

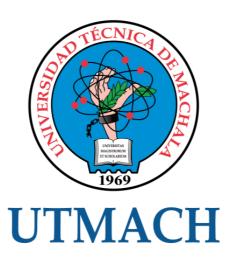
# FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

# CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA, EN EL CANTÓN SANTA ROSA POR MEDIO DE ENZYME LINKED INMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

MORENO PEÑA LIDA ALEJANDRA MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

> MACHALA 2019



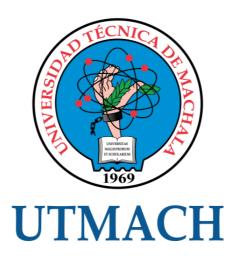
# FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

# CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA, EN EL CANTÓN SANTA ROSA POR MEDIO DE ENZYME LINKED INMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

> MORENO PEÑA LIDA ALEJANDRA MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

> > MACHALA 2019



# FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

# CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

# TRABAJO TITULACIÓN TRABAJO EXPERIMENTAL

ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA, EN EL CANTÓN SANTA ROSA POR MEDIO DE ENZYME LINKED INMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

MORENO PEÑA LIDA ALEJANDRA MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

AGUILAR GALVEZ FERNANDO LENIN

MACHALA, 18 DE SEPTIEMBRE DE 2019

MACHALA 2019

# Nota de aceptación:

Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA, EN EL CANTÓN SANTA ROSA POR MEDIO DE ENZYME LINKED INMUNOSORBENT ASSAY (ELISA), hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.

AGUILAR GALVEZ FERNANDO LENIN

0704217348

TUTOR - ESPECIALISTA 1

PELAEZ RODRÍGUEZ HENRY OLAY 0702789744 ESPECIALISTA 2

VARGAS GOMZĂLEZ/OLIVERIO NAPOLEON

1101446894 ESPECIALISTA 3

Machala, 18 de septiembre de 2019

# Diagnostico del Virus de la Diarrea Viral Bovina por Técnica de ELISA

- 11 N		$\neg$		$\neg$	$\sim$	1 / 1	IDAI	`
-11	vi – i	11	11/11	1 11-	l IR	 IAI	пи	•

5% 4%
INDICE DE SIMILITUD FUENTE

FUENTES DE

2%
PUBLICACIONES

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

#### **FUENTES PRIMARIAS**

dspace.utpl.edu.ec

3%

Submitted to 95131
Trabajo del estudiante

1%

repository.lasalle.edu.co

<1%

4 S

Submitted to Universidad de la Amazonia Trabajo del estudiante

<1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 15 words

Excluir bibliografía

Activo

# CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

La que suscribe, MORENO PEÑA LIDA ALEJANDRA, en calidad de autora del siguiente trabajo escrito titulado ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA, EN EL CANTÓN SANTA ROSA POR MEDIO DE ENZYME LINKED INMUNOSORBENT ASSAY (ELISA), otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

La autora declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las dispociones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

La autora como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 18 de septiembre de 2019

MORENO PEÑA LIDA ALEJANDRA

0705466951

#### **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi Dios quien me supo guiar por el buen camino, dándome fuerzas para seguir adelante y no desmayar ante los problemas que se presentaban y nunca rendirme en cada intento.

A mis padres les dedico este presente trabajo con mucho cariño y amor que gracias a su apoyo, consejos, comprensión, amor y ayuda económica que fueron necesarios para mis estudios. Que gracias a ellos han forjado principios, carácter, valores, mi perseverancia para conseguir mis objetivos y así culminar mi carrera profesional.

Dedico de forma especial a mi hermana Beatriz que fue un apoyo como hermana mayor, como amiga y confidente en todas mis decisiones como personas en la cual me siento orgullosa y me inspira a ser mejor.

Por ultimo dedico mi esfuerzo y trabajo a mis animales porque gracias a ellos mejoro cada día dando el máximo de mi capacidad y así brindar ese cariño humano a todos los animales que necesiten mi ayuda.

