



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE
PUNO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**



**SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL
BOVINA (vDVB) EN VACUNOS DE LA RAZA BROWN SWISS EN
LA CUENCA LECHERA DEL DISTRITO DE POMATA
TESIS**

PRESENTADA POR:

Bach. YUDY ALVAREZ QUISPE

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

PUNO – PERÚ

2020



DEDICATORIA

A Dios, por permitirme terminar esta investigación.

Está dedicado a mis queridos abuelitos: Marcos y Luisa quienes siempre me alentaron todo el tiempo para lograr mi meta trazada.

A mi compañera, que sin su aliento exigente y apoyo incondicional no hubiera podido finalizar esta investigación. Gracias amor mío. Y con mucho cariño para mi hijo Yuber Snaider.

A mis queridos tíos (as) por el apoyo que me brindaron durante mi formación profesional.

Yudy ALVAREZ QUISPE



AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Nacional del Altiplano y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a todos los docentes quienes me han brindado su conocimiento en mi formación profesional.
- Al laboratorio de salud animal del C.E-Chuquibambilla y al personal que labora, por haberme dado facilidades para procesar mis muestras de suero sanguíneo.
- Al Dr. Natalio Luque Mamani y Mg. Sc. Diannett Benito López, por su acertada colaboración durante la ejecución y redacción del presente trabajo de investigación.
- De manera muy especial quiero agradecer a los criadores de ganado vacuno del distrito de Pomata, por haberme facilitado el manipuleo de sus ejemplares para extraer muestras de sangre para mi trabajo de investigación.
- A mis compañeros de clase y amigos de los que guardo los recuerdos hermosos de mi época universitaria.

Yudy ALVAREZ QUISPE



INDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 12

ABSTRACT..... 13

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 OBJETIVO GENERAL 15

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 DIARREA VIRAL BOVINA (DVB) 17

2.2 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS 17

2.2.1 Taxonomía..... 17

2.2.2 Estructura..... 18

2.2.3 Clasificación 18

2.2.4 Genoma..... 19

2.2.5 Replicación viral..... 20

2.2.6 Virulencia 21

2.2.7 Variabilidad 22

2.2.8 Epizootiología..... 22

2.3 PATOGENIA..... 23

2.3.1 Infección aguda 24

2.3.2 Infección subclínica..... 25

2.3.3 Infección fetal..... 25

2.3.4 Infecciones persistentes 26

2.3.4.1 Animales persistentemente infectados (PI) 26

2.3.5 Complejo diarrea neonatal bovina..... 27

2.3.6 Enfermedad de las mucosas (EM)..... 27

2.3.7 Síndrome hemorrágico 28

2.3.8 Complejo respiratorio..... 28



2.3.9 Trastornos reproductivos	29
2.3.9.1 Efecto del virus sobre la fertilidad.....	31
2.3.9.2 Malformaciones	31
2.4 ASPECTOS INMUNOLÓGICOS	32
2.5 DIAGNOSTICO	33
2.5.1 Aislamiento viral cultivos celulares	34
2.5.2 ELISA: (Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas).....	34
2.5.3 Inmunohistoquímica (IHQ)	35
2.5.4 Reacción en cadena de polimerasa	36
2.5.5 RT- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real).....	36
2.6 EPIDEMIOLOGIA	37
2.6.1 Prevalencia de la infección.....	37
2.6.2 Hospedador.....	37
2.6.3 Fuentes de infección	38
2.6.4 Modos de transmisión.....	38
2.6.4.1 Transmisión vertical	38
2.6.4.2 Transmisión horizontal	40
2.6.4.3 Transmisión entre hatos.....	41
2.6.4.4 Transmisión dentro del hato	41
2.7 PREVENCIÓN Y CONTROL	41
2.7.1 Vacunas	43
2.7.1.1 Vacuna a virus vivo modificado.....	43
2.7.1.2 Vacuna Inactivada	45
2.7.1.3 Programas de erradicación	45
5.8 ANTECEDENTES	46

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO	50
3.2 POBLACIÓN.....	50
3.2.1 Tamaño de muestra.....	50
3.3 DISTRIBUCIÓN	51
3.4 MATERIALES Y EQUIPOS	52
3.4.1 Materiales	52
3.4.2 Equipos	52
3.4.3 Reactivos	53



3.5 MÉTODO	53
3.5.1 Obtención de las muestras sanguíneas	53
3.5.2 Análisis serológico	53
3.5.2.1 Prueba de ELISA para el virus de la diarrea viral bovina	53
3.6 ANÁLISIS DE DATOS	55
3.6.1 Estimación de la seroprevalencia	55
3.6.2 Método estadístico.....	55
CAPITULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 SEROPREVALENCIA CONTRA LOS ANTICUERPOS DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA	57
4.2 SEROPREVALENCIA DE LA DIARREA VIRAL BOVINA SEGÚN SEXO	60
4.3 SEROPREVALENCIA DE LA DIARREA VIRAL BOVINA SEGÚN EDAD	62
4.4 SEROPREVALENCIA SEGÚN ESTADO REPRODUCTIVO	64
4.5 SEROPREVALENCIA SEGÚN ESTADO PRODUCTIVO	66
V. CONCLUSIONES	68
VI. RECOMENDACIONES	69
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS	80

Área: Salud Animal

Tema: Prevalencia de vDVB en vacunos Brown Swiss de Pomata.

FECHA DE SUSTENTACION: 16 de enero 2020.



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Distribución de vacas para la prueba serológica de diarrea viral bovina mediante ELISA.	51
Tabla 2: Contenido del Kit ELISA (IDEXX BVDV Total Ab).....	53
Tabla 3: Vacunos Brown Swiss, según sexo; con reacción a la prueba de ELISA indirecta.	56
Tabla 4: Seroprevalencia de la diarrea viral bovina (DVB), en muestras de suero sanguíneo de vacunos de la raza Brown Swiss del distrito de Pomata, Provincia de Chucuito - Puno.	57
Tabla 5: Detección de anticuerpos contra el vDVB, en muestras de suero sanguíneo de vacunos de la raza Brown Swiss, según sexo.....	60
Tabla 6: Detección de anticuerpos contra el vDVB, en muestras de suero sanguíneo de vacunos de la raza Brown Swiss, según edad.	62
Tabla 7: Detección de anticuerpos contra el vDVB, en muestras de suero sanguíneo de vacas de la raza Brown Swiss, según estado reproductivo.	64
Tabla 8: Detección de anticuerpos contra el vDVB, en muestras de suero sanguíneo de vacas de la raza Brown Swiss, según estado productivo.	66



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

Acs	: Anticuerpos
ARN	: Ácido Ribonucleico
DVB	: Diarrea viral bovina
VDVB	: Virus de la diarrea viral bovina
ELISA	: Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas
EM	: Enfermedad de las mucosas
Gp	: Glicoproteína
IF	: Inmuno Florescencia
IHQ	: Inmunohistoquímica
NCP	: No Citopático
CP	: Citopático
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	: Reacción de Transcriptasa reversa seguido de Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PI	: Persistentemente Infectados
P	: Prevalencia
RIB	: Rinotraqueitis Infecciosa Bovina



NB	: Neospora Bovina
VLM	: Virus Vivo Modificado
SENASA	: Servicio Nacional de Sanidad Agraria
ul	: Microlitro
χ^2_c	: Valor de Ji-cuadrado
Σ	: Sumatoria
θ_i	: Frecuencia de valor observado
e_i	: Frecuencia de valor esperado



RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el distrito de Pomata provincia de Chucuito - Puno; con el objetivo de determinar la seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en vacunos de la raza Brown Swiss; para el estudio se tomó 87 muestras de sangre de la vena yugular, utilizando aguja n° 20 x 1½ pulgada y tubos vacutainer sin anticoagulante para obtener suero sanguíneo. El procedimiento de análisis fue mediante la prueba de ELISA indirecta, utilizando el Kit IDEXX BVDV Total Ab que detecta anticuerpos contra el vDVB el análisis de muestras se realizó en el Laboratorio de Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la sede del Centro Experimental – Chuquibambilla de la UNA-PUNO, los datos fueron analizados a través de la prueba estadística de Chi-cuadrado y estadísticos de tendencia central; se determinó que la seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en el distrito de Pomata es 75.90% (66/87); y su distribución de prevalencias según variables estudiadas es el siguiente según sexo 63.60% en machos y 77.60% en hembras; según edad 65.50% en vacunos menores de 2 años y en mayores de 2 años 81.00%; según estado reproductivo 81.50% en vacas vacías y 80.60% en vacas preñadas; según estado productivo 87.10% vacas en lactación y 74,10% vacas en seca. El agente viral de esta enfermedad se encuentra presente en la zona de estudio; por lo que, es necesario implementar medidas de prevención y control para evitar pérdidas económicas.

Palabras Clave: *vDVB, ELISA, Seroprevalencia, Vacunos y Pomata.*



ABSTRACT

This research work was carried out in the district of Pomata, Chucuito province - Puno; with the objective of determining the seroprevalence of the bovine viral diarrhea virus in Brown Swiss cattle; For the study, 87 blood samples were taken from the jugular vein, using a 20 x 1½ inch needle and vacutainer tubes without anticoagulant to obtain blood serum. The analysis procedure was through the indirect ELISA test, using the IDEXX BVDV Total Ab Kit that detects antibodies against vDVB. The analysis of samples was carried out in the Animal Health Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics at the Center's headquarters Experimental - Chuquibambilla of UNA-PUNO, the data were analyzed through the Chi-square statistical test and statistics of central tendency; The seroprevalence of the bovine viral diarrhea virus in the Pomata district was determined to be 75.90% (66/87); and its distribution of prevalences according to variables studied is the following according to sex 63.60% in males and 77.60% in females; according to age 65.50% in cattle under 2 years old and 81.00% in those over 2 years old; according to reproductive status 81.50% in empty cows and 80.60% in pregnant cows; according to productive status 87.10% lactating cows and 74.10% dry cows. The viral pathogenic agent of this disease is present in the study; therefore, it is necessary to implement prevention and control measures to avoid economic losses.

Keywords: *vDVB, ELISA, Seroprevalence, bovine, Pomata.*



CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

En el Perú la población de ganado vacuno es 5 156 044, la raza predominante son las criollas, representando el 63,9% del total, seguida por la raza Brown Swiss con 17,6%, Holstein con 10,3% y otras razas con 8,2%. La mayor población de ganado vacuno se concentra en la Sierra con 73,2%. El departamento de Puno cuenta con el 12.0 % (617 163) de la población total de vacunos del Perú de las cuales predomina la raza criolla con 63.5 % (391 704) seguido por la raza Brown Swiss con 34.0% (210 244). La provincia de Chucuito posee 57 213 vacunos y el distrito de Pomata cuenta con 9 569 (INEI, 2012). El distrito de Pomata presenta todas las condiciones necesarias de ser una zona ganadera de crianza semi intensiva y/o extensiva, tomando en cuenta que la mayoría de los criadores de ganado vacuno tiene una importante población. El altiplano peruano, ubicado por encima de los 3,830 m.s.n.m., donde la ganadería es una de las principales actividades que realizan las familias rurales, la crianza de vacunos es uno de los pilares de la economía regional, aprovechando la producción de leche y se encuentra en manos de pequeños, medianos y grandes productores (MINAGRI, 2015).

El virus de la diarrea viral bovina es endémico en casi todo el mundo, prevaleciendo diferentes genotipos según las distintas regiones geográficas (Yesilbag, 2017), es una enfermedad que afecta a los rumiantes domésticos y salvajes, causando infecciones transplacentarias y su asociación con otros patógenos del tracto respiratorio y digestivo (Houe, 2003). El vDVB es un pestivirus con singular característica epidemiológica y biológica (Peterhans *et al*, 2003). La prevalencia de la diarrea viral bovina depende del tipo de ganado, densidad poblacional, tipo de manejo, comercio de



animales, manejo de pasturas, entre otros (Rivera, 2008), en estudios de seroprevalencia realizados sobre el vDVB en bovinos y otras especies en el país muestran que el virus está ampliamente distribuido con prevalencias que varían de cero a mayores de 90%. Así mismo, se han detectado animales portadores del virus inclusive en hatos con programas de vacunación (Rivera *et al*, 2001).

Es ampliamente conocido por ser uno de los causantes de fallas reproductivas, por su efecto inmunosupresor, predispone al animal a infecciones secundarias de origen bacteriano o viral. La enfermedad de la diarrea viral bovina no es restrictiva para el tránsito de los animales dentro del país, lo que explica en parte su amplia difusión, no solo en la población bovina, sino también en otras especies (Contreras *et al.*, 2000). Es una enfermedad que causa pérdidas productivas y reproductivas, por lo tanto; se requiere prevención y control de esta enfermedad que causa menor ingreso a la economía del sector pecuario.

Los estudios de seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina tienen mucha relevancia ya que sirve de base para otros estudios epidemiológicos y para efectuar medidas de prevención y control en los hatos de crianza de vacunos. En los últimos años se realiza la mejora genética para el aumento de la producción de leche mediante inseminación artificial con pajillas de toros nacionales e importados sin tener en cuenta el registro y/o control sanitario, motivo por lo cual se realiza esta investigación; teniendo como objetivo:

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en vacunos de la raza Brown Swiss de la cuenca lechera del distrito de Pomata de la provincia de Chucuito, región Puno.



1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en vacunos de la raza Brown Swiss, según sexo.

Determinar la seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en vacunos de la raza Brown Swiss, según edad.

Determinar la seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en vacunos de la raza Brown Swiss, según estado reproductivo.

Determinar la seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en vacunos de la raza Brown Swiss, según estado productivo.



CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 DIARREA VIRAL BOVINA (DVB)

Es una enfermedad de etiología vírica que afecta a los bovinos de todas las edades y que puede cursar con sintomatología muy variable dependiendo principalmente de las características de la cepa. Esta enfermedad se ha asociado a cuadros digestivos, con diarreas y erosiones en cavidad oral, trastornos reproductivos (abortos, alteraciones congénitas e infertilidad) y signos respiratorios (Hilbe *et al.*, 2007). El vDVB es endémico en casi todo el mundo, prevaleciendo diferentes genotipos según las distintas regiones geográficas (Yesilbag, 2017). Es uno de los patógenos que afecta a los rumiantes domésticos y silvestres causando pérdidas económicas debido a las infecciones transplacentarias y a su asociación con otros patógenos del tracto respiratorio y digestivo (Houe, 2003); así mismo, se ha identificado al virus como uno de los principales agentes causantes de aborto (Rivera, 2001). El efecto de esta enfermedad, sobre la eficiencia productiva y reproductiva de los animales y el impacto económico para la industria lechera, han permitido realizar numerosas investigaciones tendientes a conocer la epidemiología, patogénesis y biología del virus, conocimientos que están haciendo posible el control y erradicación de la enfermedad (Huamán, 2006).

2.2 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

2.2.1 Taxonomía

La diarrea viral bovina es causada por un virus de ARN de cadena simple, no segmentado y polaridad positiva, perteneciente a la familia Flaviviridae, del género Pestivirus. A este género también pertenecen; el virus de la peste porcina clásica (VPPC) y la enfermedad ovina de la frontera (VEF) (OIE, 2015). Al ser



un virus de ARN de cadena simple, su genoma es altamente propenso a mutaciones, las cuales le confieren heterogeneidad para poder adaptarse y evadir al sistema inmune del hospedero (Ridpath, 2003).

2.2.2 Estructura

Es un virus esférico y envuelto, con un tamaño de 40 a 60 nm, su cápside es proteica, en cuyo interior se compacta el material genético, está rodeada por una membrana fosfolipídica, en ella se encuentran ancladas tres glicoproteínas (Labanda, 2015). Está constituido por una hebra simple de ARN, de polaridad positiva, de un tamaño de 12,3 Kb (Lindenbach *et al.*, 2007).

