig & Liess, Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus., 1995).
- Una infección en el último tercio de la gestación (200 días en adelante), los casos de abortos son mínimos y los terneros que llegan a término pueden ser normales seropositivos e inmunocompetentes (Moennig & Liess, 1995; OIE, 2018)

Infección en terneros recién nacidos

Los terneros que nacen con el virus de la diarrea viral (vDVB) son aquellos que fueron infectados en los primeros 3 meses de gestación, los cuales pueden nacer con defectos congénitos destruyendo las células madres adquiridas y haciéndolos vulnerables a otras enfermedades (Baker, 1990).

El complejo diarreico neonatal ocasiona infecciones enteropatógenas debido al efecto inmunodepresivo del virus de la diarrea viral bovina (vDVB) manifestándose en infecciones crónicas (De Verdier, 2000; Lértora, 2003).

Enfermedades de las mucosas

La enfermedad de las mucosas está mayormente presente en crías procedentes de madres infectadas de manera temprana por el virus de la diarrea viral bovina (vDVB), durante la etapa de gestación de entre 90 a 120 días (OIE, 2018). Estos animales presentan en su mayoría, anorexia, úlceras alrededor de la cavidad bucal y nasal además presentan diarreas profusas provocando su muerte en algunos casos. Estos animales son un gran propagador de la enfermedad a todo el rebaño (Brownlie, 1985).

La aparición de la enfermedad de las mucosas en bovinos, ocurre debido a la unión de los biotipos CP y biotipo NCP principalmente. Este suceso ocurre en animales PI que son los que portan el biotipo NCP en su organismo (Edwards, 1990).

Una súper infección con el vDVB, generalmente ocurre con vacunas a virus vivo modificado (VVM) cuando se realiza la vacunación a animales PI. Por este motivo, antes de la inmunización a todo el hato con VVM, se debe realizar pruebas de detección del antígeno del vDVB (Ridpath, 2013).

Diagnóstico del vDVB

Existen varios sistemas de diagnóstico dirigidos a determinar antígenos (Ag) y anticuerpos (Ac). Estos sistemas de diagnóstico se basan en detectar bovinos persistentemente infectados (PI), los cuales son el principal reservorio de propagación del virus en la naturaleza. Existen también sistemas de diagnóstico utilizados para determinar seroprevalencia de Ac contra el vDVB (Saliki & Dubovi, 2004).

Pruebas para el diagnóstico del virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB)

El diagnóstico de vDVB se basa en aislar el virus o detectar el antígeno específico por medio de diversas técnicas como aislamiento viral, inmunohistoquímica, RT – PCR y ELISA de captura de antígenos (SAG, 2018).

Aislamiento viral

Considera la prueba de oro estándar, la cual utiliza principalmente para su diagnóstico tres cultivos celulares provenientes 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).

Sin embargo, esta prueba demanda de hasta de tres semanas para aislar la mayor carga viral posible (Pecora & Pérez, 2017). Esta prueba es demorada puesto que, antes de aislar el vDVB, es necesario realizar otras pruebas para determinar una posible interferencia de anticuerpos neutralizantes (Sandvik, 1999).

Inmunohistoquímica

El vDVB infecta a varios órganos y tejidos del animal. Se ha obtenido éxito para detectar el vDVB mediante biopsias de los ganglios linfáticos, encéfalo, abomaso y placenta. Si se trata de animales vivos, se realizan biopsias de la piel de preferencia del pabellón auricular (muestras en las orejas), las cuales son útiles para la detección de animales persistentemente infectados (PI) (OIE, 2018). En estos casos, la prueba de inmunohistoquímica (IHC) es la mejor opción para la detección del antígeno, (Brodersen et al, 1998).

Detección del ácido nucleico (RT-PCR)

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), amplifica un fragmento del ARN en este caso de vDVB. La amplificación ocurre específicamente en la región 5' en el gen NS3 el cual otorga mayor susceptibilidad para el diagnóstico (Ridpath et al, 1994; Saliki & Dubovi, 2004).

Esta prueba requiere alrededor de 2 a 3 días para obtener resultados favorables (Pecora & Pérez, 2017) y es mayormente utilizada para conocer el tipo, genotipo y subgenotipos de vDVB que predominan en el ganado vacuno (Sandvik, 1999).

ELISA de detección de antígenos

El ensayo de inmunoadsorción ligado a una enzima de captura de antígenos (ELISA Ag) tiene 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 et al, 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-Tafti & Farjanikish, 2017).

El procedimiento del ELISA Ag, se basa en el uso paralelo de anticuerpos monoclonales (Mabs) y anticuerpos policlonales. Este sistema de diagnóstico, contiene en sus pocillos anticuerpos policlonales con capacidad de detectar varias cepas de vDVB. Este reconocimiento ocurre por contener en sus clones varios epítomos de reconocimiento. Con este tipo de prueba se obtiene una sensibilidad y especificidad alta del 97,9% y 99,7% respectivamente (Graham et al, 1998; Lértora, 2003).

Los ELISA basados en Mabs, son los más comunes y utilizados para detectar anticuerpos contra la proteína P80 del genoma del virus de vDVB (Lértora, 2003).

Los kits comerciales basados en Mabs detectan generalmente la proteína p80 o NS2-3, en sangre total y la proteína ERNs, en plasma o suero sanguíneo (OIE, 2018).

Por otro lado, 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).

Control y prevención

En varios países como Bélgica, Estados Unidos, Suiza, Dinamarca, gracias a los avances de métodos de detección del vDVB, se han logrado crear programas de detección y erradicación de animales PI (Houe, 1995; Lanyon et al, 2014).

Las estrategias de impedir que los rebaños bovinos se infecten de manera masiva, se basan en normas de bioseguridad e implementación de programas de vacunación a animales susceptibles (Pecora & Pérez, 2017).

La implementación de medidas de bioseguridad se basa en realizar pruebas de diagnóstico a animales procedentes de otras fincas para identificar a los animales PI y evitar la propagación del virus en el hato. Separar siempre los animales enfermos de los sanos y en programas de I.A. verificar la procedencia del semen con su respectiva certificación de que se encuentre libre de vDVB (Bitsch & Rønsholt, 1995; Moennig & Becher, 2018).