#### **AGRADECIMIENTO**

Mi especial agradecimiento a Dios que fue mi soporte vital para realizar este y muchos otros trabajos. Agradezco a mi familia que estuvo conmigo en las buenas y malas. Dándome ánimos en cada paso que daba. Gracias por todo ese amor que me brindan como familia.

Gracias a mis queridas compañeras y amigas Johanna, Gabriela, Michelle, Sandy que me apoyaron en cada momento difícil, compartiendo sus tristezas, alegrías y conocimientos durante estos cinco años y puedo decirles chicas que lo hemos logrado.

A mi querida amiga Gabriela Klinger le agradezco de forma especial porque fue un apoyo incondicional al inicio de mi carrera y que no perdiste las esperanzas conmigo y siempre nos ayudaste a sobre salir con cada ocurrencia y buenos valores.

También a mi querida Alexandra Ríos que fue un apoyo moral y fuiste testigo de mi esfuerzo, dedicación en todos estos años de estudio y contribuiste con ese pequeño granito de arena para llegar a este triunfo.

A mis docentes que me dedicaron su tiempo, esfuerzo y conocimiento al instruirme para llegar a ser una profesional ética. Agradezco cada minuto de su esfuerzo impartidos en clases lo utilizaré en mi vida cotidiana para llegar a ser cada día mejor.

A mis tutores les agradezco su guía y apoyo que fue una ayuda incondicional en cada paso del proceso de titulación.

#### RESUMEN

Estudio de seroprevalencia de diarrea viral bovina, en el Cantón Santa Rosa por medio de *Enzyme Linked Inmunosorbent Assay* (ELISA).

Lida Alejandra Moreno Peña, Autora

La Diarrea Viral Bovina es una enfermedad que se encuentra a nivel mundial en todas las ganaderías siendo la principal causa de grandes pérdidas económicas, ya que afectan de forma significativa la reproducción de los animales y es de fácil diseminación. El agente etiológico es un Pestivirus de la familia Flaviviridae perteneciente a un virus de de ARN con una nucleocápside proteica rodeada por una membrana fosfolipídica con proteínas estructurales y no estructurales. El virus puede transmitirse de forma vertical y horizontal por forma directa e indirecta, siendo la forma indirecta la primordial fuente de infección transmitida por animales infectados, fómites, de forma transplacentaria o por fluidos seminales. El objetivo de esta presente investigación es determinar la presencia de DVB a través de la aplicación del método de Elisa en las muestras obtenidas de las ganaderías del Cantón Santa Rosa. El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Cantón Santa Rosa de la Provincia de El Oro, realizándose en dos etapas, la Etapa I se tuvo lugar en las 3 ganaderías de leche ubicadas en el Cantón Santa Rosa. Las ganaderías "Nicvanna" ubicada a 1km Vía Puerto Jeli con sus coordenadas 3°25'49.6"S - 79°59'00.3"W, "Las Lomas" ubicada Vía la Troncal de la Costa, 2 km antes del restaurante Campestre con las coordenadas 3°30'10.6"S - 79°58'53"W, "Karfel" ubicada Vía Bella María, cerca al Estero Medina con coordenadas geográficas 3°28'11.7"S - 79°55'57,6"W. Y la etapa II se lo realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala. La metodología de este trabajo fue recolectar 145 muestras de las 3 ganaderías con una población total de 150 cabezas de ganado, proveniente del Cantón Santa Rosa, considerando animales que presentaron o no sintomatología de la posible infección en ellos estuvieron las vacas de ordeño, vacas secas, vaquillas y ternero. Las muestras se recolectaron en los tubos vacutainer tapa roja 10 ml y fueron transportadas en cadena de frio con geles a las instalaciones de la Universidad para su posterior centrifugación y separación el suero se almacenó hasta terminar el total de animales. Se realizó la técnica inmunoenzimatica de ELISA mediante un Kit comercial CIVTEST BOVIS BVD/BD P80 de la Marca HIPRA. El kit se basa en una Elisa de bloqueo debido a que está diseñado para detectar anticuerpos frente a una proteína específica presente en las cepas de BVD (PNE p80), el principio del el test es discriminar la presencia como resultado positivo (sin coloración) o ausencia como resultado negativo (aparición de color amarillo). Las variables de la presente investigación fueron animales enfermos (positivos, positivo bajos, negativo bajo y negativos), raza (mestizo, Brahamn mestizo, Pardo Suizo, Holstein, Gyr), edad (0-1,4 año; 1,5-5,4 años; 5,5-12 años), vacunación del animal (vacunados y no vacunados) y sexo (hembra y macho). La presente investigación dio como resultado un total de 16 animales positivos a la presencia de anticuerpos de diarrea viral bovina representando el 11,04% del total muestreado, considerado como positivo mientras que los Negativos son de 129 animales representados con un 88,97%. Se concluye la presente investigación con la determinación de la presencia del virus de diarrea viral bovina en el Cantón Santa Rosa a través de la técnica de Elisa (Enzyme Linked Inmunosorbent Assay). Se recomienda manejo, vacunación y ampliar este tipo de investigación por su importancia en toda la