2.2.3 Clasificación

Se han clasificado a los genotipos del virus de la diarrea viral bovina como tipo 1 (vDVB-1) y tipo 2 (vDVB-2), los cuales pueden ser diferenciados mediante anticuerpos monoclonales o suero policlonal dirigidos principalmente contra las proteínas estructurales E2 o mediante análisis genético. Ambos genotipos cuentan con subdivisiones en función de sus diferencias genéticas (OIE, 2015). Recientemente se ha descubierto un nuevo tipo de pestivirus, relacionado tanto genética como antigénicamente al vDVB, el cual ha sido bautizado como vDVB de tipo tres (vDVB-3) o Hoobi like-virus (Ridpath, 2003), ha sido aislada en países como Brasil, Italia, Tailandia e India, entre otros (Pécora *et al.*, 2016).

El genotipo 1 incluye a las cepas: NADL, SINGER, NY-1, C virus, TGAN y Osloss, mientras que el genotipo 2 comprende a las cepas: NY-93, 890, AZSPLN, MS-1, SY-89 y V/FLL (Morales, 2002).

Basado en los efectos causados en cultivos celulares, ambos genotipos se dividen en dos biotipos: no citopáticos (NCP) y citopáticos (CP). Los biotipos CP



se caracterizan por inducir a la apoptosis en cultivos celulares, lo que no sucede con los biotipos NCP. Sin embargo, el biotipo NCP es el de más circulación en las poblaciones de bovinos, causando mayores problemas en la salud del animal (Lanyon *et al.*, 2013).

2.2.4 Genoma

La longitud del genoma del virus de la diarrea viral bovina es de aproximadamente 12 Kilobases. Se ha determinado que la región más conservada en el genoma es la región 5' UTR, donde se encuentran los marcadores de virulencia. Posee una identidad de 86% a 93% entre las cepas de virus del genotipo tipo 1, y de más del 90% entre las cepas del virus del genotipo 2, y un 75% entre los virus de tipo 1 con los del tipo 2. Por tales motivos, a más de su importancia para la iniciación de la traducción del ORF, esta región es un locus frecuentemente utilizado para estudios epidemiológicos y taxonómicos (Kim & Dubovi, 2003).

El marco de lectura abierto origina una poliproteína, que luego de sufrir un procesamiento cotraduccional y postraduccional por parte de proteasas virales y celulares, da lugar a proteínas estructurales como: C, Erns, E1 y E (Soltan *et al.*, 2015); y seis proteínas no estructurales relacionadas con la replicación viral, entre ellas principalmente la proteína N^{pro}, la cual inhibe la respuesta inmune innata, impidiendo la producción de interferón I o antiviral para facilitar la replicación vírica en el hospedero (Bohórquez *et al.*, 2013).

La primera proteína codificada por el virus es N_{pro}, es una proteasa que se escinde a si misma de la poliproteína viral. Esta proteína también tiene funciones en la supresión del sistema inmune innato del hospedado, a través del



bloqueo de la actividad del factor regulador del interferón 3 (IRF3), que inhibe la producción del interferón tipo I (Ridpath, 2010).

2.2.5 Replicación viral

La replicación comienza con la adhesión a la membrana plasmática y penetración en la célula, parece ser que el receptor específico es una proteína de superficie de 50kD de las células, por mediación de la proteína de envoltura E2 (Morales, 2002). Se describe a una lipoproteína de baja densidad, que se repite múltiples veces en la superficie celular, como único receptor para la glicoproteína E2 del vDVB y que también facilita la endocitosis de la partícula viral (Hietala y Crossley, 2005). Por parte del virus, las glicoproteínas de la envoltura Erns y E2 pueden unirse independientemente a diferentes moléculas de la superficie celular. Al parecer, Erns se uniría a glicosaminoglicanos de la superficie celular y sería el evento inicial en la adsorción (Ridpath, 2010), pero la habilidad del vDVB de infectar un rango relativamente diversos tipos celulares, así como también el tropismo por los tejidos y especies hospederas están determinados por la glicoproteína E2 (Hietala y Crossley, 2005).

La internalización de la partícula viral se produce por endocitosis y el ARN genómico es liberado en el citoplasma, posterior a la acidificación de la vesícula endosomal. El ARN genómico actúa directamente como ARN mensajero para la traducción de proteínas virales y como plantilla para generar genomas de progenie. Al parecer, la replicación ocurre en el lado citoplasmático del retículo endoplasmático y se requiere de factores celulares para completar los procesos (Hietala y Crossley, 2005).



Las proteínas virales no estructurales se ensamblan en un complejo funcional de replicación y sirven en parte para catalizar la síntesis de una hebra de RNA complementaria de sentido negativo. El ARN de sentido negativo provee plantillas para sintetizar nuevas moléculas de ARN sentido positivo, usando un modelo de replicación asimétrico semiconservativo. El modelo incluye tres tipos de ARN virales, una forma replicativa de dos hebras, una hebra parcialmente simple y parcialmente doble y un ARN viral de una hebra (Ridpath, 2010).

2.2.6 Virulencia

La virulencia se refiere a una medida cuantitativa de la capacidad de un agente biológico para causar enfermedad, y está determinada por la capacidad para multiplicarse, ser invasivo, infectar células susceptibles, evadir el sistema inmune y causar daño en el tejido. De este modo, los virus que se replican de manera eficiente en el hospedero son más virulentos que los virus que se replican con menor eficiencia, en muchos casos la replicación es un factor determinante de la severidad de la enfermedad (Bolin y Ridpath, 1992). Algunos aislados de campo del vDVB-2 son más virulentos que otros, y que los vDVB-1 aislados dentro de un mismo genotipo presentan diferentes grados de virulencia (Ridpath *et al.*, 2000). Se ha demostrado, mediante inoculaciones experimentales en terneros, que aislados de baja virulencia, generan cuadros clínicos consistentes en fiebre pasajera y linfopenia de hasta un 50% y el virus es detectable sólo en tejido linfoide, mientras que aislados de alta virulencia, generan fiebre alta y sostenida, diarrea persistente, linfopenia sobre 80%, trombocitopenia de 60 a 80% y el virus es detectable en tejido linfoide, adrenal, páncreas, estómago, intestino, hígado, riñón, testículo, tiroides, pituitaria y piel (Liebler - Tenorio *et al.*, 2003), demostrando que la diferencia de virulencia entre cepas del vDVB se asocia con



la cantidad de virus presente en los tejidos y en la velocidad de diseminación del virus, atribuyéndose gran importancia a las diferencias en las propiedades de la multiplicación de las diferentes cepas virales (Bolin y Ridpath, 1992; Liebler Tenorio *et al.*, 2003).

2.2.7 Variabilidad

A través de los años diferentes autores han investigado la diversidad genética, antigénica y patológica del vDVB. La virulencia puede ser producida por mutaciones, que pueden ser puntuales (cambio de un solo nucleótido), delección de una sección del genoma, recombinaciones y duplicaciones (Goens, 2002).

La principal característica de este virus es su variabilidad genética y antigénica y la otra característica principal de un virus ARN es su plasticidad y ésta se debe a la falta de una exonucleasa eficiente para corregir las bases mal incorporadas. El vDVB usa esta estrategia para sobrevivir, originando cepas mutantes que escapan a la respuesta inmunológica del hospedador (Donis 1995). El cruce de especies crea otra oportunidad para la diversificación, ya sea por adaptación al nuevo hospedador o por evolución divergente. Sin embargo, el vDVB aislado de cerdos y ovejas tiene características biológicas y antigénicas similares a los aislados del bovino (Patón 1995).

2.2.8 Epizootiología

Infecta principalmente a los bovinos, especie para la cual representa uno de los patógenos más importantes, pero también puede ser encontrado en ovejas, cabras y rumiantes salvajes, que pudieran actuar como reservorios del virus. Por otro lado, la inhalación e ingestión de saliva, secreciones nasales, orina y heces



contaminadas con vDVB, constituyen las fuentes más frecuentes de infección, así como, el semen, secreciones uterinas, líquido amniótico o placenta contaminada (Patón, 1995).

2.3 PATOGENIA

El virus penetra por vía oro- nasal (esta es la ruta principal de infección post natal), se replica en las mucosas de la cavidad oral y nasal y luego se desarrolla viremia y se disemina a través del organismo (Ames, 1990). Después del contacto con membranas mucosas de la boca o nariz, la replicación ocurre en células epiteliales con una predilección por las tonsilas palatinas, especialmente células epiteliales de la cripta (Jubb *et al.*, 1993). El virus posee una gran afinidad por el sistema inmunológico y reproductor; particularmente por células mitóticamente activas como son linfocitos, fagocitos mononucleares y células epiteliales; los virus del tipo no citopáticos presentan tropismo por las células linfocitarias, mientras que las cepas citopáticas son más afines a células epiteliales. Posterior a la infección, la diseminación ocurrirá cuando el virus se encuentra libre en el suero o los leucocitos infectados con el mismo (Rondón, 2006). Por otra parte, se ha determinado un bajo nivel de expresión de moléculas alfa y beta tubulina, indicando aberraciones potenciales en la división celular, al igual que bajos niveles de expresión de los genes que codifican proteínas involucradas en la producción de energía y en la iniciación de la transducción de proteínas (Nelly, 2002). El animal enferma luego de la infección debido a que el virus de diarrea viral bovina se encuentra en el tejido epitelial linfoide: la replicación ocurre en células epiteliales, ya que este virus posee afinidad por el tejido linfoide siendo posible detectarlo en células de timo, nódulos, placas de peyer, tonsilas y bazo (Ames, 1990).



2.3.1 Infección aguda

Es una infección post natal, de severidad variable en bovinos seronegativos e inmunocompetentes, en especial en animales entre 6 y 24 meses de edad (Lértora, 2003). Son causadas por virus NCP, siendo más frecuente en animales jóvenes (OIE, 2015). Muchas infecciones originadas por cualquiera de los genotipos del vDVB resultan en una infección con manifestaciones subclínicas, no obstante, en algunos casos, virus de tipo 2 puede provocar una infección aguda severa (Ridpath, 2003).

En una infección aguda se produce una viremia de 7 a 10 días, los signos clínicos pueden variar de animal en animal y van desde fiebre, leucopenia, trombocitopenia, descarga nasal, inmunosupresión (asociada a la disminución en la población de linfocitos), diarrea, apoptosis en el timo y signos respiratorios; la gravedad de estos signos está en función de la cepa viral y la presencia de otros patógenos que provocan infecciones secundarias o el agravamiento de infecciones preexistentes como consecuencia de la inmunosupresión causada por el virus (Lanyon *et al.*, 2013; OIE, 2015). En este periodo, el virus puede detectarse en secreciones nasales y oculares, sangre (Brownlie, 1990), y en el esperma en un periodo de tiempo corto después y durante de la infección (OIE, 2015).

Los efectos de las infecciones agudas en la reproducción incluyen tasas de reproducción reducida, muerte embrionaria temprana, abortos, efectos teratogénicos, y disminución de la densidad y motilidad del esperma e incrementos en anomalías de la misma (OIE, 2015).

En los últimos tiempos se ha observado un aumento de infecciones agudas severas, con elevada morbilidad y mortalidad, caracterizada por fiebre elevada,



signos respiratorios, diarrea, abortos, caída en la producción de leche y muerte súbita (Goyal y Ridpath, 2005).

2.3.2 Infección subclínica

La mayoría de bovinos cursan un tipo de infección clínicamente irreconocible en la que se producen anticuerpos neutralizantes del suero, y el virus desaparece de los animales inmunocompetentes normales. Esto justifica el elevado porcentaje de animales normales que presentan una serología positiva frente al virus (Radostits *et al.*, 2002). En ocasiones aparecen manifestaciones clínicas leves y transitorias, que puede acompañarse de inapetencia durante unos días, decaimiento, diarrea leve, fiebre, descarga óculo nasal, leucopenia transitoria y se desarrollan anticuerpos neutralizantes 14 a 28 días post-infección y consecuentemente la curación y protección contra re-infecciones por cepas homologas del virus es de por vida (Lértora, 2003).

2.3.3 Infección fetal

Los efectos de la infección durante la etapa prenatal son variados, complejos y dependerán de la edad gestacional en la que se haya producido la infección (Lanyon *et al.*, 2013).

- Si la infección se da durante los primeros 18 días de gestación, mientras el embrión aún no se ha implantado, no se desarrollará una infección fetal.
- Antes de los 25 días, en la mayoría de los casos conducirá a la muerte embrio-fetal.
- La infección de la hembra a partir del día 30 y durante el primer trimestre de gestación puede ocasionar el nacimiento de individuos inmunotolerantes y con una infección persistente de por vida con vDVB.



- Una infección entre los 80 a 150 días ocasiona efectos teratógenos en el feto, entre ellos la atrofia del cerebelo, hidrocefalia, degeneración ocular, defectos esqueléticos y un posible retraso en el crecimiento, probablemente a consecuencia de una disfunción hipofisaria.
- El nacimiento de terneros normales seropositivos puede darse cuando la infección se da después de los 180 días de gestación (Lanyon *et al.*, 2013; OIE, 2015).

2.3.4 Infecciones persistentes

Las infecciones persistentes son provocadas por el contagio del feto con virus NCP durante el primer trimestre de gestación. Durante el desarrollo fetal el vDVB inhibe la inducción del interferón tipo I, permitiendo al virus sobrevivir en el hospedero. Estos animales son seronegativos al vDVB, no eliminan al virus del cuerpo y albergan grandes cantidades de virus en sus excreciones y secreciones como leche, semen, saliva, secreciones nasales, orina sangre, por lo tanto, estos individuos son el mayor reservorio del virus y una de las fuentes de mayor importancia de infección entre las poblaciones de ganado (Lanyon *et al.*, 2013).

2.3.4.1 Animales persistentemente infectados (PI)

Los animales PI constituyen un grupo importante para la perpetuación de las enfermedades en las poblaciones animales, por lo que son conocidos como los únicos reservorios naturales del virus. El ternero PI es portador del virus mientras vive es incapaz de adquirir una adecuada respuesta inmune contra el virus presente en el organismo y pueden desarrollar la enfermedad de las mucosas de curso fatal (Rivera, 2008). La infección persistente debe ser considerada en todo ternero pequeño al nacimiento, con escaso desarrollo, baja ganancia de peso y con cuadros



recurrentes de enfermedad respiratoria y digestiva. Otros son clínicamente normales, siendo indispensable el diagnóstico de laboratorio para determinar si son animales PI (Goyal y Ridpath, 2005).

En animales PI, el vDVB se localiza en nodos linfáticos, en células linfoides y del tracto gastrointestinal, pulmones, piel y cerebro; en el caso de cepas NCP se encuentran de manera significativa en sangre (OIE, 2015).

2.3.5 Complejo diarrea neonatal bovina

Cuando falla la transferencia pasiva de anticuerpos, el virus participa en el complejo diarrea neonatal de los terneros. Infecciones concurrentes con enteropatógenos resultan en manifestaciones clínicas más severas, debido al efecto inmunodepresor del vDVB o simplemente a una sumatoria de efectos (Goyal y Ridpath, 2005).

2.3.6 Enfermedad de las mucosas (EM)

La EM solo ocurre en animales PI que sufren sobreinfección con biotipos CP homólogos. Es una forma esporádica, fatal, de curso agudo o crónico y se caracteriza por severa leucopenia, erosiones y ulceraciones en el sistema digestivo (Ridpath, 2010). En esta enfermedad se aíslan ambos biotipos del virus. El biotipo CP surge de mutaciones del biotipo NCP, aunque también puede ser por una infección externa (Lértora, 2003).

La manifestación clínica se presenta cuando un animal que se ha infectado en vida intrauterina con el vDVB no citopático y está en la condición de PI. Los signos clínicos comprenden pirexia, anorexia, letargia, diarrea profusa con contenido de sangre fresca o coagulada, descarga nasal mucopurulenta y



deshidratación. La muerte ocurre generalmente después de dos semanas de iniciados los signos clínicos. La lesión más evidente es ulceración extensiva del tracto gastrointestinal (Murphy *et al.*, 1999).