Capítulo III

Metodología

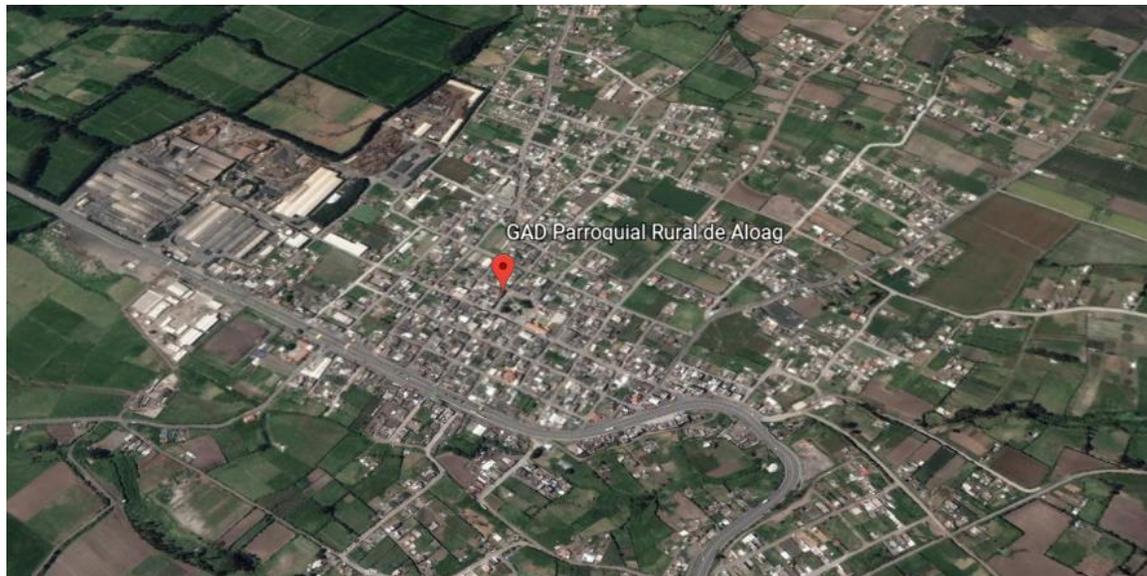
Trabajo de campo

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en la parroquia Alóag y Uyumbicho pertenecientes al cantón Mejía, de la provincia de Pichincha – Ecuador (Figuras 2 y 3).

Figura 2

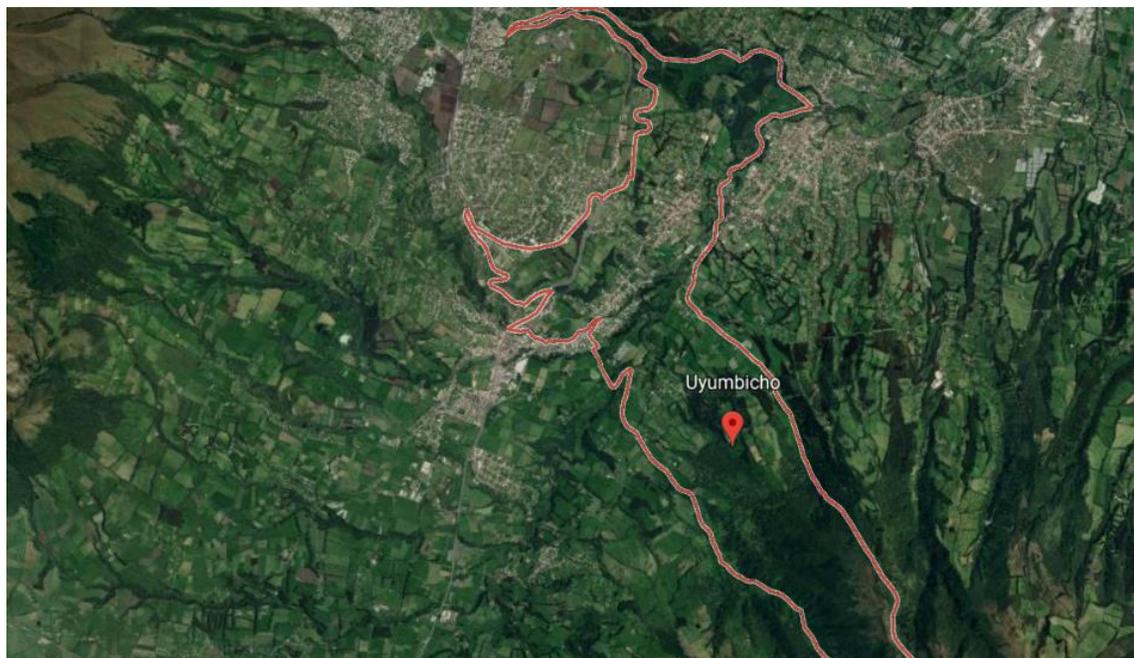
Ubicación geográfica de la parroquia Alóag, cantón Mejía, provincia de Pichincha– Ecuador.



Nota. La figura representa la zona de estudio de toma de muestras sanguíneas. Tomado de Google Earth (2021).

Figura 3

Ubicación geográfica de la parroquia Uyumbicho, cantón Mejía, provincia de Pichincha – Ecuador.



Nota. La figura representa la zona de estudio de toma de muestras sanguíneas. Tomado de Google Earth (2021).

La fase de trabajo de laboratorio, se realizó en el Centro de Investigación y Diagnóstico Veterinario TIER – ZENTRUM, ubicado en el cantón Rumiñahui, parroquia San Pedro de Taboada (Figura 4).

Figura 4

Ubicación geográfica del Centro de Investigación y Diagnóstico Veterinario TIER – ZENTRUM, parroquia San Pedro de Taboada, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha – Ecuador.



Nota. La figura representa la zona de fase de laboratorio para el procesamiento de muestras sanguíneas de las terneras. Tomado de Google Earth (2021).

Ubicación geográfica

Las coordenadas geográficas del lugar o zona de estudio donde se realizó el trabajo de campo son:

Alóag

- **Longitud:** 78° 30´ W
- **Latitud:** 0° 29´ S
- **Altitud:** 2800 m.s.n.m.

Uyumbicho

- **Longitud:** 78° 31´ 0´´ W
- **Latitud:** 0° 22´ 60´´ S

- **Altitud:** 2622 m.s.n.m.

Las coordenadas geográficas donde se realizó el trabajo de laboratorio son:

- **Longitud:** 78° 27' 23,52'' W
- **Latitud:** 0° 19' 28,88'' S
- **Altitud:** 2501 m.s.n.m.

Determinación del tamaño de la muestra

La parroquia Alóag, como la parroquia Uyumbicho cuentan con aproximadamente 8000 cabezas de ganado vacuno, de las cuales, 970 animales se distribuyen en los tres predios a muestrear.

La población muestral definida en las terneras con edad comprendida entre los 0 hasta los 120 días de edad fue un total de 110 terneras entre los tres predios determinados.

Para el cálculo del tamaño de la muestra, se utilizó la siguiente fórmula estadística (Thrusfield, 2005):

$$n = \frac{Z^2 \times p \times (1 - p)}{d^2}$$

Dónde:

n = Cantidad de muestras

Z = Valor del intervalo de confianza

p = Frecuencia esperada del factor a estudiar

d = Precisión absoluta del estudio

A su vez, se corrigió el tamaño de la muestra, en función del número de animales existente:

$$n_0 = \frac{N \times n}{N + n}$$

Dónde:

N = Número de terneras existentes en los tres hatos ganaderos

n = Número de muestras (dato de la fórmula anterior)

n_0 = Número total de muestras corregida

Reemplazando los valores en las fórmulas se obtienen los siguientes resultados:

Z = 1,96 (95%)

p = 0,5 (porcentaje de prevalencia del virus de la diarrea viral bovina esperado en la zona de estudio)

d = 0,05 (precisión absoluta del estudio del 95%)

$$n = \frac{(1,96)^2 \times 0,5 \times (1 - 0,5)}{(0,05)^2}$$

$$n = 384,16$$

$$n_0 = \frac{110 \times 384,16}{110 + 384,16}$$

$$n_0 = 85,5 \text{ animales}$$

Por consiguiente, el tamaño de la muestra a considerar fue de 85 animales en los tres hatos de producción lechera. El proceso de toma de muestras sanguíneas fue al azar, tomando en cuenta la edad de los animales, determinando de cada hacienda la cantidad de terneras sometidas a la recolección de sangre simplificando del total obtenido.