Palabras claves: ELISA, Bovino, Diarrea, Anticuerpos, vDVB, Conjugado, Sustrato.

provincia y la determinación del virus por técnicas de respaldo molecular.

#### **ABSTRACT**

Seroprevalence study of bovine viral diarrhea (DVB), in the Santa Rosa Canton through Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Lida Alejandra Moreno Peña, Author

Bovine Viral Diarrhea is a disease that is found worldwide in all livestock being the main cause of major economic losses, as it significantly affects the reproduction of animals and is easily disseminated. The etiological agent is a Pestivirus of the family Flaviviridae belonging to an RNA virus with a protein nucleocapsid surrounded by a phospholipid membrane with structural and non-structural proteins. The virus can be transmitted vertically and horizontally by direct and indirect means, the indirect form being the primary source of infection transmitted by infected animals, fomites, transplacental or seminal fluids. The objective of this research is to determine the presence of BVD through the application of Elisa's method in samples obtained from livestock in Canton Santa Rosa. The present research work was carried out in Canton Santa Rosa of the Province of El Oro, being carried out in two stages, Stage I took place in the 3 dairy farms located in Canton Santa Rosa. The farms "Nicvanna" located at 1km Via Puerto Jeli with its coordinates 3°25'49.6"S - 79°59'00.3"W, "Las Lomas" located Via la Troncal de la Costa, 2 km before the restaurant Campestre with the coordinates 3°30'10.6"S - 79°58'53"W, "Karfel" located Via Bella María, near Estero Medina with geographical coordinates 3°28'11.7"S - 79°55'57,6"W. Stage II was carried out in the Molecular Biology Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the Technical University of Machala. The methodology of this work was to collect 145 samples from the 3 cattle farms with a total population of 150 heads of cattle, from Canton Santa Rosa, considering animals that presented or not symptoms of possible infection in them were milking cows, dry cows, heifers and calves. The samples were collected in the tubes vacutainer red cap 10 ml and were transported in cold chain with gels to the facilities of the University for its later centrifugation and separation the serum was stored until finishing the total of animals. The ELISA immunoenzymatic technique was performed using a commercial Kit CIVTEST BOVIS BVD/BD P80 of the HIPRA brand. The kit is based on a blocking Elisa because it is designed to detect

antibodies against a specific protein present in BVD strains (PNE p80), the principle of the test is to discriminate the presence as positive result (no coloration) or absence as negative result (appearance of yellow color). The variables of the present investigation were sick animals (positive, positive low, negative low and negative), race (mestizo, Brahamn mestizo, Brown Swiss, Holstein, Gyr), age (0-1.4 years; 1.5-5.4 years; 5.5-12 years), vaccination of the animal (vaccinated and unvaccinated) and sex (female and male). The present investigation gave as a result a total of 16 positive animals to the presence of antibodies of bovine viral diarrhea representing 11.04% of the total sampled, considered as positive whereas the Negatives are 129 animals represented with 88.97%. The present investigation is concluded with the determination of the presence of bovine viral diarrhea virus in Canton Santa Rosa through the technique of Elisa (Enzyme Linked Inmunosorbent Assay). It is recommended to manage, vaccinate and expand this type of research because of its importance in the whole province and the determination of the virus by molecular support techniques.