2.3.7 Síndrome hemorrágico

Este síndrome se genera de la infección de los animales PI por el genotipo 2 del vDVB, en Estados Unidos y Canadá, se han reportado como severos, en estos casos se observa diarrea con sangre, epistaxis, congestión en conjuntiva y mucosas, hemorragias petequiales y equimóticas en mucosas, los animales muestran pirexia, leucopenia, linfopenia y neutropenia. Este síndrome ha sido asociado con infecciones por cepas NCP del genotipo 2 (Ridpath *et al.*, 2000).

Presenta una alta letalidad, independientemente de la edad, clínicamente se observa diarrea hemorrágica, fiebre, epistaxis, sangramiento de los sitios de inyección y una severa trombocitopenia, la cual al parecer es por un efecto directo del virus sobre las plaquetas circulantes (Bolin y Ridpath, 1992).

2.3.8 Complejo respiratorio

Esta descrito como una de las enfermedades más costosas para la industria ganadera a nivel mundial. Se describe como una entidad multifactorial en la cual los virus (Herpesvirus Bovino 1, Parainfluenza Bovina 3, Virus Sincial Respiratorio Bovina o vDVB) actúan como los agentes infecciosos primarios, generando lesiones de la mucosa y comprometiendo la integridad del tracto respiratorio, ocasionando a continuación una inmunosupresión y por lo tanto predisponiendo la colonización de las mucosas por bacterias que actúan como invasores secundarios agudizando la severidad del cuadro clínico. Las bacterias específicas que agravan el cuadro son: *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma*



bovis, *Pastuerella multocida*, *Histophilus somni* y *Tuerperella pyogenes*. Esta enfermedad se evidencia sobre todo en sistemas intensivos como el sistema de crianza artificial de terneros y los feedlot (Pécora *et al.*, 2017).

El vDVB origina inmunodepresión sistémica y pulmonar, aumentando la patogenicidad de otros agentes respiratorios (Goyal y Ridpath, 2005). Además, se ha demostrado que ciertos aislados del vDVB actúan como agentes primarios de neumonías (Lértora, 2003).

2.3.9 Trastornos reproductivos

La naturaleza insidiosa del virus ha llevado a grandes pérdidas económicas principalmente de origen reproductivo, reflejadas en las producciones de leche y carne. Estas pérdidas se relacionan con el aumento en el número de días abiertos, abortos, disminución en la calidad de semen, así como en los costos de tratamiento en animales enfermos y en las pérdidas en producción (Valle *et al.*, 2005). Puede provocar deficiencias en las tasas de fertilización, vacas repetidoras, abortos, malformaciones congénitas y el establecimiento de animales PI que eliminan el vDVB durante largos periodos de tiempo que se presentan en distintos tipos y grados, entre las que se describen más frecuentemente la hipoplasia o degeneración cerebelar, microcefalia, deformidades esqueléticas, retraso general del crecimiento, entre otras (Ridpath, 2003).

La infección aguda altera la función ovárica y reduce la fertilidad. El vDVB causa ooforitis intersticial no purulenta, con necrosis de células de la granulosa y de oocitos. Además, ocasionan un retraso en el desarrollo de los folículos pre-ovulatorios durante dos ciclos estrales consecutivos, reducción de



los niveles de estradiol durante la fase folicular y disminución o ausencia de las oleadas de hormona luteinizante (McGowan *et al.*, 2003).

El impacto del vDVB durante la preñez se divide en cuatro períodos, en base a las manifestaciones clínicas de la infección durante estos intervalos de tiempo específicos:

Etapa embrionaria (0–45 días): Las infecciones de hembras susceptibles próximas al momento del apareamiento ocasiona muerte embrionaria y repeticiones de servicio hasta que desarrollen respuesta inmune (McGowan *et al.*, 2003). Se desconoce cómo los biotipos NCP afectan al embrión, según Ridpath, (2003) el virus no tiene efecto sobre el crecimiento y desarrollo de los embriones hasta el día 8–9, momento en que pierden la zona pelúcida y se vuelven susceptibles. El resultado de la infección puede ser citolítico o no. Ambos terminan en muerte embrionaria, aunque la infección no citolítica también puede causar daño cromosómico, resultando en el desarrollo de malformaciones.

Día 45 a 125 de gestación: Comienza al finalizar la etapa embrionaria y culmina cuando el feto adquiere competencia inmunológica al vDVB. Durante este período también se produce muerte fetal con momificación o aborto meses después y un pequeño porcentaje de teratogénesis (Moennig & Liess 1995).

Día 125 a 175 de gestación: Este período representa el comienzo de la inmunocompetencia fetal y del estado de organogénesis, momento en el cual se presenta un gran porcentaje de alteraciones del desarrollo. También se pueden producir abortos, pero éstos son más frecuentes en las etapas tempranas de gestación. Se pueden observar distintos tipos y grados de malformaciones tales como hipoplasia cerebelar, microencefalia, hipomielogénesis, hidrocefalia, atrofia



o hipoplasia de timo, cataratas, microftalmia, degeneración de retina, hipoplasia y neuritis del nervio óptico, alopecias, hipotricosis, hipoplasia pulmonar, braquignatismo, artrogriposis, retraso general del crecimiento y deformidades esqueléticas. Posibles explicaciones de estas malformaciones serían el daño celular directo por el virus o la destrucción de las células infectadas por el sistema inmune fetal. (Moennig & Liess 1995).

175 días de gestación en adelante: En esta etapa el feto se encuentra en un período de crecimiento general y es inmunológicamente competente. Las infecciones en este período resultan en el nacimiento de terneros seropositivos normales o débiles; mientras que los abortos son ocasionales (Moennig & Liess 1995).

2.3.9.1 Efecto del virus sobre la fertilidad

Las vacas seronegativas que reciben semen de toros PI se reconvierten dos semanas después de la inseminación o monta. Los toros PI son generalmente infértiles o producen semen de calidad reducida. La eliminación del virus en el semen de toros con infección aguda se extiende más allá del periodo de viremia, como consecuencia de la replicación local en vesículas seminales y próstata. La infección experimental de novillas produce ovaritis prolongada, lo que conlleva a una disfunción ovárica (Ramírez et al., 1999).

2.3.9.2 Malformaciones

El vDVB es capaz de cruzar la placenta, así como la barrera hematoencefálica fetal, produciendo diversas lesiones en el sistema nervioso central (principalmente cerebelo); la severidad en las lesiones se



incrementa con la edad del feto al momento de la infección. También se ha reportado deformación esquelética (miembros posteriores, frontales doblados, braquignatismo mandibular, alopecia y anomalías en cabeza y mandíbula) (Lértora, 2002).

2.4 ASPECTOS INMUNOLÓGICOS

El vDVB es un patógeno con capacidad de supervivencia en la población bovina utilizando dos estrategias, una de ellas conocida como «choque y fuga» donde el virus ocasiona infecciones agudas, pero con respuesta inmunitaria humoral y celular, aunque de un modo lento, induciendo protección contra nuevas reinfecciones; y la otra estrategia es a través de las infecciones persistentes donde el virus establece inmunotolerancia específica. También ocasiona leucopenia y altera las funciones de los leucocitos, aumentando la patogenicidad de microorganismos coinfectantes (Lértora, 2003). Tiene una fuerte afinidad por el tejido linforreticular, ocasionando necrosis y atrofia de dichos tejidos (Lértora, 2003; Goyal y Ridpath, 2005).

Se ha demostrado que el biotipo NCP induce en animales, experimentalmente, una respuesta primaria de anticuerpos significativamente más rápida y superior que su biotipo homólogo CP, indicando que esta es dependiente del biotipo de la cepa envuelta (Lambot *et al.*, 1997).

El vDVB y en general todos los pestivirus, muestran especial tropismo por las células del sistema inmunitario ocasionando una disminución en la blastogénesis de los linfocitos B y T, entre la 6^a a 8^a semana post infección se observa un incremento de linfocitos T CD4⁺ indicando que la inmunosupresión es pasajera. En estudios acerca de la depleción linfocítica causada por vDVB, se pudo indicar un papel importante de las células T CD4⁺ pero no de células T CD8⁺, lo cual indica una actividad citotóxica



restringida del complejo mayor de histocompatibilidad, clase II de las células T. Se ha sugerido que las células T CD4+ juegan un papel decisivo en el establecimiento de la memoria inmune al vDVB (Lambot *et al.*, 1997).

La inmunización con virus vivos o inactivados desencadena la producción de anticuerpos contra numerosas proteínas vírales y se han relacionado algunas proteínas, E2 y NS3, como inmunodominantes (Bolin, 1995).

La infección post natal de un animal inmunocompetente con el vDVB NCP resulta en una infección aguda pero leve. La infección activa la respuesta inmunitaria, detectándose niveles de interferones IFN- α/β en el suero, viremia pasajera, presencia de virus en las secreciones y leucopenia, desapareciendo entre 12 a 14 días post infección (Charleston *et al.*, 2002).

Otros factores inmunosupresores incluyen quimiotaxis reducida, liberación de un inhibidor de la actividad de la IL-1, disminución de la secreción de inmunoglobulinas, supresión de las respuestas proliferativas de células mononucleares bovinas frente a sustancias blastogénicas y alteración de la función neutrofílica. Infecta preferentemente linfocitos T CD8+ e interfiere en sus funciones citotóxicas e inmunoreguladoras (Tizard, 2002).

2.5 DIAGNOSTICO

La adecuada implementación de pruebas de diagnóstico es la clave para los programas de control y erradicación de vDVB, siendo de vital importancia la identificación y eliminación de animales PI (Labanda, 2015). El diagnóstico para el vDVB está basado en métodos de laboratorio como aislamiento viral, métodos serológicos para la detección de antígenos virales o anticuerpos contra el virus y detección de ácido nucleico (Morales, 2002).



Por un lado, los diagnósticos de vDVB se realizan por dos razones. La primera razón es para identificar si el virus es la causa o parte de un problema clínico que ha sido identificado. Se dispone de una variedad de ensayos para identificar al virus en sangre o hisopados tomados de animales enfermos o muestras de tejido tomadas en necropsia. El segundo uso de los ensayos de diagnóstico del vDVB y el más importante en un programa de control del virus es para la identificación de bovinos PI. Mediante la identificación y eliminación de los animales PI, el riesgo de transmisión del vDVB dentro y entre los establecimientos se reduce significativamente (Pecora *et al.*, 2017).

Las técnicas disponibles para el diagnóstico de la diarrea viral bovina:

2.5.1 Aislamiento viral cultivos celulares

Esta técnica permite detectar virus infecciosos en muestras clínicas (Pecora y Perez, 2017). El virus puede aislarse en cultivos monocapa de células bovinas tanto renales, pulmonares, testiculares y de los cornetes nasales, siendo el único método para determinar el biotipo del virus. Sin embargo, es un método laborioso, que demanda altos costos, tiempo, y requerimientos específicos para evitar que el diagnóstico se vea afectado por concentraciones muy bajas del virus y anticuerpos contra el mismo. Por estas razones se imposibilita el procesamiento simultáneo de numerosas muestras dentro de los laboratorios (Lanyon *et al.*, 2013; OIE, 2015).

2.5.2 ELISA: (Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas)

Es una técnica que usa antígenos o anticuerpos enlazados con una enzima, la misma que al interactuar con un sustrato determinado generara un producto detectable ya sea por cambios de color a simple vista o por espectrofotómetro (Labanda, 2015).



Esta técnica permite evaluar el estado inmunológico e identificar infecciones agudas en el rebaño. La detección de antígenos mediante la técnica de ELISA es un método simple y rápido para la identificación de animales PI, y en comparación con otros métodos como aislamiento viral, se ha reportado una sensibilidad entre 67 a 100% y una especificidad de 98,8% al 100% (Lanyon *et al.*, 2013). Se debe tener en consideración que los ELISA desarrollados con el antígeno de un genotipo del vDVB podrían no ser eficientes detectando antígenos inducidos por otro genotipo, por tanto, las pruebas realizadas con este método deben escogerse en función de las cepas circulantes en cada país (OIE, 2015).

La detección de anticuerpos es el método diagnóstico más común, aunque de menor utilidad en hatos o en zonas donde se usa la vacunación contra diarrea viral bovina. En serología, el método estándar de oro es la neutralización viral y actualmente existen numerosas técnicas de ELISA en formato de kits. Las ELISAs son ideales como técnicas de tamiz para trabajar un gran número de muestras. La leche de tanque o porongo para detectar virus o anticuerpos contra el vDVB es adecuada para identificar hatos infectados con presencia de animales PI (Rivera, 2008).

2.5.3 Inmunohistoquímica (IHQ)

La inmunohistoquímica permite identificar antígenos del vDVB en cortes de tejido, permitiendo relacionar de manera exacta el antígeno viral, el tipo de células y las lesiones histológicas. En el caso de animales PI se puede partir de casi cualquier tejido fijado en formalina y embebido en parafina. Sin embargo, se han observado mejores resultados en tejidos de ganglios linfáticos, piel, glándulas, tiroides, abomaso, encéfalo y placenta (Lanyon *et al.*, 2013; Labanda, 2015; OIE, 2015). Esta técnica a pesar de presentar buenos resultados, está sujeta a ciertas

desventajas, entre ellas su laboriosidad, y la necesidad de personal con gran experiencia dado que está sujeta a errores técnicos y su sistema de evaluación es subjetivo (Lanyon *et al.*, 2013).

2.5.4 Reacción en cadena de polimerasa

Parte de una secuencia de ADN molde para generar de forma quasi-exponencial millones de copias de la misma; mediante una amplificación enzimática y repetidos ciclos de síntesis (Green & Sambrook, 2012).

Cada ciclo de síntesis se compone de tres fases que son:

- **Desnaturalización:** Consiste en la separación de la doble hélice de ADN para que la polimerasa inicie la síntesis de las copias de la cadena molde.
- **Alineamiento:** una vez separada la doble cadena de ADN, los cebadores, que son complementarios a la secuencia blanco formarán uniones o quedarán alineados con esta en la zona complementaria, formando regiones pequeñas de cadena doble.
- **Extensión:** Se inicia la síntesis del ADN en el extremo 3' de los cebadores alineados con la cadena molde, a la temperatura en la cual la polimerasa es más activa, la elongación se realiza en sentido 5' a 3', en donde la polimerasa incorpora los DNTP's que se encuentran en el medio. Este proceso se repite entre 25 a 35 veces dentro de un termociclador, el cual controla el tiempo y la temperatura de cada ciclo (Green & Sambrook, 2012).

2.5.5 RT- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real).

Es uno de los métodos más sensibles para el diagnóstico y detección de virus de ARN. Presenta ventajas frente a otros métodos por su alta sensibilidad y el menor tiempo requerido para su realización, presentando límites de detección



tan bajos como 1000 y 100 copias para vDVB tipo 1 y 2 respectivamente. Sin embargo, puede originar resultados falsos positivos (Labanda, 2015; Lanyon *et al.*, 2013; Morales, 2002; OIE, 2015).

2.6 EPIDEMIOLOGIA

2.6.1 Prevalencia de la infección

El vDVB se encuentra ampliamente distribuido en el mundo entero; sin embargo, la considerable variación de las prevalencias, tanto de animales seropositivos como de animales portadores o PI, se deberían a las diferencias entre los sistemas de manejo y al tamaño de los hatos de cada localización (Lindberg, 1999).

En aquellos lugares donde las explotaciones presentan altas densidades poblacionales, suelen presentar las mayores prevalencias (Houe, 1999). La mayoría de las encuestas en los diferentes países alcanza niveles de 0,5 a 2 % de bovinos persistentemente infectados (PI) y de 60 a 80 % de bovinos seropositivos (Hamers *et al.*, 2000). En algunos países de Sudamérica como Brasil, Argentina, Colombia y Chile se reporta prevalencias con variaciones entre regiones, pero con tasas superiores al 70% (Rivera, 2008).

En el Perú, estudios realizados por investigadores de la FMV-UNMSM ha determinado una amplia distribución del vDVB en las cuencas lecheras, con prevalencias superiores al 70% (Contreras *et al.*, 2000).