En la Tabla 1, se presenta el número de terneras a muestrear dentro de las tres haciendas ganaderas:

Tabla 1*Número de terneras muestreadas de cada hato ganadero*

N.º hacienda	N.º terneras	Peso finca	N.º de terneras muestreadas
1	35	31,8%	27
2	46	41,8%	36
3	29	26,4%	22
Total	110	100%	85

Nota. N°: número, %: porcentaje.

Aplicación de encuesta epidemiológica

Se realizó una encuesta epidemiológica en cada una de las haciendas. Esta encuesta tuvo como finalidad recolectar datos relevantes sobre la propiedad como son el funcionamiento de los sistemas de pastoreo, aspectos sanitarios, problemas reproductivos, procedencia de los animales, planes de vacunación, entre otros factores que perjudiquen la productividad del predio. Esta información sirvió para detectar los posibles factores de riesgo asociados al vDVB y el manejo general y sanitario del hato ganadero.

Recolección de información de terneras muestreadas (registros)

Por cada ternera en estudio, se tomó datos de fecha de nacimiento, número de arete, raza, edad y sexo. Estos datos fueron constatados con un registro de campo y un registro de laboratorio. En el laboratorio se anotó los resultados de densidad óptica (DO) y los porcentajes de positividad obtenidos mediante la prueba serológica ELISA de captura del antígeno vDVB.

Obtención de muestras sanguíneas

Materiales, equipos y reactivos

- Botas de caucho
- Overol
- Tablero para hojas
- Encuestas epidemiológicas
- Registros de campo
- Esfero
- Marcador permanente
- Toallas de papel
- Guantes desechables
- Alcohol antiséptico
- Agujas vacutainer calibre 21G
- Tubos vacutainer tapa roja (10 ml)
- Capuchón para tubos vacutainer
- Gradillas
- Mascarillas desechables
- Cooler
- Recipiente de desechos corto-punzantes

Procedimiento

Para la obtención de sangre de las terneras, se procedió de la siguiente manera:

- Se identificó las terneras a ser muestreadas.

- Se realizó la sujeción del animal y se procedió a extraer sangre de la vena coccígea utilizando un tubo vacutainer sin anticoagulante con aguja toma múltiple calibre 21G.
- Se tomó aproximadamente 5 ml de sangre, la muestra fue rotulada con los datos de identificación de la ternera previa a la obtención de la muestra.
- Todas las muestras obtenidas se las almacenó en un cooler refrigerado para transportarlas al laboratorio.

Trabajo de laboratorio

Obtención de suero sanguíneo

Materiales, equipos y reactivos

- Muestras sanguíneas
- Bata azul desechable
- Mascarilla
- Guantes desechables
- Tubos de reacción
- Caja criogénica
- Micropipeta monocanal BOECO® (100 – 1000 uL)
- Puntas azules desechables
- Centrífuga BIORIDGE®
- Marcador permanente
- Refrigeradora
- Recipiente de desechos corto-punzantes

Procedimiento

Una vez realizada la toma de muestras de sangre a las terneras, se procedió en el laboratorio a la extracción del suero sanguíneo de la siguiente manera:

- Las muestras sanguíneas tomadas en los tubos sin anticoagulante se las centrifugó por 5 minutos a 5000 rpm.
- A continuación, con ayuda de una micropipeta de rango de 100 a 1000 uL, se extrajo el suero con cuidado sin mezclar la parte sólida (glóbulos rojos) con la parte líquida (suero).
- Se colocó en tubos de reacción, previamente rotulados, y se procedió a su almacenamiento en la caja criogénica a una refrigeración de 4°C hasta su procesamiento.

ELISA Sándwich de captura de antígeno para DVB

Materiales, equipos y reactivos

- Sueros sanguíneos
- Mandil
- Bata azul desechable
- Puntas amarillas desechables
- Mascarilla
- Guantes desechables
- Kit comercial ELISA Sándwich ID Screen® BVD P80 Antigen Capture
- Micropipeta multicanal HTL® (10 – 100 uL)
- Micropipeta monocanal BOECO® (10 – 100 uL)
- Agua destilada
- Probeta 1000 ml
- Vaso de precipitación 50 ml

- Bandeja dispensadora ELISA
- Microplacas sensibilizadas
- Cinta adhesiva
- Conjugado concentrado (10X)
- Control positivo liofilizado
- Control negativo
- Diluyente 2
- Diluyente 12
- Solución de lavado concentrada (20X)
- Solución de revelación
- Solución de parada (0.5 M)
- Temporalizador
- Incubadora THERMO-SHAKER MB 100-2A
- Lector de microplacas BYONROY®

Procedimiento

Con la obtención del suero sanguíneo mediante la centrifugación de las muestras de sangre, se procedió al diagnóstico de los sueros de la siguiente manera según el procedimiento del kit comercial:

- Se colocó todos los reactivos a temperatura ambiente 21 °C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) antes de ser homogenizados.
- Se colocó 50 uL de Diluyente 2 en cada pocillo.
- A continuación, se colocó 20 uL de control negativo en los pocillos A1 y B1 y 20uL de control positivo en los pocillos C1 y D1.
- Luego, se colocó 50 uL de suero en cada uno de los pocillos restantes.

- Se cubrió la placa con cinta adhesiva, se agitó por 1 minuto a 500 rpm y se incubó por 60 min (± 6 min) a 37 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$).
- Transcurrido el tiempo, inmediatamente se vació y se lavó los pocillos 5 veces con 300 uL de la Solución de lavado.
- Se preparó el conjugado 1X diluyendo el Conjugado concentrado 10X al 1:10 en Diluyente 12.
- Se distribuyó 100 uL del Conjugado 1X a todos los pocillos.
- Se cubrió nuevamente la placa con cinta adhesiva y se incubó esta vez por 30 min (± 3 min) a 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).
- Se vació y se lavó los pocillos por 3 veces con aproximadamente 300 uL de Solución de lavado.
- Se distribuyó 100 uL de Solución de revelación a cada pocillo.
- Se cubrió la placa y se incubó durante 15 min (2 min) a 21 °C ($\pm 5^\circ\text{C}$).
- Luego, se agregó 100 uL de la Solución de parada a cada pocillo para detener la reacción.
- Se colocó la microplaca en el lector ELISA BYONROY® a 450 nm el cual determinó la densidad óptica.