Keywords: ELISA, Bovine, Diarrhea, Antibodies, vDVB, Conjugate, Substrate.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	16
2. REVISIÓN DE LITERATURA	18
2.1. Diarrea viral bovina (dvb)	18
2.2. Etiología	18
2.3. Morfología	18
2.3.1. Proteínas virales	19
2.3.1.1. Estructurales	19
2.3.1.2. No estructurales	20
2.4. Clasificación	21
2.4.1. Biotipos	21
2.4.2. Genotipos	21
2.5. Patogénesis	22
2.5.1. Hospedador	22
2.5.2. Fuentes de infección	22
2.5.3. Transmisión	22
2.5.3.1. Transmisión vertical	22
2.5.3.2. Transmisión horizontal	23
2.6. Respuesta inmune	23
2.7. Signos clínicos	24
2.7.1. Infección aguda	24
2.7.1.1. Fase subclínica	25
2.7.1.2. Fase aguda	25
2.7.1.3. Fase aguda grave	25
2.7.1.4 Síndrome hemorrágico	25

2.7.2.	Infección congénita	26
2.7.3.	Infección persistente	26
2.7.4.	Enfermedad de las mucosa.	27
2.7.5.	Diarrea viral bovina crónica	27
2.8. Dia	agnóstico diferencial	28
2.9. Pre	evención y control	28
2.10. I	Diagnóstico de la diarrea viral bovina	29
2.10.1.	Aislamiento viral	30
2.10.2.	Inmunohistoquímica	30
2.10.3.	Técnica de seroneutralización (sn)	31
2.10.4.	Detección del ácido nucleico viral (pcr)	31
2.10.5.	Elisa de captura de antígeno	31
2.10.6.	Método inmunoenzimático (elisa)	32
3. DISEÑ	O METODOLÓGICO PRELIMINAR	33
3.1. Loc	calización de la zona de estudio	33
3.2. Ma	nteriales	36
3.2.1.	Material de campo	36
3.2.2.	Materiales de laboratorio	36
3.2.3.	Reactivos	37
3.3. Va	riables	37
3.4. Me	edición de variables	37
3.5. Me	etodología	39
3.5.1.	Análisis estadístico	39
3.5.2.	Población de la muestra	39
3.5.3.	Hipótesis de la investigación	40
3.5.4.	Muestreo de sangre	41
3.5.5.	Análisis por elisa	41

	3	5.5.5.1.	Descripción del kit	41
	3	3.5.5.2.	Protocolo corto	42
4.	. RE	SULTAD	OOS Y DISCUSIONES	45
	4.1.	Determi	nación de la presencia de anticuerpos virales en contra de dvb	en los
	anima	ales mues	treados	45
	4.2.	Determi	nación según el lugar de muestreo de los bovinos muestreados	47
	4.3.	Determi	nación según la edad de los bovinos muestreados	49
	4.4.	Determi	nación según el sexo de los bovinos muestreados	51
	4.5.	Determi	nación según los bovinos muestreados vacunados	52
	4.6.	Determi	nación según la raza de los bovinos muestreados	54
5.	. CO	NCLUSI	ONES	56
6	. RE	COMENI	DACIONES	57
7.	. BII	BLIOGR <i>A</i>	AFÍA	58
Q	ΛN	EVOS		67

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del virus de la Diarrea Viral Bovina (15)	19
Figura 2. Proteínas estructurales y no estructurales (20)	20
Figura 3. Signos clínicos de acuerdo a la presentación de la infección (12)	24
Figura 4. Diagnóstico diferencial del VDVB	28
Figura 5. Mapa del Cantón Santa Rosa (49).	33
Figura 6. Ubicación de la Ganadería Nicvanna	35
Figura 7. Ubicación de la Ganadería Las Lomas	35
Figura 8. Ubicación de la ganadería Karfel	35

# ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Ubicación Geográfica de las ganaderías del Cantón Santa Rosa34
Cuadro 2. Operacionalización de las variables
Cuadro 3. Resultados obtenidos de la presencia de anticuerpos contra la DVB45
Cuadro 4. Resultados de la presencia de anticuerpos contra DVB de acuerdo a su procedencia
Cuadro 5. Resultados de la presencia de anticuerpos contra DVB de acuerdo a la edad
Cuadro 6. Resultados de la presencia de anticuerpos contra DVB de acuerdo al sexo del animal
Cuadro 7. Resultados de la presencia de anticuerpos contra DVB de acuerdo a la vacunación del animal
Cuadro 8. Resultados de la presencia de anticuerpos contra DVB de acuerdo a la raza de los animales muestreados

# ÍNDICE DE GRÁFICO

Gráfico 1. Resultados obtenidos de la presencia de anticuerpos contra DVB en el
Cantón Santa Rosa
Gráfico 2. Representación de animales muestreados de acuerdo con el lugar de muestreo
48
Gráfico 3. Representación de animales muestreados de acuerdo con la edad50
Gráfico 4. Representación de animales muestreados de acuerdo al sexo del animal51
Gráfico 5. Representación de animales muestreados de acuerdo con el estado de vacunación
Gráfico 6. Representación de animales muestreados de acuerdo con la raza de los animales
wiiiiiwioo

# INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Materiales para toma de muestra	67
Anexo 2 - 3. Toma de muestra ganaderia Nicvanna	67
Anexo 4 - 5. Animales de la ganaderia Nicvanna	68
Anexo 6 - 7. Toma de muestra Ganaderia Las Lomas	68
Anexo 8 - 9. Animales de la ganderia Las Lomas	69
Anexo 10 - 11. Toma de muestra en la ganadería Karfel	69
Anexo 12 - 13. Animales de la ganaderia Karfel	69
Anexo 14 - 15. Reactivo de la prueba de elisa. Controles positivo y negativo	70
Anexo 16 - 17. Placas tapizadas de antigeno. Pipeta y puntas azules y amarillas	70
Anexo 18. Muestras de los animales en tubos tapa roja	70
Anexo 19 - 20. Centrifugacion de las muestras 3000 rpm/10min	71
Anexo 21 - 22. Separacion del plasma sanguineo en otro tubo	71
Anexo 23 - 24. Dilucion de las muestras con el diluyente (Vial 1)	72
Anexo 25 - 26. Incubacion de las muestras a 37°C/ 60 min	72
Anexo 27. Pocillos con las muestras incubándose	72
Anexo 28 - 29. Colocación de la solución de conjugado (vial 2) en los pocillos	73
Anexo 30. Placa con la solución de sustrato (Vial 3)	73
Anexo 31 - 32. Enjuage de los pocillos de las placas	73
Anexo 33. Secado de la placa con golpecitos en papel absorbente	74

Anexo 34. Colocación de la solución de paro (vial 4)
Anexo 35. Control P/N + Muestras 1-6 Ganadería Nicvanna
Anexo 36. Muestras 7-14 Ganadería Nicvanna
Anexo 37. Muestras Del 15-22 Ganadería Nicvanna
Anexo 38. Control P/N + Muestras 23-28 Nicvanna
Anexo 39. Muestras 1-8 Ganadería Las Lomas
Anexo 40. Control P/N + Muestras 9-14 Ganadería Las Lomas
Anexo 41. Muestras 15-22 Ganadería Las Lomas
Anexo 42. Muestras 23-30 Ganadería Las Lomas
Anexo 43. Muestras 31-38 Ganadería Las Lomas
Anexo 44. Muestras 39-46 Ganadería Las Lomas
Anexo 45. Muestras 47-54 Ganadería Las Lomas
Anexo 46. Control P/N + Muestras 55-59 Ganadería Las Lomas - 1 muestras G. Karfel
78
Anexo 47. Muestras 2-9 Ganadería Karfel79
Anexo 48. Control P/N + Muestras 10-15 Ganadería Karfel
Anexo 49. Muestras 16-23 Ganadería Karfel
Anexo 50. Muestras 24-31 Ganadería Karfel
Anexo 51. Muestras 32-39 Ganadería Karfel
Anexo 52. Muestras 40-47 Ganadería Karfel
Anexo 53 Control P/N + Muestras 48-53 Ganadería Karfel 81