2.6.2 Hospedador

Los bovinos son el hospedero principal del vDVB; sin embargo, puede llegar a infectar otro tipo de animales como ovejas, cabras y cerdos (APHIS, 2007).



2.6.3 Fuentes de infección

Existen varias fuentes de infección, pero la principal fuente de infección y reservorio del virus en la naturaleza son los bovinos PI. Estos animales pueden infectar al 90% de los animales con los que conviven en un periodo de 3 a 4 meses. Es probablemente el método mas importante de transmisión de la DVB; aunque estudios de campo han demostrado que algunas infecciones también pueden producirse en ausencia de animales PI por contacto indirecto: moscas, fómites, semen, contacto con otras especies infectadas con el vDVB, etc. (Radostits *et al.*, 2002; Lértora, 2003).

Los bovinos PI eliminan continuamente durante toda su vida grandes cantidades de virus en secreción nasal, saliva, orina, materia fecal, lagrimas, semen y leche. Los animales con infección aguda también son fuentes de infección, aunque menos eficientes, ya que eliminan el virus en cantidades más bajas y por cortos periodos (4 a 10 días) (Radostits *et al.*, 2002).

2.6.4 Modos de transmisión

2.6.4.1 Transmisión vertical

La infección transplacentaria ocurre en hembras susceptibles infectadas durante la preñez. Si el feto es infectado por biotipos NCP antes de adquirir competencia inmunológica (antes de los 125 días de gestación, aproximadamente) desarrolla una infección persistente. Pese a la elevada tasa de mortalidad de los animales PI en su primer año de vida (más de 50 %) muchos alcanzan la madurez sexual y se reproducen hembras PI siempre dan terneros PI. La transmisión vertical también ocurre luego de la transferencia de embrionaria si el recipiente es PI, o la vaca donante es PI y no se realiza el correcto lavado del embrión (Lértora, 2003).



El éxito de la infección fetal depende de la virulencia de la cepa del vDVB y la edad del feto al momento de la infección (Costable *et al.*, 1993).

- Si la infección del feto ocurre durante la gestación temprana: En animales gestantes que no han tenido previo contacto con el virus y que en condiciones naturales se infectan por vía respiratoria u oral, después de un periodo de incubación de 5-7 días presentan un leve incremento de la temperatura que pasa desapercibido y una profunda leucopenia de corta duración, con una viremia que puede persistir hasta por 15 días, en esta fase el virus atraviesa la placenta e infecta todos los tejidos fetales. Antes de los 60 días de gestación, puede causar reabsorción fetal, muerte embrionaria y aborto, lo cual se observa cuando la vaca regresa rápidamente en celo (Costable *et al.*, 1993). La muerte embrionaria temprana puede sobrevivir, presentándose en el primero de los casos un periodo entre estros normales y en el segundo un incremento de este intervalo. La muerte fetal puede sobrevivir en cualquier periodo originario, abortos o momificación cuando el feto es retenido (Bewoo *et al.*, 2007).
- Si la infección ocurre entre los 60 y 100 días de gestación: En fetos inmunotolerantes, el virus ocasiona interferencia en el crecimiento, diferenciación y maduración de sus tejidos, situación que no es causada por insuficiencia placentaria si no debido a su sistemática multiplicación en los tejidos causando un retardo en crecimiento intra y extra uterino. Estos animales pueden ser más pequeños de talla y peso y su curva de crecimiento es sensiblemente menor que la de los



animales sanos y además pueden llegar a desarrollar la enfermedad de las mucosas. (Bewoo *et al.*, 2007).

- Cuando la infección ocurre entre los 100 a 150 días de gestación: Puede provocar el nacimiento de terneros débiles con alteraciones congénitas, hipoplasia cerebelar, lesiones oculares como degeneración de la retina e hipoplasia, neuritis del nervio y atrofia de la retina (Bewoo *et al.*, 2007).
- Si la infección ocurre luego de los 150 días: cuando el sistema inmune se encuentra desarrollado no se produce aborto y el animal es capaz de producir anticuerpos contra el vDVB. Estos animales nacen sanos y no son portadores del virus (Lértora, 2003).

2.6.4.2 Transmisión horizontal

En la transmisión horizontal (infección postnatal), el virus infecta a un animal a través de la inhalación o ingestión de productos contaminados con saliva, secreciones óculo-nasales o uterinas, leche, semen, heces, orina y sangre procedentes de animales infectados. También, los animales se pueden infectar con la administración parenteral de productos biológicos contaminados con el virus, principalmente vacunas, picaduras de insectos hematófagos, empleo de agujas hipodérmicas contaminadas, palpación rectal, inseminación e implantación de embriones procedentes de animales infectados (Goyal y Ridpath, 2005).

El semen de toros PI con infección aguda es una importante vía de transmisión horizontal. Por tal motivo en los centros de inseminación se



debe recurrir al aislamiento viral y a un periodo de cuarentena que supere la fase aguda de la infección (Bautista, 2011).

2.6.4.3 Transmisión entre hatos

La principal forma de introducir el virus a un hato susceptible es a través de la adquisición de bovinos PI o de hembras que transportan fetos PI. Otras vías de introducción son el: uso de vacunas vivas, semen contaminado, cohabitación con bovinos, transferencia embrionaria y el contacto con bovinos con infección aguda (Houe, 1999).

2.6.4.4 Transmisión dentro del hato

Depende de la forma de introducción del virus al mismo. Cuando un animal PI es introducido a un rebaño, la transmisión a animales susceptibles ocurre rápidamente a la mayoría de los animales del rebaño. Cuando la infección se inicia por un bovino con infección aguda o por alguna otra vía que inicie una infección aguda, la transmisión es de corta duración y solo incluye un pequeño porcentaje del rebaño antes que la transmisión cese. El sistema de producción y la virulencia de la cepa también participan en la tasa de transmisión. La diseminación es más eficiente en sistemas de producción que permiten un estrecho contacto entre animales y con cepas virulentas (Lértora, 2003).

2.7 PREVENCIÓN Y CONTROL

Desde hace varios años, muchos países europeos han implementado estrategias para el control y erradicación del vDVB, tales como Italia, Suecia, Países Bajos, Alemania, Australia; entre otras muchas regiones de Europa. Estos programas han



demostrado ser rentables, ya que fueron basados en investigaciones epidemiológicas de la misma zona (Lértora, 2003; Rivera, 2008).

Los estudios epidemiológicos locales, son muy importantes como base para la selección de una estrategia de control; debido a la variación en la epidemiología entre las diferentes zonas geográficas, así como los sistemas de manejo; por lo que la implementación de programas debe basarse en estudios epidemiológicos realizado en las mismas condiciones en las que el programa va a ser aplicado (Lértora, 2003).

Las estrategias de erradicación dependen de la seroprevalencia, uso de vacunas, densidad poblacional y practica de manejo. En explotaciones no infectadas, sin animales seropositivos, lo más importante es evitar el ingreso del virus a través de un estricto programa de bioseguridad, mientras que en condiciones de alto riesgo podría recurrirse a la vacunación. El uso masivo de vacunas en algunos países por más de cuatro décadas, no ha logrado la reducción de la prevalencia de la DVB (Rivera, 2008); es por eso que en hatos infectados con una alta seroprevalencia, una vacunación extensa es considerada innecesaria y cara (Rivera, 2008).

En el Perú no existe un programa de control para el vDVB; tan solo se aprecia interés de algunos ganaderos de las principales cuencas lecheras, que utilizan voluntariamente la vacuna como estrategia de control, más que de control sistemático (Rivera, 2008).

Una verdadera estrategia de control y erradicación del vDVB en áreas de alta prevalencia requiere la implementación de programas de control como: detección y remoción de animales PI, métodos de diagnóstico estandarizados, evaluación periódica del estatus de los hatos y finalmente la concientización de los criadores y comerciantes.



Todo esto apoyado por las regulaciones oficiales que controlen las vías de transmisión y que coordine la erradicación en todos los rebaños de una región (Bautista, 2011)

2.7.1 Vacunas

La vacuna para el control del vDVB es una herramienta ampliamente utilizada en muchas regiones del mundo, de la que hay múltiples presentaciones disponibles.

Los dos objetivos primordiales para la utilización de vacunas contra el vDVB son:

- Generar una cobertura inmunitaria poblacional que limite el impacto de la diseminación de la infección por vDVB en el rodeo y que reduzca la severidad de los signos clínicos.
- Impedir la transmisión vertical del vDVB, evitando así la generación de animales PI.

En el mercado hay formulaciones registradas que contienen vDVB (Registro de Biológicos, SENASA). La mayoría está constituida por cepas de referencia de vDVB del subgenotipo 1A y en algunos casos incluyen vDVB de genotipo 2. A su vez, estas vacunas pueden ser acuosas u oleosas. El tipo de adyuvante no afecta la eficacia de la formulación (Pécora *et al.*, 2017).

2.7.1.1 Vacuna a virus vivo modificado

La vacuna del virus vivo modificado contra la diarrea viral bovina, está asociada a una gran variedad de efectos adversos tales como la inducción de la enfermedad de las mucosas, infección fetal e inmunosupresión, pueden potenciar infecciones recurrentes, resultando en



un incremento en la incidencia de enfermedades respiratorias (Potgieter, 1995).

La vacuna a virus vivo modificado (MLV), usualmente contiene un solo biotipo de virus de la DVB citopatógeno. Los biotipos citopáticos usados comúnmente son vDVB, NADL y vDVB- Singer, vDVB-C24V. Las ventajas de uso de una vacuna MLV para controlar la DVB radican en que estas estimulan una rápida respuesta inmune y la protección se establece muy fácilmente dentro de 3 semanas post vacunación, se detecta anticuerpos en suero y ya neutraliza al vDVB. La duración de los anticuerpos en suero post vacunación con MLV, es similar a la provocada por infección natural, permaneciendo en esto en altos niveles por más de un año y persisten por varios años. Sin embargo, en algunos animales los anticuerpos neutralizantes contra el vDVB desaparecen dentro de dos años post vacunación (Bolín, 1995).

Además de ser menos costosas, las desventajas asociadas a MLV, están asociadas al fracaso en la inmunización por falla en el almacenamiento o manipulación lo cual puede provocar una enfermedad postnatal producto de la reactivación de la virulencia del virus; además, existe el riesgo de contaminación de las líneas celulares y suero fetal bovino. Estas fallas están asociadas con enfermedad de las mucosas y fracasos reproductivos asociados al virus. Las enfermedades de las mucosas ocurren de 1 a 4 semanas post vacunación. Por ello, la vacuna MLV no es recomendado para hembras preñadas ya que pueden ocasionar aborto (Bolín, 1995).



2.7.1.2 Vacuna Inactivada

La ventaja del uso de este tipo de vacunas está relacionada a las desventajas del uso de las vacunas MLV; sin embargo, la desventaja de este tipo de vacuna inactivada está relacionada con la necesidad de usar 2 dosis de vacuna y esto a su vez retrasa el tiempo necesario para que se establezca una inmunidad protectora. (Bolín, 1995).

2.7.1.3 Programas de erradicación

En cuanto a la erradicación de la enfermedad, algunos países han instaurado programas basados en el control sistemático sin vacunación y el control sistemático con vacunación (Houe *et al.*, 2006).

El control sistemático sin vacunación, consiste en la identificación y eliminación de animales PI, seguido de un monitoreo continuo del hato, mediante la realización de pruebas diagnósticas para confirmar su estatus libre o para detectar nuevas infecciones (Lindberg *et al.*, 2006). En este programa también se implementan medidas de bioseguridad como el control en el desplazamiento de animales entre fincas, la realización de cuarentenas para animales nuevos que ingresen a las fincas, uso de semen certificado libre de la enfermedad, control en el ingreso del personal al hato, entre otras (Lindberg *et al.*, 2006). Este esquema se comenzó a implementar desde la década de los noventa en los países de la región escandinava (Dinamarca, Finlandia, Noruega, Suecia) donde en su mayoría hay declaración de erradicación de la enfermedad (Valle *et al.*, 2005). Posteriormente, las islas Shetland implementaron este programa donde también se declaró la erradicación del vDVB (Sandvik, 2004).



Para un control eficiente de la enfermedad es importante que la vacunación confiera altos niveles de protección para la madre y para el feto; así mismo, que la vacuna proteja contra los dos genotipos del vDVB (Kelling, 2004). Entre los protocolos vacúnales empleados se ha sugerido una primera vacunación con una vacuna inactivada y 4 semanas después una revacunación con una vacuna a virus modificado; esto con el fin de generar una eficiente inmunidad humoral y celular, así como también desarrollar protección fetal (Moennig *et al.*, 2005).

5.8 ANTECEDENTES

En la comunidad de Silly, provincia de Canchis departamento de Cusco; se obtuvieron suero sanguíneo de 38 bovinos hembras adultas, y que mediante la prueba de neutralización viral se determinó la seropositividad a la DVB. El $73.7 \pm 13.9\%$ de los bovinos presentaron anticuerpos contra la DVB (Álvarez, *et al.*, 2002). Asimismo, en un estudio en la provincia de Calca, donde se colectaron muestras de sangre de 66 bovinos adultos aparentemente normales, para la detección de anticuerpos contra el vDVB; mediante la prueba de neutralización viral. El 90.0% de los bovinos resultaron positivos a la prueba (Cabellos *et al.*, 2006).

En el valle de Lima, se colectaron muestras de sangre a bovinos productores de leche bajo crianza intensiva, a hembras mayores de 6 meses (n=311) procedentes de 12 hatos sin antecedentes de vacunación contra la enfermedad de la DVB, para la detección de anticuerpos mediante la prueba de neutralización viral. El $56.0 \pm 5.5\%$ (174/311) de las muestras presentaron anticuerpos contra el vDVB (Aguilar *et al.*, 2006).

En la Irrigación de Majes, provincia de Caylloma, Arequipa; se realizó un estudio en 286 muestras de suero sanguíneo, el 47.20% (135/286) tuvieron anticuerpos contra el vDVB (Huamán *et al.*, 2006).



En la provincia de Melgar, Puno; se colectaron muestras de sangre de 347 vacunos criollos de crianza extensiva entre machos y hembras mayores a seis meses de edad para la detección de anticuerpos mediante la prueba de neutralización viral. El $48.7 \pm 0.1\%$ (166/347) de los animales presento anticuerpos contra el vDVB. Se detectó en animales de todos los distritos con prevalencias entre 15.7 a 94.1 % (Quispe *et al.*, 2008).

En la provincia de San Pablo, Cajamarca; se colectaron muestras de sangre en bovinos criollos de crianza extensiva sin historial de vacunación (n=385). La detección de anticuerpos contra el vDVB se realizó mediante la prueba de neutralización viral. El $27.1 + 4.4\%$ (104/385) de los bovinos resulto positivo contra el vDVB, distribuidos en los tres grupos etarios (Herrera *et al.*, 2009).

En la microcuenca Ccanipia, provincia de Espinar, Cusco; se colectaron muestras de sangre de 406 animales para la detección de anticuerpos contra el vDVB, donde se determinó una prevalencia de $56.2 \pm 4.8\%$ (228/406) (Cárdenas *et al.*, 2011).

En el departamento de Ayacucho, al sur este de la provincia de Huamanga; en bovinos de crianza extensiva de las cuencas ganaderas de los distritos de Chiara, Vinchos, Socos en la provincia de Huamanga, y de los distritos de Chuschi y Los Morochucos en la provincia de Cangallo, se determinó la seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina mediante la prueba de ELISA indirecto. Se obtuvieron muestras de sangre de 385 animales, sin historial de vacunación, mayor a 6 meses, provenientes de pequeños y medianos criadores. El $75.3 \pm 4.3\%$ (290/385) de los animales presentaron anticuerpos contra el vDVB, distribuidos en todos los grupos de edad. El porcentaje de hembras seroreactoras fue de $75.3 \pm 4.3\%$ (281/373) mientras que en los machos el $75 \pm 4.3\%$ (9/12) resulto seropositivo. Todos los distritos presento prevalencias entre 67.27% a 86.21% (Bautista, 2011).