Validación e interpretación de resultados

Para la validación de la prueba se debe tener en cuenta los siguientes criterios:

- El valor medio de la densidad óptica de los controles positivos (DOCP) es superior a 0.500:

$$DO_{CP} > 0.500$$

- El cociente entre la media de los controles positivos (DOCP) y la media de los controles negativos (DOCN) es superior a 3.3:

$$DO_{CP}/DO_{CN} > 3$$

Luego, para cada muestra se calculó el porcentaje S/P:

$$\% S/P = \frac{DO_{muestra} - DO_{CN}}{DO_{CP} - DO_{CN}} \times 100$$

Y se interpretó los resultados de la siguiente manera:

Positivo: $\% S/P \geq 35\%$

Negativo: $\% S/P < 35\%$

Determinación de la prevalencia de la enfermedad vírica (vDVB)

Se determinó la prevalencia del virus de la diarrea viral bovina con una fórmula general:

$$P = \frac{\text{Número de terneras muestreadas positivas}}{\text{Número total de terneras muestreadas}} \times 100$$

Para obtener resultados más precisos, de igual manera se determinó la prevalencia de la enfermedad vírica a cada variable en estudio mediante las siguientes fórmulas:

- **Prevalencia por hacienda**

$$Ph = \frac{\text{Número de terneras positivas por hacienda}}{\text{Número de terneras muestreadas por hacienda}} \times 100$$

- **Prevalencia por edad (hasta los 120 días)**

$$Pe = \frac{\text{Número de terneras positivas por edad}}{\text{Número de terneras muestreadas por edad}} \times 100$$

- **Prevalencia por raza**

$$Pr = \frac{\text{Número de terneras positivas por raza}}{\text{Número de terneras muestreadas por raza}} \times 100$$

Análisis de datos

La información que se obtuvo de las encuestas epidemiológicas, se analizó mediante estadística descriptiva, donde se calculó, coeficientes de variación, error estándar y media, considerando las variables propuestas.

Se utilizó la prueba Chi-Cuadrado (X^2) para determinar una probable asociación entre las variables del proyecto y la prevalencia del virus de la diarrea viral bovina (Zúñiga et al., 2006). Se calculó usando un nivel de confianza del 95% y se utilizó el software estadístico Infostat para la interpretación de los resultados.

Determinación de los factores de riesgo

Para la determinación de los factores de riesgo, se realizó un análisis univariado, estableciendo la asociación de cada variable propuesta en la investigación con los resultados que se obtuvieron mediante la prueba diagnóstica.

Se calculó los Odds Ratio que determinó la probabilidad de que suceda un evento dividido por la probabilidad de que no suceda (Cerdeira et al., 2013); es decir, es un estudio de caso y control, como se observa en la Tabla 2.

Se dio la relación de la prevalencia de los resultados entre los expuestos y no expuestos como vacunación (si y no); manejo de abortos (si y no); procedencia de los animales (externos y propios); edad (0 – 60 días y 60 – 120 días), entre otros tanto para la Unidad de Producción Agropecuaria (UPA) como para las terneras muestreadas; para lo cual se utilizó tablas de contingencia 2 x 2.

Tabla 2

Tabla tetracórica en estudio de caso y control

	Casos	Controles
Expuestos	A	B
No expuestos	C	D

Nota. Adaptado de Principales medidas en epidemiología, (p. 343), por Moreno-Altamirano et al, 2015, Salud Pública de México.

La relación entre los casos y controles frente a expuestos y no expuestos se lo calculó de la siguiente manera, para determinación de Odds Ratio:

- **Exposición de casos**

$$\frac{A}{C} = \frac{\text{casos expuestos}}{\text{casos no expuestos}}$$

- **Exposición de controles**

$$\frac{B}{D} = \frac{\text{controles expuestos}}{\text{controles no expuestos}}$$

Para la determinación de Odds Ratio (OR), se aplicó la siguiente fórmula:

$$OR = \frac{A/C}{B/D} = \frac{A \times D}{B \times C}$$

Para la interpretación del resultado si el Odds Ratio (OR) > 1 se determina que existe una interacción entre el factor de riesgo y la presencia de la enfermedad (Moreno-Altamirano et al, 2015).

Difusión de los resultados

Se realizó un informe con los resultados obtenidos por parte del laboratorio TIER – ZENTRUM, en el cual se informó y se dio a conocer la presencia o ausencia del virus de la diarrea viral bovina en los animales muestreados.

Se recomendó aspectos sanitarios y de vacunación al momento de otorgar los informes respectivos para prevenir en un futuro descensos en producción y carga animal.

Capítulo IV

Resultados y Discusión

En el presente trabajo de investigación, se analizó un total de 85 muestras sanguíneas de terneras de edades comprendidas de 0 a 120 días, distribuidas en 3 haciendas del cantón Mejía. De las haciendas, dos de ellas pertenecen a la parroquia Alóag y una pertenece a la parroquia Uyumbicho.

Estadística descriptiva de las muestras

Distribución de las terneras muestreadas por hacienda

A continuación, se detalla en la Tabla 3 el número de terneras muestreadas en las 3 haciendas del cantón Mejía, observándose en la hacienda HC2, el mayor número de animales muestreados con un 42,3% (36/85).

Tabla 3

Número de terneras muestreadas por hacienda

Haciendas	n	%
HC1	27	31,8
HC2	36	41,8
HC3	22	26,4
Total	85	100

Nota., n: número de terneras; %: porcentaje

Distribución de las terneras muestreadas por edad

En la Tabla 4, se observa el número de terneras muestreadas según su edad en días, obteniéndose edades de 1 a 17 días con el 24,7% (21/85), seguido de 18 a 34

días con un 18,8% (16/85) y tan solo el 10,6 % (9/85) correspondía a edades comprendidas entre los 103 hasta los 119 días.

El análisis estadístico obtenido fue de una media general de 48,2 días, con un error estándar de 35,6; un coeficiente de variación del 73,6% y con edades de 1 día como mínimo y un máximo de 116 días.

Tabla 4

Número de terneras muestreadas por edad

Edades (días)	n	%
1 - 17	21	24,7
18 - 34	16	18,8
35 - 51	12	14,1
52 - 68	10	11,8
69 - 85	10	11,8
86 – 102	7	8,2
103 – 119	9	10,6
Total	85	100

Nota. n: número de terneras; %: porcentaje

Distribución de las terneras muestreadas por raza

Como se puede observar en la Tabla 5, el número de terneras muestreadas pertenecientes a los puros corresponde la raza Holstein con un 55,3% (47/85), la raza Angus y la raza Milking Shorthorn con un 1,2% (1/85) respectivamente.

Por otra parte, la aparición de los mestizos se debe a los cruzamientos realizados en su gran mayoría en la hacienda HC2, donde hay animales con doble y

triple cruce con razas Ayrshire, Holstein, Jersey y Milking Shorthorn representadas con un 16,5% (14/85). La realización de cruzamientos es gracias a la inseminación artificial (I.A) para garantizar el mejoramiento genético en los bovinos.

Lamentablemente en la hacienda HC3 no se pudo obtener la información de razas manejadas en el predio identificándolas como N.I (no informa).

Tabla 5

Número de terneras muestreadas por tipo de raza

Tipo de raza	n	%
N.I	22	25,9
Puros	49	57,6
Mestizos	14	16,5
Total	85	100

Nota. NI: no informa; n: número de terneras; %: porcentaje

Prevalencia general de antígenos al virus de la diarrea viral bovina (vDVB)

Se analizaron un total de 85 muestras de suero sanguíneo de terneras provenientes de tres haciendas lecheras del cantón Mejía, utilizando la prueba de diagnóstico serológico ELISA Sándwich IDVet BVD p80 Ag, se determinó la prevalencia del virus de la diarrea viral bovina (vDVB) en un 0% (0/85) (Tabla 6).

Tabla 6

Análisis a la detección de antígenos del virus de la diarrea viral bovina (vDVB) en terneras

Resultado Ag	n	%
Positivo	0	0
Negativo	85	100
Total	85	100

Nota. Ag: antígeno, n: número de terneras, %: porcentaje.