En el Centro Experimental Chuquibambilla de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, se eligieron 90 vacunos hembras de las razas Brown Swiss, Charoláis y Aberdeen Angus, los resultados muestran una seroprevalencia de $34,44 \pm 0,098$ %; el % de seropositivos al vDVB en la raza Charoláis fue de 16,67%, Brown Swiss de 15,56% y Aberdeen Angus de 2,22% (Soto, 2018).

En tres comunidades del distrito de Taraco, se tomaron muestras de sangre de 90 vacunos de la raza Brown Swiss. La seroprevalencia general fue de 68.89%, según edad en adultos se observó una mayor seroprevalencia (83.60%) que en animales jóvenes (37.93%), según sexo en machos se observó una mayor seroprevalencia (70%) que en hembras (21.05%) y según estado reproductivo para vacas preñadas en seca fue de 93.33% y para vacas preñadas en producción 86.67%, y según estado productivo para las vacas vacías en producción fue de 87.50% y para vacas vacías en seca 66.67% (Quispe, 2018).

En el distrito de Paucarcolla - Puno; se muestrearon 91 vacunos de la raza Brown swiss para determinar la seroprevalencia de la diarrea viral bovina que fue de 60.44 %; según sexo (macho y hembra) 33.33 % y 41.18% respectivamente, no existiendo diferencia estadística ($P \geq 0.05$); para la edad (< de 2 años y > de 2 años) fue de 37.93% y 70.97%, mostrando una diferencia estadística ($P < 0.05$); estado reproductivo (preñadas en producción y en vacías sin producción) fue de 75% y 73.33%, no existiendo diferencia estadística ($P \geq 0.05$) y finalmente el estado productivo (vacías en producción y preñadas sin producción) fue de 75% y 60%, no existiendo diferencia estadística ($P \geq 0.05$) (Choquenaira, 2018).

En el distrito de Vilque provincia de Puno; se determinó la seroprevalencia del virus de Diarrea Viral Bovina (vDVB) en 90 vacunos de la raza Brown swiss y obtuvo



65.56% (59/90); según sexo en machos 45.45% y en hembras 52.94%, los cuales no mostraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$); según edad los animales menores de 2 años reflejaron 50.00% y en mayores de 2 años de 72.58% en los que si se observó diferencias significativas ($P < 0.05$); según estado reproductivo fue de 64.29% para las vacas preñadas en seca y 83.33% para las vacas preñadas en producción; y según estado productivo fue de 81.25% para vacas en lactación y 57.14% para las vacas en seca (Huaylla, 2018).



CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se realizó en el distrito de Pomata, provincia de Chucuito de la región Puno, a unos 104 km de la ciudad de Puno, situada en la orilla suroeste del lago Titicaca y al sur limita con los distritos de Huacullani y Zepita. Se encuentra a 3863 m.s.n.m., se encuentra al sur del territorio peruano.

3.2 POBLACIÓN

La población aproximada es de 4617 vacunos mejorados de la raza Brown Swiss, la razón principal de la crianza de ganado vacuno mejorado es para la producción de leche para su posterior comercialización (Minagri, 2010).

Unidades de muestreo: Vacunos reproductores pertenecientes a la cuenca lechera del distrito de Pomata.

- Vacunos menores a 2 años.
- Vacunos mayores a 2 años.

Unidades de análisis: Son las muestras de sangre, de las cuales se usó la fracción sérica.

3.2.1 Tamaño de muestra

Para hallar el tamaño de muestra se utilizó el método de muestreo al azar estratificado, considerando una prevalencia referencial de 94% (Quispe et al., 2008) con un nivel de confianza del 95% y un error de precisión de 5 %, mediante la siguiente fórmula (Miranda, 1987).

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

Dónde:

n = Tamaño de la muestra,

Z = 1,96 para el 95% de confianza.

p = Frecuencia esperada del factor a estudiar (Quispe et al., 2008).

q = 1 - p

d = Precisión con la que se generaliza los resultados, margen de error (5%).

$$n = \frac{(1.96)^2(0.94)(0.06)}{(0.05)^2}$$

n = 86.67 ---- 87 muestras.

Aplicando la formula se determinó que el tamaño de muestra fue de 87 vacunos.

3.3 DISTRIBUCIÓN

Tabla 1: Distribución de vacas para la prueba serológica de diarrea viral bovina mediante ELISA.

Sexo	Hembra	Macho	hembra > a 2 años			
Edad	(<) a 2 años	(<) a 2 años	(>) a 2 años	(>) a 2 años	(>) a 2 años	(>) a 2 años
Estado Reproductivo	Hembra Joven	Macho Joven	Preñada en producción	Vacía sin producción	Vacía en producción	Preñada sin producción
N° de Animales	18	11	17	14	13	14
Sub total	29		58			
Total	87					



3.4 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.4.1 Materiales

Para el trabajo de recolección de muestras se utilizaron lo siguiente:

- Tubos al vacío (sistema vacutainer)
- Agujas N° 20 de ½ pulgada
- Caja de Tecnopor térmico
- Viales
- Lapicero y formato para identificar a los animales

Para el trabajo de laboratorio se emplearon los siguientes materiales:

- Micropipetas de precisión de 0-100 y 100-1000 μ L.
- Pipetas Pasteur.
- Agua desionizada
- Papel de aluminio
- Papel toalla
- Cronometro
- Termómetro

3.4.2 Equipos

- Incubadora
- Refrigeradora
- Centrifuga
- Baño maría
- Lector de ELISA

3.4.3 Reactivos

Tabla 2: Contenido del Kit ELISA (IDEXX BVDV Total Ab)

Item	Reactivos	Volumen
1	Placa tapizada con antígeno vDVB	5 unidades
2	Control Positivo	1 x 1,0 mL
3	Control Negativo	1 x 1,0 mL
4	Conjugado	1 x 60 mL
5	Diluyente de la muestra	1 x 60 mL
A	Substrato TMB n.º12	1 x 60 mL
B	Solución de Frenado n.º3	1 x 60 mL
C	Solución de lavado concentrada (10X)	1 x 480 mL

Fuente: Laboratorio IDEXX.

3.5 MÉTODO

3.5.1 Obtención de las muestras sanguíneas

Se registró e identificó a los animales según sexo y categoría, las muestras fueron colectadas por punción venosa (vena yugular) en tubos al vacío sin anticoagulante a 87 vacunos, se obtuvo aproximadamente de 5 a 8 ml y seguidamente se llevó las muestras a un cuarto facilitado por los productores, donde se centrifugó a 3500 rpm por un lapso de 5 minutos, con el fin de separar el suero sanguíneo, para luego aislarlo en viales de 2ml y finalmente se trasladaron las muestras a una temperatura de 5-8 °C al C. E. Chuquibambilla (Laboratorio de Salud Animal), y conservados a -20°C hasta el momento de su análisis.

3.5.2 Análisis serológico

3.5.2.1 Prueba de ELISA para el virus de la diarrea viral bovina

Las muestras se analizaron con la técnica ELISA indirecta, donde se utilizaron placas de microplacas tapizadas con antígeno de vDVB; para la detección de anticuerpos generados por el organismo contra el virus vDVB, el material no ligado se elimina mediante lavado.



Se formó el complejo antígeno – anticuerpo durante el proceso se detectó mediante la unión al conjugado de la peroxidasa, el resto del conjugado se elimina mediante el lavado de la placa y se añadió una solución de sustrato (cromógeno), la unión de la enzima al sustrato se convierte en un producto que reacciona con el cromógeno generando una coloración azul; posteriormente para detener la reacción del cromógeno se añadió la solución de Frenado para detener al medio cromógeno y según protocolo (IDEXX - vDVB) se mide la absorbancia con un lector de ELISA a una longitud de onda única de 450 nm.

Procedimiento de la prueba ELISA

- a) En las placas tapizadas se rotulo la posición de las muestras.
- b) Añadir 100 ul de diluyente de la muestra en cada pocillo.
- c) Añadir 25 ul de control negativo (CN) en dos pocillos.
- d) Añadir 25 ul de control positivo (CP) en dos pocillos.
- e) Añadir 25 ul de las muestras en los pocillos restantes.
- f) Homogenizar el contenido de los pocillos.
- g) Incubar durante 90 minutos (+- 5 minutos) a 18 - 26 °C.
- h) Eliminar el contenido liquido de cada pocillo y lavar cada pocillo con aproximadamente 300 ul de Solución de Lavado 5 veces.
- i) Dispensar 100 ul. de conjugado en cada pocillo.
- j) Incubar durante 30 minutos (+- 2 minutos) a 18 – 26 °C.
- k) Repetir el paso h)
- l) Dispensar 100 ul de sustrato TMB n.º12 en cada pocillo.
- m) Incubar 10 minutos (+- 1 minuto) a 18 – 26 °C.
- n) Dispensar 100 ul solución de frenado n.º3 en cada pocillo.

- o) Medir y anotar la absorbancia de las muestras y controles a 450 nm.
- p) Realizar los cálculos según protocolo (IDEXX)

Controles

$$CN_x = \frac{CN1 A(450) + CN2 A(450)}{2} \qquad CP_x = \frac{CN1 A(450) + CN2 A(450)}{2}$$

Criterio de validación.

$$CN_x \leq 0,250$$

$$CP_x: CN_x \geq 0.150$$

Muestra

$$M/P = \frac{Muestra A (450) - CN_x}{CP_x - CN_x}$$

- q) Interpretación en muestra de suero

Negativo	Dudoso	Positivo
$M/P < 0,20$	$0,20 \leq M/P < 0,30$	$M/P \geq 0,30$

3.6 ANÁLISIS DE DATOS

3.6.1 Estimación de la seroprevalencia

La seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina, se determinó mediante la siguiente formula (Thursfield, 1990).

$$P = \frac{\text{numero de positivos}}{\text{total de muestreo}} * 100$$

3.6.2 Método estadístico

Los datos de los variables en estudio, fueron analizadas a través de la prueba de significancia de Chi – Cuadrado, considerando el sexo, edad, estado reproductivo y productivo, para lo cual se utilizó la siguiente formula:

$$X^2 = \sum \frac{(O_i - e_i)^2}{e_i}$$



Dónde:

X_C^2 = Valor calculado de Chi - Cuadrado.

Σ = Signo sumatorio.

O_i = Valor observado de casos positivos o negativos.

e_i = Valor esperado de casos positivos o negativos.

Tabla 3: Vacunos Brown Swiss, según sexo; con reacción a la prueba de ELISA indirecta.

	NEGATIVOS	POSITIVOS	Total
MACHOS	4	7	11
HEMBRAS	17	59	76
Total	21	66	87

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SEROPREVALENCIA CONTRA LOS ANTICUERPOS DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA

Tabla 4: Seroprevalencia de la diarrea viral bovina, en muestras de suero sanguíneo de vacunos de la raza Brown Swiss del distrito de Pomata, Provincia de Chucuito - Puno.

Muestra	Muestras evaluadas	Anticuerpos detectados contra el vDVB	
		N°	%
Suero sanguíneo	87	66	75.9

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 4, se determinó que la seroprevalencia general es de 75.9% de las muestras sanguíneas las cuales presentaron anticuerpos contra el vDVB en un total de 87 animales muestreados 66 resultaron ser positivos con títulos de anticuerpos mayores a 0.30 considerados como positivos (IDEXX); estos valores coinciden con estudios de Lértora (2003) quien menciona que esta enfermedad tiene una distribución mundial, donde los animales seropositivos representan de 60 a 80% ; así mismo con estudios similares de Cabellos (2006), donde determino en Calca – Cusco, el 90.9% de los vacunos, 15.8% de las alpacas y el 28.29% de los ovinos fueron seropositivos al vDVB siendo la posible causa que en rebaños mixtos no hay control ni prevención, es por eso que hay elevada prevalencia. Bautista (2011) en el departamento de Ayacucho observo que el 75.3±4.3% de los animales presentaron anticuerpos contra el vDVB; así mismo Álvarez, *et al*, (2002) detecto en la provincia de Canchis - Cusco; un 73.7 ± 13.9% en vacunos en producción; las prevalencias muestran ser similares a nuestra investigación.



En nuestra región Puno existen estudios similares recientes donde se encontró 68.89% en el distrito de Taraco (Quispe, 2018), en el distrito de Vilque 65.56% (59/90) (Huaylla, 2018) y en el distrito de Paucarcolla el 60.44 % (Choquenaira, 2018).; todos ellos en vacunos mejorados que tuvieron anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina, Las altas prevalencias encontradas en estudios reportados por diferentes autores evidencian intensa actividad viral debido a factores que promueven la difusión viral. Mientras en Espinar – Cusco; Huacasi (2018) determinó 58.8%; Cardenas *et al.*(2011) $56.2 \pm 4.8\%$ y en el valle de Lima el $56.0 + 5.5\%$ resultaron positivos (Aguilar, 2006), resultados que son inferiores al presente estudio, pudiendo ser la causa al ámbito geográfico y al manejo que se da en las zonas ganaderas; Quispe (2008) realizó estudios en bovinos criollos de la provincia de Melgar - Puno, y determinó que el $48.7 \pm 0.1\%$ de los animales presentó anticuerpos contra el vDVB resultado inferior a nuestra investigación.

Según nuestros resultados de seroprevalencia es similar a los estudios de las investigaciones similares realizadas en la región y el país, asumiendo que la alta prevalencia es la causa principal de no usar un método preventivo contra esta enfermedad como es la vacuna. Así lo demuestra Ramos (2016) que ha detectado en el distrito de Huacullani, Provincia de Chucuito, Región Puno una seroprevalencia de 23.91% en vacunos vacunados contra el virus de la vDVB, en la cual en los valores bajos se observa la efectividad de la vacuna para el control de la enfermedad dando como resultado las bajas prevalencias.

Otros factores a considerar en la alta prevalencia del estudio es que no existe información, ni registros sobre el ingreso de los animales de otras zonas, como de los animales adquiridos de las principales cuencas ganaderas de la región de Puno y de otros departamentos del Perú con el fin de mejorar la genética (Rivera, 1993), por otro lado; en los últimos años el uso masivo de la inseminación artificial con pajillas de toros sin



registro sanitario los cuales pueden ser los portadores de esta enfermedad. Esto se confirma con lo que menciona Bautista (2011) el cual menciona que la prevalencia podría deberse a la constante reintroducción del virus por la compra de animales en ferias comunales y por la falta de un control interno en el tránsito de animales.

Así mismo el manejo que se da a los animales es extensivo en su mayoría y no tienen un control sanitario y reproductivo adecuado; siendo este un factor adicional e importante para la diseminación de este virus, sumado a la presencia de animales PI, ya que es la principal fuente de infección del vDVB donde puede transmitir en tan solo tres a cuatro meses y pueden infectar el 90% de los animales con los que conviven (Lertora, 2003), También se debe tener en cuenta el uso indiscriminado de las pajillas con semen congelado de toros nacionales e importados en programas de inseminación artificial con lo cual los criadores del distrito de Pomata, tienen poco conocimiento de registros sanitarios de los sementales que pueden ser portadores del vDVB.

4.2 SEROPREVALENCIA DE LA DIARREA VIRAL BOVINA SEGÚN SEXO

Tabla 5: Detección de anticuerpos contra el vDVB, en muestras de suero sanguíneo de vacunos de la raza Brown Swiss, según sexo.

Variable	Animales evaluados	Vacunos con anticuerpos contra el vDVB	
		N°	%
MACHO	11	7	63.6
HEMBRA	76	59	77.6
% TOTAL dentro del sexo			75.9

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 5, se muestra la seroprevalencia del vDVB en vacunos de la raza Brown Swiss según sexo; observando un 63.6 % (7/11) en machos y 77.6 % (59/76) en hembras; valores que fueron sometidos a la prueba de Chi cuadrado, y no se encontró diferencia estadística ($P \geq 0.05$). Valores similares se encontró Bautista (2011) en las cuencas ganaderas del departamento de Ayacucho hallando un $75 \pm 24.5\%$ en machos y $75.3 \pm 4.4\%$ de las hembras, así mismo Huacasi (2018) realizó un estudio en Espinar – Cusco y reporto una prevalencia de 50.00% para machos y 60.2% para hembras; Huaylla (2018) en el distrito de Vilque, región Puno encontró vacunos con prevalencias en machos de 45.45% y en hembras 52.94%, en tanto, Choquenaira, (2018) en el distrito de Paucarcolla región Puno encontró 33.33 % en machos y 41.18% hembras, en bovinos criollos Quispe (2008) reporta en la provincia de Melgar - Puno una seroprevalencia de 29.5% para machos y para hembras 48.9%

Los valores hallados en la investigación son similares a los estudios reportados en la región y el país donde se reporta la mayor seroprevalencia en hembras respecto a machos, esto se debe probablemente a que las vacas son criadas en mayor número en vista de que es una cuenca lechera y muchas de ellas pueden tener animales Permanentemente



Infectados siendo la mayoría de las infecciones relacionadas al vBVD por su carácter moderado, subclínico y en ocasiones presentan signos característicos de la enfermedad siendo los principales síntomas como fiebre, descarga nasal, descarga óculo nasal, leucopenia transitoria, elevada morbilidad y baja mortalidad (Lértora, 2003).

Así mismo; Quispe (2008) considera que la enfermedad con lleva a pérdidas económicas ya sea en las fallas reproductivas y abortos espontáneos, por otro lado, la recría con las crías sobrevivientes tiene una elevada mortalidad ya que nacen estas débiles; Mientras tanto, Rivera (2008) menciona que la mayor persistencia del virus se ve incrementado en fetos hembras, más que en machos siendo desconocido este mecanismo de sobrevivencia viral hasta el momento.

No obstante en comparación a otras investigaciones se hallaron datos distintos; Es así como Quiñones (2006), Realizo una investigación en la estación experimental ILLPA - INIA Puno y reporta una seroprevalencia de 25% para machos y 29.87% para hembras, esta diferencia se debe a la distinta forma de crianza, en el Centro Experimental hay un mejor manejo sanitario (aislamiento de animales enfermos, vacunaciones, control de los terneros PI, etc.); esto favorece a tener programas de prevención y control de la enfermedad y que no haya diseminación del agente viral, en efecto Herrera *et al*,(2009) en la provincia de San Pablo - Cajamarca; revela una prevalencia de $27.8 \pm 4.5\%$ (79/285) en hembras, mientras que en los machos el $25.1 \pm 4.3\%$ (25/100). En este mismo contexto Quispe (2018), en una investigación realizada en el distrito de Taraco – Puno; según sexo se observó una diferencia significativa, siendo la mayor prevalencia en machos con 70% y respecto a hembras 21.05%, esto nos corrobora que el tipo de crianza para vacunos de engorde y vacunos para producción de leche también influyen sobre la aparición de casos de vDVB, influyendo de forma directa el sexo.

4.3 SEROPREVALENCIA DE LA DIARREA VIRAL BOVINA SEGÚN EDAD

Tabla 6: Detección de anticuerpos contra el vDVB, en muestras de suero sanguíneo de vacunos de la raza Brown Swiss, según edad.

Variable	Animales evaluados	Vacunos con anticuerpos contra el vDVB	
		Nº	%
< DE 2 AÑOS	29	19	65.5
> DE 2 AÑOS	58	47	81.0
% TOTAL dentro de la edad			75.9

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 6, se observa la seroprevalencia del vDVB en vacunos de la raza Brown Swiss, según edad, donde se reporta un 65.50% (19/29) en vacunos menores a dos años y 81.0%(47/58) vacunos mayores a dos años, no existiendo diferencia estadística ($P \geq 0.05$) estos valores hallados son similares a estudios realizados por Choquenaira (2018) en Puno, distrito de Paucarcolla reporta 37.93% en animales < de 2 años y para > de 2 años 70.67%, mientras tanto Huaylla (2018) en el distrito de Vilque encontró animales menores de 2 años con 50.00% y en mayores de 2 años 72.58%, de manera similar Quispe (2018) en el distrito de Taraco observo una seroprevalencia de 83.60 % en adultos y 37.93 % en animales jóvenes. Estos trabajos mostraron una prevalencia similar a la investigación realizada, donde existe una mayor seroprevalencia en vacunos adultos en comparación a vacunos jóvenes; se corrobora esto con estudio de Quiñones (2006) en la estación experimental ILLPA INIA- Puno, obtuvo una seroprevalencia de 18.42 % para los vacunos jóvenes y 33.33 % para los vacunos adultos, Mientras tanto, Soto (2018) en un estudio en el C.E. Chuquibambilla – Ayaviri encontró 12,22% en animales jóvenes y animales adultos 22,22%.



En virtud de los resultados de las investigaciones similares se atribuye que los animales adultos tienen una mayor prevalencia debido a dos factores: una debido a que el virus induce altos niveles de anticuerpos que persisten por largos periodos, para luego declinar lentamente según se da la inmunidad específica del huésped (Lertora, 2003), y otra debido a que estos animales estuvieron expuestos al vDVB más número de veces en comparación a los animales más jóvenes y tienen un complejo sistema de defensa, así mismo animales aparentemente sanos como los permanentemente infectados que incrementa las seroprevalencias (Bautista, 2011; Brock et al., 2000).

4.4 SEROPREVALENCIA SEGÚN ESTADO REPRODUCTIVO

Tabla 7: Detección de anticuerpos contra el vDVB, en muestras de suero sanguíneo de vacas de la raza Brown Swiss, según estado reproductivo.

Variable	Animales evaluados	Vacunos con anticuerpos contra el vDVB	
		N°	%
VACÍAS	27	22	81.5
PREÑADAS	31	25	80.6
% TOTAL dentro del estado reproductivo	58	47	81.0

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 7, se evidencia seroprevalencias del vDVB en vacunos de la raza Brown Swiss, según estado reproductivo; en el cual se determinó la presencia del virus en un 81.50% (22/27) en vacas vacías y 80.60% (25/31) en vacas preñadas, los cuales no mostraron diferencia estadística ($P \geq 0.05$), se observa que los resultados son similares debido a que el sistema de manejo utilizado por los criadores es el mismo y hay mayor riesgo de que se contagien con la enfermedad, la prevalencia elevada se debe a que en la zona en estudio hay ausencia de prevención y control, medidas de bioseguridad, identificación de los animales PI y vacunaciones contra el vDVB en los hatos lecheros.

Quispe (2018), quien determinó en el distrito de Taraco según estado reproductivo prevalencias superiores, en vacas preñadas con un 93.33% y para vacas en producción 86.67%, Por otra parte Choquenaira (2018), en el distrito de Paucarcolla encontró valores ligeramente inferiores 75% en vacas preñadas en producción y 73.33% en vacas vacías sin producción; Mientras tanto Huaylla (2018) en el distrito de Vilque encontró un 64.29% en vacas preñadas en seca y 83.33% en vacas preñadas en producción; mientras Suni, (2014) en Moquegua reportó seroprevalencias del virus de la diarrea viral bovina,



según estado reproductivo; en vacas gestantes 33.33% y en vacas vacías 45.54% y en otra investigación, Ramos (2016) reporto en Huacullani – Chucuito una prevalencia del 21.74% para los animales gestantes y el 24.64% para los no gestantes.

En consecuencia en atención a las investigaciones realizadas en su mayoría muestra resultados similares a la presente investigación, en la cual de forma indistinta el vDVB, afecta tanto a vacas preñadas y vacías, eso se debe a que el virus posee la virulencia e infectividad de forma indistinta siendo más eficiente el contagio en animales adultos los que generalmente están inmunosuprimidos por el manejo productivo que se les da (Lertora, 2003) así mismo según Zuniga et al (2006) solo algunos ganaderos de producción lechera realizan programas de vacunación, es por esta razón que la prevalencia aún persiste por lo que se encuentra anticuerpos contra el vDVB, en la mayor parte de hatos lecheros, considerando a la enfermedad como endémica en lugares donde no hay un servicio de vacunación eficiente.

4.5 SEROPREVALENCIA SEGÚN ESTADO PRODUCTIVO

Tabla 8: Detección de anticuerpos contra el vDVB, en muestras de suero sanguíneo de vacas de la raza Brown Swiss, según estado productivo.

Variable	Animales evaluados	Vacunos con anticuerpos contra el vDVB	
		N°	%
PRODUCCIÓN	31	27	87.1
SECA	27	20	74.1
% TOTAL dentro del estado productivo	58	47	81.0

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 8, se muestra la seroprevalencia del vDVB que es 87.10%(27/31) en vacas en producción (lactación) y 74.10% (20/27) en vacas sin producción (secas) las cuales al análisis estadístico no mostraron diferencia significativa ($P \geq 0.05$). Estos resultados se muestran similares a los de Quispe (2018) el cual indica que en el distrito de Taraco encontró 87.50% en vacas vacías en producción y 66.67% en vacas vacías en seca estuvieron infestadas con esta enfermedad; por otro lado, Huaylla (2018) en el distrito de Vilque - Puno determino que el 81.25% de vacas en lactación y 57.14% de las vacas en seca y en el distrito de Paucarcolla, Choquenaira (2018) determino 75% y 60% (vacías en producción y preñadas sin producción) de seroprevalencia contra la diarrea viral bovina. Aunado a esto Huacasi, (2018) determino 58.8% para vacas en seca y 71.2% para vacas en lactación; y en el Valle de Lima el $56 \pm 5.5\%$ (174/311) de vacunos en producción fueron seroreactores al vDVB y Aguilar et al., (2006); realizó un estudio en la Irrigación de Majes, Arequipa donde el 47.2% de los vacunos tuvieron anticuerpos contra el vDVB.



Según los estudios similares realizados se observa que las de vacas en producción tienen un nivel superior de seroprevalencia a las vacas en seca; según Bolin et al. (1992) los niveles altos de infectividad del vDVB se deben por la facilidad de contagio incluso por vía aérea por aerosoles, lo que eleva la seroprevalencia en animales en ambientes cerrados como establos o centros de ordeño; esto se corrobora porque en el estudio y en otros similares se denota la ligera elevación de la prevalencia de la enfermedad en animales en producción.

Como se puede inferir la existencia del virus de la diarrea viral bovina, y los resultados elevados son debido también a que no hay control adecuado contra esta enfermedad; y su amplia difusión en zonas de crianza adyacentes, el traslado de los mismos de una región a otra, los controles deficientes en el manejo reproductivo facilitan la diseminación en los centros de crianza derivando en la elevada prevalencia; así mismo al estrés que son sometidos estos animales por un manejo constante ocasionan inmunosupresión que lo hacen susceptibles a la infección por parte del virus, (Contreras, 2000); finalmente son elevadas las prevalencias más en vacas en producción y ligeramente menor en vacas en seca debido a que a las vacas con problemas reproductivos se le vende para el camal, por otra parte, es necesario implementar programas de prevención contra esta enfermedad, ya que es perjudicial para el criador de bovinos principalmente en centros de crianza.



V. CONCLUSIONES

La seroprevalencia de la diarrea viral bovina en el distrito de Pomata, según sexo es de 63.60 % para los machos y de 77.60 % para las hembras, los cuales no mostraron diferencias significativas.

La seroprevalencia de la diarrea viral bovina en el distrito de Pomata, según edad es de 65.50 % para los vacunos < a 2 años y 81.00% para los vacunos > a 2 años, los cuales no mostraron diferencias significativas.

La seroprevalencia de la diarrea viral bovina en el distrito de Pomata, según el estado reproductivo en vacas vacías es de 81.50% y para las vacas preñadas es de 80.60%, los cuales no mostraron diferencias significativas.

La seroprevalencia de la diarrea viral bovina en el distrito de Pomata, para el estado productivo en vacas en producción es de 87.10% y 74.10 % para las vacas sin producción o secas, los cuales no mostraron diferencias significativas.



VI. RECOMENDACIONES

Establecer un programa de control y prevención contra esta enfermedad que causa pérdidas económicas, al mismo tiempo una vigilancia epidemiológica en los vacunos.

Sensibilizar y realizar capacitaciones a los productores de las comunidades para que faciliten a sus animales para estudios serológicos de las principales enfermedades infecciosas.

Evitar la adquisición de animales PI, sin la certificación contra la enfermedad del vDVB entre otras enfermedades infecciosas.

Realizar estudios de seroprevalencia contra vDVB a nivel de la región de Puno y en el Perú.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez S, Rivera H, Pezo D, García W. (2002). Detección de anticuerpos contra pestivirus en rumiantes de una comunidad campesina de la provincia de Canchis, Cusco. *Rev. Inv. Vet. Peru* 13(1): 46 - 51.
- Aguilar, R. E. (2006). Seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en ganado lechero de crianza intensiva del valle de Lima. Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario UNMSM – Lima, Perú.
- Ames, T. Y A. Baker, (1990). Management practices and vaccination program that help control BVD virus infection. In: *Symposium on BVD. Vet Med Get*: 15-24.
- APHIS. (2007). *Bovine Viral Diarrhea Virus*.
- Bautista, F. (2011). Seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en las cuencas ganaderas de cinco distritos de la región Ayacucho. Tesis para obtener el título profesional de médico veterinario UNSCM – Ayacucho, Perú.
- Bewoo J., C. Haase, P. Sharp, R. Schultz. (2007). Leukocyte profile of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 115: 369-374. 2007.
- Bohórquez, J., Vargas, D., & Jaime, J. (2013). Los Pestivirus: generadores de enfermedades emergentes en porcinos. *Porcicultura Colombiana*, Vol. 2 No (ISSN 0122-4220), 22–26. Recuperado de [http://www.porcicol.org.co/porcicultores/images/porcicultores/revistas/Porcicultores 181/files/assets/downloads/publication.pdf](http://www.porcicol.org.co/porcicultores/images/porcicultores/revistas/Porcicultores%20181/files/assets/downloads/publication.pdf)



- Bolin SR, Ridpath JF. (1992). Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. *Am J Vet Res* 53(11):2157–2163.
- Bolin, S. (1995). The pathogenesis of mucosal disease. In: *Bovine viral diarrhea virus. Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice* 11 (3): 489-500.
- Brock, K., and C.C. Chase (2000). Development of a fetal challenge method for the evaluation of bovine viral diarrhea virus vaccines. *Veterinary Microbiol* 77(1-2): 209-14.
- Brownlie, J. (1990). The pathogenesis of bovine virus diarrhea virus infections, 9(1), 43–59.
- Cabellos, K. O. (2006). Seroprevalencia de los virus: Parainfluenza 3, respiratorio sincitial, diarrea viral bovina, en un rebaño mixto de una comunidad campesina de la provincia de Calca, Cusco. Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario UNMSM – Lima, Perú.
- Cárdenas, C., Rivera, H., Araínga, M., Ramirez, M., y De Paz, J. (2011). Seroprevalencia del Virus de la Diarrea Viral Bovina y de animales portadores del virus en la Provincia de Espinar, Cusco. *Rev Inv Vet Perú*, 22 (3): 261-267.
- Charleston B, Brackenbury LS, Carr BV, Fray MD, Hope JC, Howard CJ, Morrison WI. (2002). Alpha/Beta and Gamma Interferons Are Induced by Infection with Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus In Vivo. *J Virol* 76(2):923–927.
- Choquenaira, E. R. (2018). Seroprevalencia del virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) en vacunos Brown Swiss del distrito de Paucarcolla – Puno. Tesis para optar el título de médico veterinario y zootecnista UNA –Puno, Peru.