Dado a que no se han realizado mayores investigaciones en el Ecuador sobre el agente viral de vDVB mediante la utilización de la técnica ELISA de captura de antígenos, no se ha podido detallar comparaciones asociadas a este tipo de estudio.

Sin embargo, estudios realizados por Carrillo (2019), determinaron una prevalencia del 0% de circulación del virus de la diarrea viral bovina en el cantón Santa Rosa de la provincia de El Oro, mediante la técnica molecular PCR; al igual que Martínez (2017), quién realizó un método de detección del virus de la diarrea viral bovina mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde determinó una prevalencia del 0% en dos haciendas lecheras del cantón Mejía.

En su mayoría, para la detección de la presencia del virus de la diarrea viral bovina en el Ecuador, se han realizado varios estudios que determinan la prevalencia de anticuerpos como González (2016), en la provincia de Loja, en el cantón Saraguro, determinó un 27,92% de prevalencia del virus por medio de un ELISA indirecto con muestras de leche y por otra parte Labanda (2015), utilizando la misma metodología, encontró una prevalencia 29% en el cantón Loja.

A nivel mundial, se han realizado varios muestreos en ganado vacuno del antígeno del virus de la diarrea viral bovina (vDVB) con la finalidad de detectar y

eliminar a los animales persistentemente infectados (PI), principalmente en países como Bélgica con 0,8%; Suiza con un 0,9%; Dinamarca con 1,4%; USA con 1,7% y Suecia con un 1,3% (Houe, 1999).

Houe (1999), menciona que la prevalencia aproximada de encontrar animales persistentemente infectados en un predio va desde los 0,5 a 2% y que si no son detectados de manera temprana puede llegar a contagiar a todo el hato hasta en un 90%.

Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina por hacienda

No se evidenció presencia de animales positivos al antígeno del virus de la diarrea viral bovina en las tres haciendas lecheras, por tal motivo, no existe relación entre la prevalencia del virus con la localización de las tres haciendas (Tabla 7).

Tabla 7

Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina por hacienda

Haciendas	n	(+)	%	95% I.C.
HC1	27	0	0	-
HC2	36	0	0	-
HC3	22	0	0	-
Total	85	0	0	

Nota. n: número de terneras; (+): positivo; %: porcentaje equivalente a la cantidad de positivos; 95% I.C.: intervalo de confianza al 95%.

Resultados similares se obtuvieron en el trabajo de investigación de Carrillo (2019), donde muestreó 100 animales dando resultados negativos en su totalidad a la presencia del virus de la diarrea viral bovina (vDVB) en tres fincas del cantón Santa

Rosa de la provincia de El Oro al igual que en la investigación realizada en la provincia de Pichincha por Martínez (2017), donde obtuvo 0% de prevalencia del virus de la diarrea viral bovina (vDVB) en dos hatos lecheros del cantón Mejía. Ambos estudios utilizaron la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Sin embargo, un estudio realizado por Reinhardt et al (2003) en 9 predios lecheros de Chile, mediante un ELISA de captura de antígeno del virus de la diarrea viral bovina (vDVB), obtuvo resultados un 0,3% (3/878) de animales con infección persistente. De igual manera, en otro estudio donde se utilizó la misma prueba diagnóstica, se obtuvo un animal positivo a la presencia del antígeno con un 0,76% (1/131).

La ausencia del antígeno del virus de la diarrea viral bovina (vDVB) en las tres haciendas muestreadas se debe a las condiciones favorables que se manejan los predios, así como la separación por medio de instalaciones a terneras de ganado adulto.

Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina por edad

Los resultados del estudio a la prevalencia del virus de la diarrea viral bovina según su edad, en su totalidad fueron del 0% como se observa en la Tabla 8, demostrando que no hay asociación entre la presencia del virus con la edad de las terneras.

Tabla 8

Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina por edad

Edades (días)	n	(+)	%	95% I.C.
1 – 17	21	0	0	-
18 – 34	16	0	0	-

Edades (días)	n	(+)	%	95% I.C.
35 – 51	12	0	0	-
52 – 68	10	0	0	-
69 – 85	10	0	0	-
86 – 102	7	0	0	-
103 – 119	9	0	0	-
Total	85	0	0	

Nota. n: número de terneras; (+): positivo; %: porcentaje equivalente a la cantidad de positivos; 95% I.C.: intervalo de confianza al 95%.

Se determinó la ausencia de circulación viral dado que en el manejo de instalaciones tienen separados al ganado joven de adulto, es decir que las terneras de edades comprendidas de 0 a 120 días, están separadas de vaconas, vacas vientre y rejo, evitando la incidencia de enfermedades infectocontagiosas.

La detección del virus de manera temprana ayuda a prevenir los efectos que ocasiona a largo plazo por tal motivo se recomienda detectar el antígeno del virus de la diarrea viral bovina en terneras menores a los 6 meses de edad (Bedekovic et al, 2012).

Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina por tipo de raza

No se encontró un efecto asociativo entre la presencia del virus de la diarrea viral bovina (vDVB) con el tipo de raza de las terneras muestreadas de las tres haciendas de producción lechera del cantón Mejía.

Tabla 9

Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina por raza

Tipo de raza	n	(+)	%	95% I.C.
N.I.	22	0	0	-
Puros	49	0	0	-

Tipo de raza	n	(+)	%	95% I.C.
Mestizos	14	0	0	-
Total	85	0	0	

Nota. N.I.: no informa; n: número de terneras; (+): positivo; %: porcentaje equivalente a la cantidad de positivos; 95% I.C.: intervalo de confianza al 95%.

Los resultados encontrados en la presente investigación, coinciden con la investigación de Carrillo (2019) donde el 39% (39/100) de los animales muestreados son de raza mestiza entre ellas cruzamiento con la raza Holstein, obteniéndose como resultado un 0% de prevalencia al agente viral del virus de la diarrea viral bovina (vDVB). Sin embargo, Arauco & Lozano (2018) determinaron en animales puros, cruzadas y criollas una prevalencia del 5,8% (7/121) a la presencia del virus en el valle del Mantaro, región Junín de Perú.

Datos generales de las haciendas de producción lechera

Con la aplicación de las encuestas epidemiológicas realizada a cada uno de los administradores de las tres haciendas, se recopiló la información y se obtuvo los siguientes datos:

La superficie total promedio de las haciendas fue de 97,92 hectáreas y de superficie en pastos es de 76,26 hectáreas. Las tres haciendas son netamente lecheras, manifestando que la hacienda HC2 tiene una producción promedio de leche total al día de 5000 litros siendo la mayor productora de las tres haciendas muestreadas, le sigue la hacienda HC1 con 4000 litros/día y la hacienda HC3 con una producción al día de 1520 litros.

El 100% (3/3) de las haciendas cuentan con control veterinario clínico y ginecológico con visitas semanales (cada 15 días). A su vez, las procedencias de los animales de reemplazo son propias y su sistema de reproducción es a través de I.A.,

garantizando el buen manejo sanitario empleado mediante la aplicación de normas de bioseguridad para sus predios.