- Contreras G, Ståhl K, Arana C, Rivera H. (2000). Anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina en muestras de leche de bovinos del valle del Mantaro (Jauja, Concepción y Huancayo). *Rev Inv Vet Perú* 11(1):58–65.
- Costable Pd, Bl. Hull, Jr. Wicks, W. Myre (1993) Femoral and tibial fractures in a newborn calf after trasplacental infection with bovine viral diahorrea virus. *Vet. Rec.* 132: 383-385.
- Donis, R. (1995). Molecular Biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. In: *Bovine viral diarrhoea virus. Veterinary Clinics of North America; Food Animal Practice* 11(3): 393-423.
- Goens, S. D. (2002). The evolution of bovine viral diarrhoea: A review. *Canadian Veterinary Journal*, 43(12), 946–954.
- Goyal, S. M., & Ridpath, J. F. (2005). *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management, and Control*. John Wiley & Sons.
- Green, M., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning. A laboratory manual* (4 th editi). New York: Inglis,John.
- Hamers, C., Couvreur, B., Dehan, P., Letellier, C., Lewalle, P., Kerkhofs, P., y Pastoret, P. (2000). Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus strains isolated from haemorrhagic syndromes. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 143: 197-200.
- Herrera, A. (2009). Seroprevalencia del virus de la diarrea viral en bovinos de crianza extensiva de la provincia de San Pablo, departamento de Cajamarca. Tesis para optar el título de médico veterinario y zootecnista UNMSM – Lima, Perú.



- Hielata, S. K.; Crossley, B. M. (2005). Virus replication. In: Goyal, S.; Ridpath, J. (Eds). Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control. Iowa, USA. Blackwell Publishing. pp 81-89.
- Hilbe M., E. Stalder, M. Peterhans, Haessig M. Nussbaumer, C. Egli, Schelp, K Zlinszky and F. Ehrensperger (2007). Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *J Vet Diagn. Invest.* 19:28-34.
- Houe H, Lindberg A, Moenning V. (2006). Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest* 18:427– 436.
- Houe, H. (1995). Epidemiology of bovine viral diarrhoea Virus. *Vet Clin North Am Food Animal Practice* 11(3):521-547.
- Houe, H., (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV). *Vet Microbiol*, 64 (2-3): 89-107.
- Huacasi, B. (2018). Seroprevalencia de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y diarrea viral bovina (DVB) en vacunos Brown Swiss de la comunidad de Huisacollana del distrito de Yauri- Espinar - Cusco, tesis para optar el título de médico veterinario y zootecnista UNA –Puno, Peru.
- 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 para optar el título profesional de Médico Veterinario UNMSM – Lima, Perú.
- Huaylla, J. C. (2018). Seroprevalencia del virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) en vacunos Brown Swiss del distrito de Vilque – Puno. Tesis para optar el título de médico veterinario y zootecnista UNA –Puno, Peru.



- INIE, (2012). Instituto Nacional de Estadística e Informática. Censo Nacional Agropecuario: Resultados Definitivos, Departamento de Puno. Tomo II. P.152-203. Lima. Perú.
- Jubb K, Kennedy P, Palmer N. (1993). Pathology of domestic animals. Fourth edition. London. Academic Press Inc. 2:149-158.
- Kelling, C.L., (2004). Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. The Veterinary clinics of North America. Food animal practice 20, 115-129.
- Kim, S. G., & Dubovi, E. J. (2003). A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. *Biologicals*, 31(2), 103–106. [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00023-X)
- Labanda, J. (2015). Prevalencia de Diarrea Viral Bovina en vacas lecheras de las ganaderías del cantón Loja. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Loja.
- Lambot M, Douart A, Joris E, Letesson JJ, Pastoret PP. (1997). Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol* 78:1041–1047.
- Lanyon, S. R., Hill, F. I., Reichel, M. P., & Brownlie, J. (2013). Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *Veterinary Journal* (London, England: 1997), 199(2), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024>
- Lértora W.J. (2002) Inmunohistoquímicas en biopsias de piel y bulbos pilosos para el diagnóstico de bovinos persistentemente infectados con el virus diarrea viral bovina. Tesis de Maestría. Universidad Austral de Chile. Valdivia Chile. Pág. 61-90.



- Lértora, W. (2003). Diarrea Viral Bovina: Actualización. *Rev. Vet.* 14:1, 42-51 456 p.p.
- Liebler-Tenorio, E.M., Ridpath, J.F., Neill, J.D., (2003). Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 15, 221-232.
- Lindberg A, Brownlie J, Gunn GJ, Houe H, Moennig V, Saatkamp HW, Sandvik T, Valle PS. (2006). The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 25(3):961–979.
- Lindberg, A. Y A. Alenius. (1999). Principles for eradication of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) infection in cattle populations. *Vet Microbiol* 64: 197-222.
- Lindenbach, B.; Thiel, H.; Rice, C. (2007). *Flaviviridae: The Virus and their Replication*. In: Knipe, D.; Howley.; P. Fields *Virology*. 5th Edition. Philadelphia, USA. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins (Ed). Pág. 1101-1152.
- McGowan MR, Kafi M, Kirkland PD, Kelly R, Bielefeldt Ohmann H, Occhio MD, Jillella D. (2003). Studies of the pathogenesis of bovine Pestivirus–induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology* 59: 1051–1066.
- MINAGRI, (2015). Ministerio de Agricultura. Oficina de Información Agraria
- MINAGRI, (2010). Ministerio de Agricultura.
- Miranda C. (1987). *Epidemiología aplicada a la administración de salud*. Lima – Perú.
- Moennig V, Eicken K, Flebbe U, Frey HR, Grummer B; Haas L, Greiser-Wilke I, Liess B. (2005). Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Prev Vet Med* 72:109–114.



- Morales, S. (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 pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. (1999). *Veterinary Virology*. Third Edition. USA, pág.: 39.
- Nelly J. (2002). Use serial analysis of gene expression to measure changes in gene expression in BVDV2 - infected MDBK cells. National Animal Disease Center (NADC).
- OIE. (2015). Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres 2012. World Organization for Animal.
- Paton, D.J. (1995). Pestivirus diversity. *J comp. Path.* 112:215-236.
- Pecora, A.; Pérez Aguirreburualde, M. S.; Malacari, D.; Zabal, O.; Bauermann, F.V.; Ridpath, J.F.; Dus Santos, M.J. (2016). Pestivirus emergentes HoBi : impacto en salud animal y su importancia como contaminante de insumos biotecnológicos. *RIA*, 42 (3), 252–257.
- Pecora, A.; Pérez Aguirreburualde, M.S.; Zabal, O.; Dus Santos, M.J. (2017). Detección de Pestivirus a partir de lotes de suero fetal bovino nacional. Congreso Internacional de la Sociedad Argentina de Virología.
- Peterhans, E., Jungi, T.W., Schweizer, M., (2003). BVDV and innate immunity. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization* 31, 107-112.
- Potgieter, L. (1995). Immunology of bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Animal Practice*. 11(3):501-520.



- Quiñones, J. (2006). Seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina (DVB), en la estación experimental ILLPA INIA Puno, tesis para optar el título de médico veterinario y zootecnista UNA –Puno, Peru.
- Quispe, N. A. (2018). Seroprevalencia del virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) en vacunos Brown Swiss en tres comunidades del distrito de Taraco – Huancané – Puno. Tesis para optar el título de médico veterinario y zootecnista UNA –Puno, Peru.
- Quispe, R. (2008). Prevalencia de diarrea viral bovina en la provincia de Melgar-Puno. Tesis Med. Vet. - UNA, Puno.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. y Hinchcliff K.W. (2002). Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Novena edición. McGraw-Hill: 1285-1308.
- Ramírez G, V. Vera, L. Villamil, (1999). Diarrea viral bovina – DVB: Inmunosupresión y efectos en la reproducción bovina. El Cebú. 32-40.
- Ramos, D. (2016). Seroprevalencia de anticuerpos al virus de la diarrea viral bovina en el distrito de Huacullani – Puno. Tesis Med. Vet. - UNA, Puno.
- Ridpath J, Neill J, Frey M. (2000). Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. Vet Microbiol. 77:145– 155.
- Ridpath, J. (2010). Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status. Vet Clin Food Anim. 26: pág. 105–121.



- Ridpath, J. F. (2003). BVDV genotypes and biotypes: Practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*, 31(2), 127–131. [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00028-9](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00028-9)
- Rivera H, Valdivia L, Benito A. (2001). Diarrea viral bovina en bovinos lecheros de crianza semi-intensiva de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. *Rev.Inv. V e t*, Supl. 1:380-381.
- Rivera, H. (2008). Evaluación del conocimiento sobre la enfermedad de la diarrea viral bovina y su agente etiológico. *Rev. Inv. Vet. Peru* 19(1): 93-112.
- Rondón, I. (2006). diarrea viral bovina: patogénesis e Inmunología. *Rev. MVZ Cordoba*. 11(1): 694-704
- Sandvik T. (2004). Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. *Vet Clin Food Anim* 20:151–169.
- Soltan, M. A., Wilkes, R. P., Elsheery, M. N., Elhaig, M. M., Riley, M. C., & Kennedy, M. A. (2015). Circulation of bovine viral diarrhoea virus--1 (BVDV-1) in dairy cattle and buffalo farms in Ismailia Province, Egypt. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(12), 1331–7. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26719939>
- Soto, A. (2018). Seroprevalencia de la diarrea viral bovina en el Centro de Investigación y Producción de Chuquibambilla, Puno. Para optar el grado académico de DOCTORIS SCIENTIAE EN CIENCIAS DE LA SALUD UNA - PUNO, PERÚ.
- Suni, L. (2014). Seroprevalencia de la diarrea viral bovina en la Cuenca lechera del distrito de Moquehua. Tesis Med. Vet.- UNA, Puno.



- Thrusfield M.I. (1990). Epidemiología veterinaria. 1ra. Edición, Editorial Acribia, España.
- Tizard I. (2002). Inmunología veterinaria. Sexta edición. Mc Graw Hill Interamericana. 2002; 229, 449.
- Valle P, Skjerve E, Wayne S, Larsen R, Nyberg O. (2005). Ten years of BVDV control in Norway: A cost benefits analysis. *Prev Vet Med* 2005; 72: 189.
- Yeşilbağ, K.; Alpay, G.; Becher, P. (2017). Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Viruses*, 9 (6), 128.
- Zuniga A, Rivera H, Arainga M, Manchago A. (2006). Evaluacion de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina de un hato en proceso de erradicación de la enfermedad. *Rev. Inv. Vet. Perú* 17(1):44-50.



ANEXOS

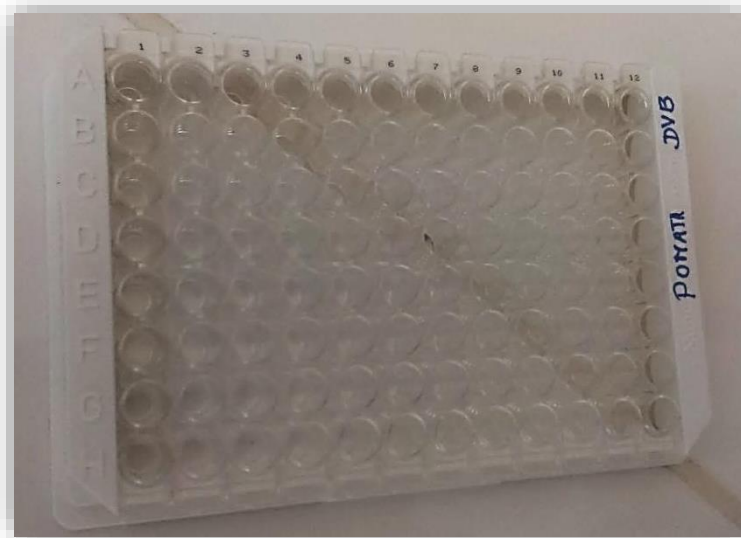
ECUACION A1.

Procedimiento del Kit ELISA (IDEXX BVDV Total Ab)

El KIT, los reactivos y sueros todos alcanzan la temperatura ambiente de 18 a 25°C.

Antes de su uso.

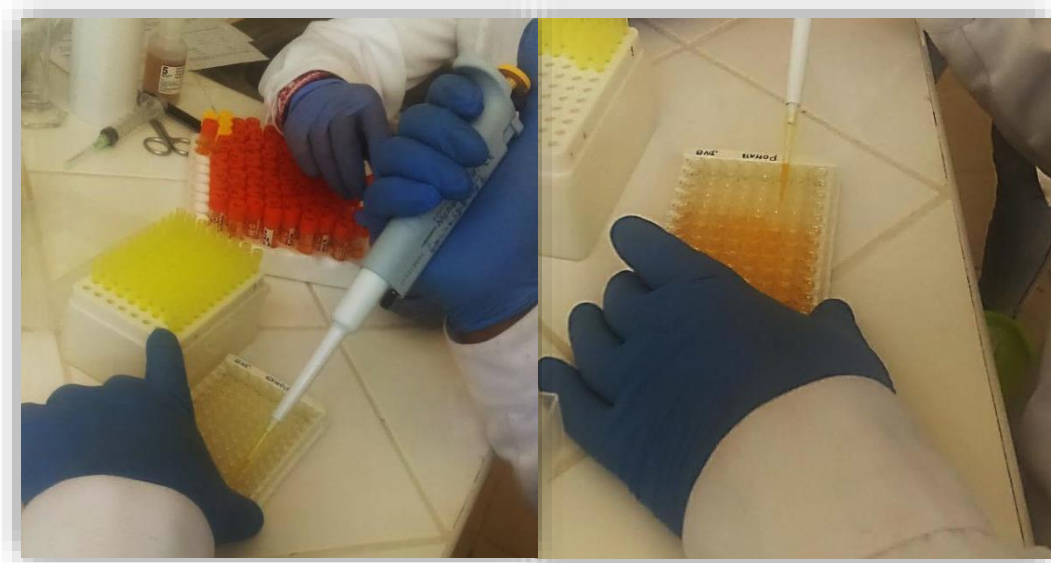
- a) Tomar las placas tapizadas y marcar la posición de las muestras.



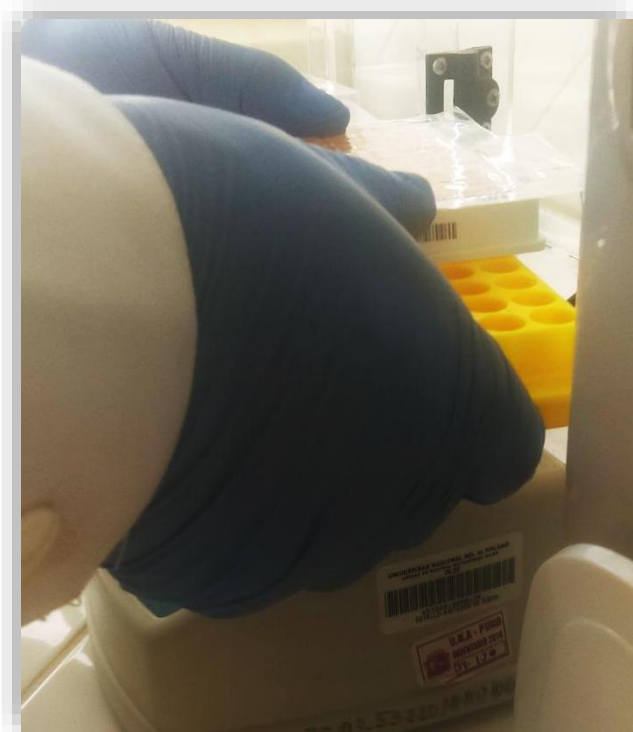
- b) Añadir 100 ul de diluyente de la muestra en cada pocillo.



- c) Añadir 25 ul de control negativo (CN) en dos pocillos.
- d) Añadir 25 ul de control positivo (CP) en dos pocillos.



- e) Añadir 25 ul de las muestras en los pocillos restantes.
- f) Homogenizar el contenido de los pocillos.

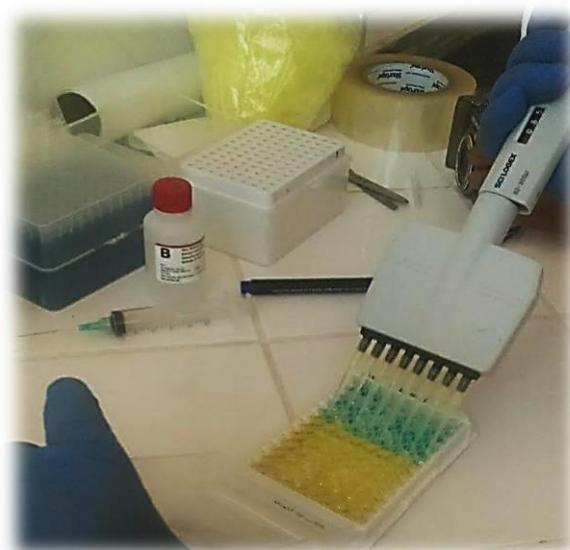


- g) Incubar durante 90 minutos (+- 5 minutos) a 18 - 26 °C.

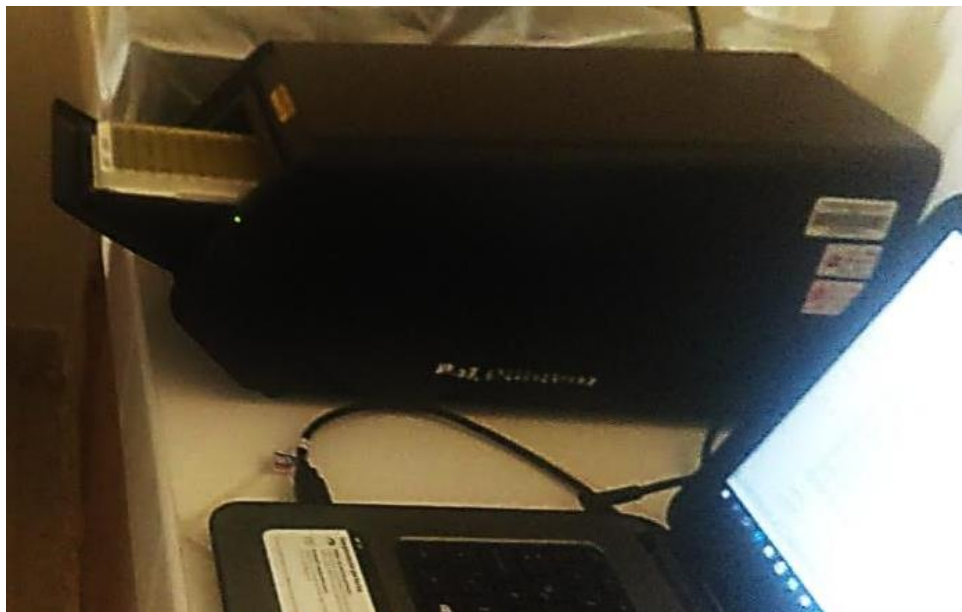
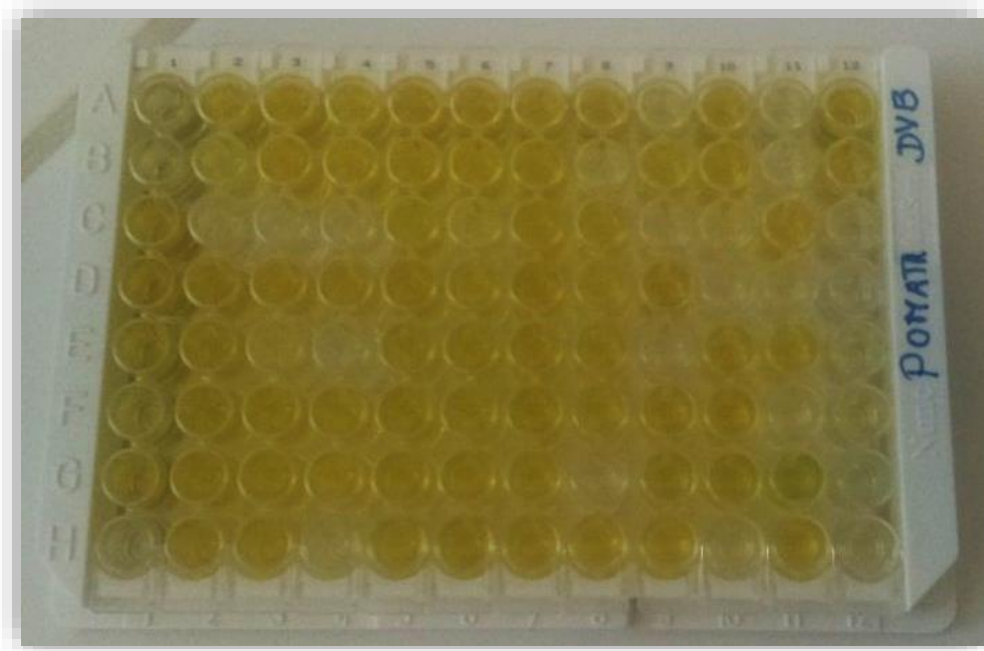
- h)** Eliminar el contenido liquido de cada pocillo y lavar cada pocillo con aproximadamente 300 ul de Solución de Lavado 5 veces.



- i)** Dispensar 100 ul de conjugado en cada pocillo.
j) Incubar durante 30 minutos (+- 2 minutos) a 18 – 26 °C.
k) Repetir el paso **h)**
l) Dispensar 100 ul de substrato TMB n.º12 en cada pocillo.
m) Incubar 10 minutos (+- 1 minuto) a 18 – 26 °C.
n) Dispensar 100 ul solución de frenado n.º3 en cada pocillo.



- o) Medir y anotar la absorbancia de las muestras y controles a 450 nm.



- p) Se calculó los resultados con las fórmulas correspondientes.
- q) Interpretación de los resultados finales.

ECUACION A2. Ji cuadrada en vacunos Brown Swiss según sexo.

Seroprevalencia tabulación cruzada					
			Seroprevalencia		Total
			Negativo	Positivo	
Sexo	Macho	Recuento	4	7	11
		% dentro de Sexo	36.4%	63.6%	100.0%
	Hembra	Recuento	17	59	76
		% dentro de Sexo	22.4%	77.6%	100.0%
Total	Recuento		21	66	87
	% dentro de Sexo		24.1%	75.9%	100.0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	1,028 ^a	1	.311		
Corrección de continuidad ^b	.406	1	.524		
Razón de verosimilitud	.950	1	.330		
Prueba exacta de Fisher				.450	.253
Asociación lineal por lineal	1.016	1	.313		
N de casos válidos	87				

a. 1 casillas (25,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 2,66.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

*. No significativo

ECUACION A3. Ji cuadrada en vacunos Brown Swiss según edad.

Seroprevalencia tabulación cruzada					
			Seroprevalencia		Total
			Negativo	Positivo	
Edad	Adulto	Recuento	11	47	58
		% dentro de Edad	19.0%	81.0%	100.0%
	Joven	Recuento	10	19	29
		% dentro de Edad	34.5%	65.5%	100.0%
Total		Recuento	21	66	87
		% dentro de Edad	24.1%	75.9%	100.0%

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	2,542 ^a	1	.111		
Corrección de continuidad ^b	1.765	1	.184		
Razón de verosimilitud	2.457	1	.117		
Prueba exacta de Fisher				.121	.093
Asociación lineal por lineal	2.513	1	.113		
N de casos válidos	87				

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El

recuento mínimo esperado es 7,00.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

*. No significativo



ECUACION A4. Ji cuadrada en vacunos Brown Swiss según Estado Reproductivo.

Seroprevalencia tabulación cruzada					
			Seroprevalencia		Total
			Negativo	Positivo	
Estado reproductivo	Vacías	Recuento	5	22	27
		% dentro de Estado reproductivo	18.5%	81.5%	100.0%
	Preñadas	Recuento	6	25	31
		% dentro de Estado reproductivo	19.4%	80.6%	100.0%
Total		Recuento	11	47	58
		% dentro de Estado reproductivo	19.0%	81.0%	100.0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	,007 ^a	1	.935		
Corrección de continuidad ^b	0.000	1	1.000		
Razón de verosimilitud	.007	1	.935		
Prueba exacta de Fisher				1.000	.602
Asociación lineal por lineal	.006	1	.936		
N de casos válidos	58				

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El

recuento mínimo esperado es 5,12.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

*. No significativo

ECUACION A5. Ji cuadrada en vacunos Brown Swiss según Estado Productivo.

Seroprevalencia tabulación cruzada					
			Seroprevalencia		Total
			Negativo	Positivo	
Estado productivo	Lactación	Recuento	4	27	31
		% dentro de Estado productivo	12.9%	87.1%	100.0%
	Seca	Recuento	7	20	27
		% dentro de Estado productivo	25.9%	74.1%	100.0%
Total		Recuento	11	47	58
		% dentro de Estado productivo	19.0%	81.0%	100.0%
Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	1,592 ^a	1	.207		
Corrección de continuidad ^b	.858	1	.354		
Razón de verosimilitud	1.599	1	.206		
Prueba exacta de Fisher				.315	.177
Asociación lineal por lineal	1.565	1	.211		
N de casos válidos	58				

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 5,12.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

*. No significativo

TABLA A1. Resultados obtenidos de la prueba de ELISA Indirecta para el vDVB, del distrito de Pomata – Chucuito. Realizados en el laboratorio de salud animal en el CIP Chuquibamvilla de la UNA – Puno.

RESULTADOS DE DVB - POMATA - YUDY ALVAREZ												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.375	1.403	2.349	1.663	2.391	2.162	1.780	2.134	0.387	2.214	0.294	2.142
B	0.404	0.852	2.391	1.821	2.107	1.952	2.268	0.281	2.161	2.450	0.307	1.891
C	1.934	0.368	0.303	0.335	1.846	0.609	2.223	1.932	0.299	0.474	2.505	0.296
D	1.913	2.570	2.465	2.194	2.430	1.504	2.392	1.274	2.485	0.321	0.371	0.251
E	1.374	2.132	0.701	0.286	2.036	2.172	2.120	1.901	0.255	2.482	2.207	0.419
F	0.664	2.333	2.341	2.054	2.248	1.668	2.443	1.746	2.246	2.338	0.361	0.540
G	1.473	2.259	2.376	1.840	2.112	2.116	1.861	0.295	1.943	2.192	1.972	0.370
H	0.338	2.218	2.298	0.345	1.876	2.467	2.100	2.307	1.962	0.352	2.256	0.348

TABLA A2. Resultados obtenidos usando la fórmula de interpretación de la prueba de ELISA Indirecta para el vDVB en el distrito de Pomata – Chucuito. (En el cuadro que se muestra, los números de color azul son positivos y los de color rojo son negativos).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.01	0.661	1.28	0.83	1.30	1.16	0.91	1.14	0.00	1.19	0.06	1.14
B	0.01	0.30	1.30	0.93	1.12	1.02	1.22	0.07	1.15	1.34	0.05	0.98
C	1.01	0.01	0.06	0.04	0.95	0.14	1.20	1.01	0.06	0.06	1.38	0.06
D	0.99	1.42	1.35	1.18	1.33	0.73	1.31	0.58	1.37	0.04	0.01	
E	0.64	1.14	0.20	0.07	1.07	1.16	1.13	0.99	0.09	1.36	1.18	
F	0.18	1.27	1.27	1.09	1.21	0.83	1.34	0.88	1.21	1.27	0.02	
G	0.71	1.22	1.29	0.95	1.12	1.13	0.96	0.06	1.01	1.18	1.03	
H	0.03	1.19	1.24	0.03	0.97	1.35	1.12	1.25	1.03	0.02	1.22	

TABLA A3. Interpretación de resultados obtenidos para el vDVB en el distrito de Pomata – Chucuito.

N° animal	Sexo	Edad	Estado reproductivo	Estado productivo	Observacion (positivo, negativo, dudoso)
1	Hembra	< 2 años			Positivo
2	Hembra	< 2 años			Negativo
3	Hembra	> 2 años	Vacía	Lactación	Positivo
4	Macho	< 2 años			Negativo
5	Hembra	> 2 años	Vacía	Lactación	Positivo
6	Hembra	< 2 años			Positivo
7	Hembra	< 2 años			Negativo
8	Hembra	> 2 años	Vacía	Lactación	Positivo
9	Hembra	> 2 años	Vacía	Lactación	Positivo
10	Macho	< 2 años			Positivo
11	Hembra	> 2 años	Vacía	Seca	Positivo
12	Hembra	> 2 años	Vacía	Lactación	Positivo
13	Hembra	> 2 años	Vacía	Lactación	Positivo
14	Hembra	> 2 años	Preñada	Seca	Positivo
15	Macho	< 2 años			Negativo
16	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Positivo
17	Hembra	< 2 años			Positivo
18	Macho	< 2 años			Positivo
19	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Positivo
20	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Positivo
21	Hembra	< 2 años			Positivo
22	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Positivo
23	Hembra	< 2 años			Negativo
24	Hembra	> 2 años	Vacía	Lactación	Positivo
25	Hembra	< 2 años			Negativo
26	Hembra	> 2 años	Preñada	Seca	Positivo
27	Hembra	> 2 años	Vacía	Lactación	Positivo
28	Macho	< 2 años			Negativo
29	Hembra	> 2 años	Vacía	Seca	Positivo
30	Macho	< 2 años			Positivo
31	Hembra	> 2 años	Vacía	Lactación	Positivo
32	Hembra	> 2 años	Preñada	Seca	Positivo
33	Hembra	< 2 años			Positivo
34	Hembra	> 2 años	Vacía	Lactación	Positivo
35	Hembra	< 2 años			Positivo
36	Hembra	> 2 años	Vacía	Lactación	Positivo
37	Hembra	> 2 años	Vacía	Seca	Positivo
38	Hembra	> 2 años	Vacía	Lactación	Positivo
39	Macho	< 2 años			Negativo
40	Macho	< 2 años			Positivo
41	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Positivo



42	Hembra	< 2 años			Positivo
43	Hembra	< 2 años			Positivo
44	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Positivo
45	Hembra	< 2 años			Positivo
46	Hembra	> 2 años	Preñada	Seca	Positivo
47	Hembra	> 2 años	Preñada	Seca	Positivo
48	Hembra	< 2 años			Positivo
49	Hembra	< 2 años			Positivo
50	Hembra	> 2 años	Vacía	Lactación	Positivo
51	Macho	< 2 años			Positivo
52	Hembra	> 2 años	Preñada	Seca	Positivo
53	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Positivo
54	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Negativo
55	Macho	< 2 años			Positivo
56	Hembra	> 2 años	Preñada	Seca	Positivo
57	Hembra	> 2 años	Vacía	Lactación	Positivo
58	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Positivo
59	Hembra	> 2 años	Vacía	Seca	Negativo
60	Macho	< 2 años			Positivo
61	Hembra	> 2 años	Vacía	Seca	Negativo
62	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Positivo
63	Hembra	< 2 años			Negativo
64	Hembra	< 2 años			Positivo
65	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Negativo
66	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Positivo
67	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Positivo
68	Hembra	> 2 años	Vacía	Seca	Positivo
69	Hembra	> 2 años	Vacía	Seca	Positivo
70	Hembra	> 2 años	Vacía	Seca	Positivo
71	Hembra	> 2 años	Vacía	Seca	Negativo
72	Hembra	> 2 años	Vacía	Seca	Negativo
73	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Positivo
74	Hembra	> 2 años	Vacía	Seca	Positivo
75	Hembra	> 2 años	Preñada	Seca	Positivo
76	Hembra	> 2 años	Preñada	Seca	Negativo
77	Hembra	> 2 años	Preñada	Seca	Negativo
78	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Negativo
79	Hembra	> 2 años	Vacía	Seca	Positivo
80	Hembra	> 2 años	Vacía	Seca	Negativo
81	Hembra	> 2 años	Preñada	Seca	Positivo
82	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Negativo
83	Hembra	> 2 años	Preñada	Seca	Positivo
84	Hembra	> 2 años	Preñada	Seca	Positivo
85	Hembra	> 2 años	Preñada	Lactación	Positivo
86	Hembra	> 2 años	Preñada	Seca	Positivo
87	Hembra	< 2 años			Negativo