Factores de riesgo para el virus de la diarrea viral bovina

La ausencia de resultados positivos a la prueba diagnóstica de ELISA Sándwich, en las 85 muestras analizadas, no permitió determinar factores de riesgo asociados al virus de la diarrea viral bovina tanto para las terneras muestreadas (Tabla 10) como a nivel de hato (Tabla 11), por tal razón, los factores evaluados son factores protectantes que ayudan a evitar altas prevalencias del virus de la diarrea viral bovina (vDVB).

La presencia de ovejas en un hato ganadero es una fuente de infección de alto riesgo porque está dentro del género *Pestivirus*. El riesgo se genera porque el virus de la frontera predominante en ovejas y cabras causa similares sintomatologías a nivel del sistema reproductivo. Esta convivencia de especies son un riesgo para el rebaño de ganado bovino facultando la incidencia de vDVB (Krametter-Froetscher et al, 2010).

El vDVB tiene un amplio rango de manifestaciones clínicas debido a la interacción de varios factores asociados con la presencia del virus como son la edad, estado inmune y la cepa y biotipo viral (Lértora, 2003).

Por tal motivo, se debe dar importancia a los factores de riesgo para ayudar en el desarrollo, evaluación y optimización de los programas de control y erradicación de vDVB (Han et al, 2018).

Tabla 10

Factores de riesgo asociados con la infección persistente del virus de la diarrea viral bovina en las terneras

Factor	n	vDVB		Odds ratio	95% I.C.	p-valor
		Positivos	%			
Edad						
0-60 días	57	0	0	-	-	-
61-120 días	28	0	0	-	-	-
Vacunación						
No	85	0	0	-	-	-
Si	0	0	0	-	-	-
Presencia de ovejas						
No	49	0	0	-	-	-
Si	36	0	0	-	-	-
Tipo de raza						
N.I	22	0	0	-	-	-
Puros	49	0	0	-	-	-
Mestizos	14	0	0	-	-	-

Nota. n: número de terneras; %: porcentaje de prevalencia; 95% I.C: intervalo de confianza al 95%; OR: significativos > 1; p-valor: significativos < 0,05.

Los factores de riesgo a nivel de hato se ven asociado con la procedencia de animales de reemplazo y las normas de bioseguridad establecidas en las haciendas, así como la asistencia de un médico veterinario (Almeida et al, 2013).

De acuerdo a un estudio realizado por Arauco & Lozano (2018), coincide los resultados en cuanto a la interacción del origen de los animales de reemplazo con la presencia del vDVB, dando como resultado un OR de 0,2; es decir, es un factor protectante porque los reemplazos los obtienen del propio hato.

Sin embargo, van Roon et al (2020), determinó un OR de 1,41 que evidencia a los animales de reemplazo como un factor de riesgo asociado a vDVB, al igual que los rebaños lecheros con un OR: 1,63 en comparación con rebaños de carne y tamaño de hato OR: 1,04.

Al momento de realizar las encuestas epidemiológicas a los administradores de las tres haciendas en estudio, se pudo llegar a considerar algunas variables asociadas a la presencia de vDVB, sin embargo, ninguno de los hatos presentó evidencias de exposición al virus y por consiguiente no se encontraron factores de riesgo asociados a los animales PI.

Tabla 11

Factores de riesgo asociados a los animales persistentemente infectados con el virus de la diarrea viral bovina a nivel de hato

Factor	n	vDVB		Odds ratio	95% I.C.	p-valor
		Positivos	%			
Procedencia						
Externos	0	0	0			
Propios	3	0	0	-	-	-
Vacunación						
No	0	0	0			
Si	3	0	0	-	-	-
Sistema de reproducción						
Monta	0	0	0			
Inseminación	3	0	0	-	-	-
Control veterinario clínico						
No	0	0	0			
Si	3	0	0	-	-	-
Control veterinario ginecológico						
No						

Factor	n	vDVB		Odds ratio	95% I.C.	p-valor
		Positivos	%			
	0	0	0			
Si	3	0	0	-	-	-
Presencia de ovejas						
No	2	0	0			
Si	1	0	0	-	-	-
Conocimiento de la enfermedad						
No	0	0	0			
Si	3	0	0	-	-	-
Manejo de abortos						
No	0	0	0			
SI	3	0	0	-	-	-

Nota. n: número de haciendas; %: porcentaje de prevalencia; 95% I.C: intervalo de confianza al 95%; OR: significativos > 1; p-valor: significativos < 0,05.

Socialización de resultados y recomendaciones sobre el control del vDVB

Se presentaron los resultados emitidos por parte del laboratorio TIER – ZENTRUM, los cuales se entregaron de forma personal a cada uno de los propietarios de las haciendas en estudio, además de proporcionarles ciertas recomendaciones importantes para la prevención y control de la diarrea viral bovina en los hatos ganaderos.

Dado la ausencia del antígeno del vDVB en las terneras muestreadas, se socializó recomendaciones adicionales (adjuntada a cada informe de resultados) a las ya establecidas en el rebaño bovino, para mantener el estatus sanitario e implementar programas de control ante la presencia del vDVB.

Capítulo V

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

La presencia de terneras persistentemente infectadas (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (vDVB) en los tres hatos muestreados ubicados en el cantón Mejía fue del 0%, demostrando que la circulación viral de este virus es nula.

No se estableció una asociación entre las variables del estudio (edad y raza) con la prevalencia del virus de la diarrea viral bovina en las terneras muestreadas al obtenerse resultados negativos, gracias a que se mantiene un buen programa de control sanitario lo que evidencia una minimización en los factores de riesgo asociados a este virus.

Se realizó la retribución y capacitación a los ganaderos de las tres haciendas en estudio, a través de la entrega de resultados y recomendaciones de manera personal.

Recomendaciones

Mantener normas de bioseguridad si se introducen animales externos al predio mediante cuarentena y realizando pruebas de diagnóstico que descarten la presencia del virus en los bovinos.

Identificar de manera temprana a los animales persistentemente infectados (PI) para su inmediata eliminación e inmunizar al resto de bovinos para evitar la circulación del virus.

Incentivar a los ganaderos sobre el uso de vacunas para un eficaz programa de control del virus de la diarrea viral bovina (vDVB), además de informar acerca de los factores de riesgo asociados a la enfermedad reduciendo su incidencia en el rebaño.

Se debe ampliar el muestreo a todo el hato ganadero para obtener resultados más precisos sobre la presencia de enfermedades infectocontagiosas para generar controles zoonosarios.

Bibliografía

- AGROCALIDAD. (2020). *Enfermedades, infecciones e infestaciones de animales determinadas como de notificación o declaración obligatoria en el Ecuador*.
<https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/8-Enfermedades-de-declaracion-C.pdf>
- Aguirre, M. A. (2021). *Determinación de la prevalencia y factores de riesgo asociados a la diarrea viral bovina en el cantón El Pangui, provincia de Zamora Chinchipe*. (Tesis). Universidad Nacional de Loja, Loja.
[https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/23814/1/Mayra Alejandra Aguirre Naula.pdf](https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/23814/1/Mayra%20Alejandra%20Aguirre%20Naula.pdf)
- Almeida, L. L., Miranda, I. C., Hein, H. E., Neto, Santiago, W., Costa, E. F., Marks, F. S., Rodenbusch, C. R., Canal, C. W., & Corbellini, L. G. (2013). Herd-level risk factors for bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds from Southern Brazil. *Research in Veterinary Science*, 95(3), 901-907.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.08.009>
- Arauco, F., & Lozano, E. (2018). Seroprevalencia de diarrea viral bovina en hatos lecheros del Valle del Mantaro, Región Junín, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(4), 1515-1526.
<https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15347>
- Baker, J. C. (1990). Clinical aspects of bovine virus diarrhoea virus infection. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 9, 25-41.
<https://doi.org/10.20506/rst.9.1.492>

- Baker, J. C. (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 11, 425-445.
[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30460-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30460-6)
- Bauermann, F. V., Ridpath, J. F., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2013). HoBi-like viruses: An emerging group of pestiviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25, 6-15. <https://doi.org/10.1177/1040638712473103>
- Baule, C., Kulcsár, G., Belák, K., Albert, M., Mittelholzer, C., Soós, T., Kucsera, L., & Belák, S. (2001). Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhea virus type I. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 146-153. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.146-153.2001>
- Bedekovic, T., Jemersic, L., Lojkic, I., Lemo, N., Keros, T., Balatinac, J., Brnic, D., Ivkovic, T. C., & Madic, J. (2012). Bovine viral diarrhoea: Ag ELISA and reverse transcription polymerase chain reaction as diagnostic tools in pooled serum samples from persistently infected cattle - Short communication. *Veterinary Archives*, 82(3), 295-301. <https://hrcak.srce.hr/file/120027>
- Bitsch, V., & Rønsholt, L. (1995). Control of bovine viral diarrhea virus infection without vaccines. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 11(3), 627-640. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30471-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30471-0)
- Bolin, S. R., & Grooms, D. L. (2004). Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 20, 51-68. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.009>

- Bolin, S. R., & Ridpath, J. F. (1992). Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *American journal of veterinary research*, 2157-2163. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1334641/>
- Bolin, S. R., McClurkin, A. W., Cutlip, R. C., & Coria, M. F. (1985). Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *American journal of veterinary research*, 573-576. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2986494/>
- Brock, K. V. (2003). The persistence of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 31, 133-135. [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00029-0](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00029-0)
- Brock, K. V., Redman, D. R., Vickers, M. L., & Irvine, N. E. (1991). Quantitation of bovine viral diarrhoea virus in embryo transfer flush fluids collected from a persistently infected heifer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 3, 99-100. <https://doi.org/10.1177/104063879100300127>
- Brodersen, B. W., White, A. K., & Smith, D. R. (1998). Immunohistochemical Test on Skin Biopsies as a Method for Detection of Cattle Persistently Infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus. *American Association of Bovine Practitioners*, 246. <https://journals.tdl.org/bovine/index.php/AABP/article/view/5756>
- Brownlie, J. (1985). Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea/mucosal disease complex in cattle. *Farm Practice*, 7(6), 195-202. <https://doi.org/10.1136/inpract.7.6.195>
- Brownlie, J., Clarke, M. C., Howard, C. J., & Pocock, D. H. (1987). Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Annals of veterinary research*, 157-166. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3619343/>

- Carrillo, L. M. (2019). *Determinación del virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), en el cantón Santa Rosa mediante el método molecular PCR. (Tesis)*. Universidad Técnica de Machala, Machala .
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/15524>
- Chase, C. (2013). The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals*, 52-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.09.009>
- Childs, T. (1946). X Disease of Cattle - Saskatchewan. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, 10, 316-319.
<https://doi.org/http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17648222><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1661174>
- De Verdier Klingenberg, K. (2000). Enhancement of clinical signs in experimentally rotavirus infected calves by combined viral infections. *The Veterinary record*, 717-719. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11140931/>
- Deregt, D., & Loewen, K. G. (1995). Bovine viral diarrhea virus: biotypes and disease. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne*, 36, 371-378.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686947/>
- Earth, G. (2021). https://earth.google.com/web/search/parroquia+aloag/@-0.4687386,-78.5851548,2887.8324641a,1056.50302825d,35y,-91.44947361h,45t,0r/data=CnoaUBJKCiUweDkxZDVhOGMzMzE5NGE0ZDc6MHg3YjVhMWNjMmVhN2NmYjcxGWDcVy_Q_92_ITxGHi1zpVPAKg9wYXJyb3F1aWEgYWxvYWcYASABliYKJAnP
- 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 diarrhea virus in

diagnostic samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(4), 376-381. <https://doi.org/10.1177/104063870701900406>

Edwards, S. (1990). The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 9(1), 115-130. <https://doi.org/10.20506/rst.9.1.486>

ESPAC. (2017). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua. Sector pecuario: Ganado vacuno en el Ecuador. *INEC*, 2, 17-23. http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-88021974000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Fray, M. D., Paton, D. J., & Alenius, S. (2000). The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 615-627. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00082-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00082-8)

Fredriksen, B., Sandvik, T., Loken, T., & Odegaard, S. A. (1999). Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Record*, 144, 111-114. <https://doi.org/10.1136/vr.144.5.111>

French, E. L., Hore, D. E., Snowdon, W. A., Parsonson, J. M., & Uren, J. (1974). Infection of Pregnant Ewes With Mucosal Disease Virus of Ovine Origin. *Australian Veterinary Journal*, 50, 45-54. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1974.tb05250.x>

Gasque, R. (2008). ENCICLOPEDIA BOVINA: Diarrea Viral Bovina. <https://es.slideshare.net/mushufasaa/enciclopedia-bovina-mvz-ramn-gasque-gomez>

- Gillespie, J. H., Baker, J. A., & McEntee, K. (1960). A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *The Cornell veterinarian*, 73-79.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13850091/>
- González, K. J. (2016). *Estudio de la prevalencia de diarrea viral bovina en ganaderías del cantón Saraguro, provincia de Loja. (Tesis)*. Universidad Nacional de Loja, Loja. [https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/11259/1/tesis final ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA EN GANADERÍAS DEL CANTÓN SARAGURO%2C PROVINCIA DE LOJA”.pdf](https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/11259/1/tesis%20final%20ESTUDIO%20DE%20LA%20PREVALENCIA%20DE%20DIARREA%20VIRAL%20BOVINA%20EN%20GANADERIAS%20DEL%20CANTON%20SARAGURO%2C%20PROVINCIA%20DE%20LOJA.pdf)
- Graham, D. A., McLaren, I. E., & German, A. (1998). Evaluation of the suitability of a commercial bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA for diagnostic testing. *Veterinary Journal*, 156(2), 149-154. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(05\)80045-0](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(05)80045-0)
- Grooms, D. L. (2004). Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 20, 5-19.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.006>
- Han, J.-H., Holter, J., Moffat, J., Weston, J. F., Heuer, C., & Gates, M. C. (2018). Using Bayesian network modelling to untangle farm management risk factors for bovine viral diarrhoea virus infection. *Preventive Veterinary Medicine*, 161, 75-82.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.014>
- Houe, H. (1995). Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 11, 521-547.
[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30465-5](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30465-5)

- Houe, H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*, 64(2-3), 89-107.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00262-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00262-4)
- Houe, H., & Meyling, A. (1991). Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *National Veterinary*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=NL19910110907>
- Khodakaram-Tafti, A., & Farjanikish, G. H. (2017). Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18, 154-163. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2017.4190>
- Krametter-Froetscher, R., Duenser, M., Preyler, B., Theiner, A., Benetka, V., Moestl, K., & Baumgartner, W. (2010). Pestivirus infection in sheep and goats in West Austria. *Veterinary Journal*, 186(3), 342-346.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.09.006>
- Labanda, J. A. (2015). *Prevalencia de diarrea viral bovina en vacas lecheras de las ganaderías del cantón Loja (Tesis)*. Universidad Nacional de Loja, Loja.
[http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/10258/1/tesis Jorge Amable Labanda González.pdf](http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/10258/1/tesis%20Jorge%20Amable%20Labanda%20Gonz%C3%A1lez.pdf)
- Lanyon, S. R., Hill, F. I., Reichel, M. P., & Brownlie, J. (2014). Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *Veterinary Journal*, 199, 201-209.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024>
- Larska, M., Polak, M. P., Riitho, V., Strong, R., Belák, S., Alenius, S., Uttenthal, A., & Liu, L. (2012). Kinetics of single and dual infection of calves with an Asian atypical bovine pestivirus and a highly virulent strain of bovine viral diarrhoea

virus 1. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35, 381-390. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.03.003>

Lértora, W. J. (2003). Diarrea Viral bovina: actualización. *Revista Veterinaria*, 14(1), 149-155.
http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/10/cys_10_Enfermedades_Respiratorias_Bovinas.pdf
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.09.012>

Liu, L., Xia, H., Wahlberg, N., Belák, S., & Baule, C. (2009). Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology*, 385, 351-357.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.004>

MAG. (2014). Resultados nacionales sobre el III Censo Nacional Agropecuario de la República del Ecuador. *Censo Nacional Agropecuario*, 1, 57.
https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/CNA/Tomo_CNA.pdf

Mainar-Jaime, R. C., Berzal-Herranz, B., Arias, P., & Rojo-Vázquez, F. A. (2001). Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral-diarrhoea virus (BVDV) infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from the Asturias region of Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 52, 63-73.
[https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(01\)00239-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(01)00239-2)

Martínez, V. C. (2017). *Establecimiento de un método de diagnóstico para la detección del virus de la Diarrea Viral Bovina mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. (Tesis)*. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Sangolquí.
<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/13373/1/T-ESPE-057328.pdf>

- McGowan, M. R., & Kirkland, P. D. (1995). Early reproductive loss due to bovinepestivirus infection. *British Veterinary Journal*, 151(3), 263-270.
[https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(95\)80176-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(95)80176-6)
- Meyers, G., & Thiel, H.-J. (1996). MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PESTIVIRUSES. *Advances in virus research*, 47, 53-118.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60734-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60734-4)
- Moennig, V., & Becher, P. (2018). Control of bovine viral diarrhea. *Pathogens*, 7(1).
<https://doi.org/10.3390/pathogens7010029>
- Moennig, V., & Liess, B. (1995). Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 11(3), 477-487. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30462-X](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30462-X)
- Moreno-Altamirano, A., López-Moreno, S., & Corcho-Berdugo, A. (2015). Principales medidas en epidemiología. *Salud Pública de México*, 42(2), 338-348.
https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/spm/v42n4/2882.pdf
- Nagai, M., Hayashi, M., Itou, M., Fukutomi, T., Akashi, H., Kida, H., & Sakoda, Y. (2007). Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes*, 36, 135-139. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0190-0>
- OIE. (2018). Diarrea Viral Bovina. *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los animales terrestres*. <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. *The Cornell veterinarian*, 1-378.
<https://doi.org/https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=uc1.b4179371&view=1up&seq=223>
- Pecora, A., & Pérez, M. S. (2017). Actualización en diarrea viral bovina, herramientas diagnósticas y estrategias de prevención. *INTA-Buenos Aires Argentina.*, 4-24.
https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-actualizacion_en_diarrea_viral_bovina.pdf
- Peterhans, E., Jungi, T. W., & Schweizer, M. (2003). BVDV and innate immunity. *Biologicals*, 31, 107-112. [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00024-1](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00024-1)
- Pita, S., Vila, M. T., & Carpena, J. (2002). Determinación de factores de riesgo. *International Journal of Control*, 48, 1753-1754.
<https://doi.org/10.1080/00207178808906281>
- Reinhardt, G., Ochoa, C. A., Tadich, N., & Riedemann, S. (2003). 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*, 40(1), 1-5. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2008000100001>
- Ridpath, J. F. (2013). Immunology of BVDV vaccines. *Biologicals*, 41(1), 14-19.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.003>
- Ridpath, J. F., Bolin, S. R., & Dubovi, E. J. (1994). Segregation of Bovine Viral Diarrhea Virus into Genotypes. *Virology*, 205(1), 66-74.
<https://doi.org/10.1006/viro.1994.1620>

- Saa, L. R., Perea, A., García, I., Arenas, A. J., Jara, D. V., Ramos, R., & Carbonero, A. (2011). 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*, 645-649.
<https://doi.org/10.1007/s11250-011-9948-4>
- SAG. (2018). *Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile*. Diarrea Viral Bovina: www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/images/v2/rind1a.jpg
- Saliki, J. T., & Dubovi, E. J. (2004). Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, *20*, 69-83.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.005>
- Sandvik, T. (1999). Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary Microbiology*, *64*(2-3), 123-134.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00264-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00264-8)
- Schirrmeyer, H., Strebelow, G., Depner, K., Hoffmann, B., & Beer, M. (2004). Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *Journal of General Virology*, *85*, 3647-3652.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.80238-0>
- Thrusfield, M. (2005). *Veterinary epidemiology*.
- Timurkan, M. Ö., & Aydin, H. (2019). Increased genetic diversity of BVDV strains circulating in Eastern Anatolia, Turkey: first detection of BVDV-3 in Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, *51*, 1953-1961.
<https://doi.org/10.1007/s11250-019-01901-6>

- van Roon, A. M., Mercat, M., van Schaik, G., Nielen, M., Graham, D. A., More, S. J., Guelbenzu-Gonzalo, M., Fourichon, C., Madouasse, A., & Santman-Berends, I. M. (2020). Quantification of risk factors for bovine viral diarrhoea virus in cattle herds: A systematic search and meta-analysis of observational studies. *Journal of Dairy Science*, *103*(10), 9446-9463. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18193>
- Vanroose, G., Nauwynck, H., Van Soom, A., Vanopdenbosh, E., & de Kruif, A. (1998). Replication of Cytopathic and Noncytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus in Zona-Free and Zona-Intact In Vitro-Produced Bovine Embryos and the Effect on Embryo Quality. *Biology of Reproduction*, *58*, 857-866. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.3.857>
- Voges, H., Horner, G. W., Rowe, S., & Wellenberg, G. J. (1998). Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull. *Veterinary Microbiology*, *61*, 165-175. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00177-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00177-1)
- Yarnall, M. J., & Thrusfield, M. V. (2017). Engaging veterinarians and farmers in eradicating bovine viral diarrhoea: A systematic review of economic impact. *Veterinary Record*, *181*, 1-9. <https://doi.org/10.1136/vr.104370>

<https://drive.google.com/drive/folders/1rEaHZJu7KxjTDhZnx-lt2IHfIiuOLiYG>