Anexo 54. Control +Muestras 54-58 Ganadería Karfel	81
Anexo 55. Registro de animales muestreados en el Cantón Santa Rosa	82

# 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades víricas se encuentran a nivel mundial afectando a muchos ganaderos en especial la diarrea viral bovina que es una de las principales causas de pérdidas económicas ya que afectan de forma significativa la reproducción de los animales y es de fácil diseminación (1). Por lo que es necesario tener un conocimiento de la enfermedad para saber cómo enfrentarla y tener un control sanitario dentro de las ganaderías (2).

El virus de la diarrea viral bovina es un Pestivirus perteneciente a la familia Flaviviridae y se presenta en 4 especies, la dos primeras es el virus de la diarrea viral bovina 1 y 2, la tercera es la peste porcina clásica y por ultimo esta la enfermedad de las fronteras (3). Se estima que en muchas zonas ganaderas endémicas los animales son afectados con la enfermedad en un 60%, debido a que el virus puede permanecer dentro del hospedero, afectar al feto y causa inmunotolerancia (4).

En la actualidad existen diferentes causas para que exista un cuadro diarreico dentro de un establecimiento ganadero y se debe tener un cuadro exploratorio del animal para identificar los síntomas, porque pueden ser provocadas por plantas tóxicas, bacterias, parásitos o virus.

La enfermedad infecciosa de la diarrea viral bovina está ampliamente distribuida en todas las ganaderías del país y el mundo entero, esto se debe a que existe un manejo inadecuado de las haciendas ganaderas y falta de conocimiento para su prevención. La DVB es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad, provocando problemas reproductivos, pérdidas de peso entre otros síntomas. Haciendo que los ganaderos tengan grandes pérdidas económicas.

En la mayoría de los países se han realizado estudios para poder identificar la enfermedad de la diarrea viral bovina y se lo han realizado mediante la identificación de

anticuerpo o de antígeno por diferentes métodos de diagnóstico para mantener el control epidemiológico y así prevenir la enfermedad (5). La infección del virus ocasiona pérdidas en el rendimiento productivo del ganado o también por los gastos económicos que se realizan para su control y eliminación del virus (6).

Al presentarse dentro de la provincia una amplia cantidad de animales bovinos que están propensos a esta afección viral se hará un ensayo en uno de los cantones de la provincia, el cual será Cantón Santa y así poder identificar el virus de la familia Flavividae, el cual se determinará si existe la presencia de la enfermedad DVB dentro del Laboratorio con la técnica de alta especificidad y sensibilidad e inmunoenzimática de Elisa con el fin de determinar la existencia del virus en animales aparentemente sanos y persistentemente infectados para así aportar una ayuda a la prevención de la enfermedad.

#### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de DVB a través de la aplicación del método inmunoenzimático de Elisa de las muestras obtenidas de las ganaderías del Cantón Santa Rosa de la provincia de El Oro.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1. Estudio de la prevalencia de Diarrea Viral Bovina en el Cantón Santa Rosa
- Validar la técnica de diagnóstico ELISA para Diarrea Viral Bovina en el Laboratorio de la Universidad Técnica de Machala.
- Analizar la distribución epidemiológica espacial de la Diarrea Viral Bovina en el Cantón Santa Rosa

# 2. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1. Diarrea viral bovina (DVB)

La enfermedad de la diarrea viral bovina presente en muchas ganaderías del país es la que uno de los principales factores de pérdidas económicas en el campo ganadero, debido a que la causa un Pestivirus que afecta la salud del animal provocando diarrea, bronconeumonía, malformaciones, abortos, animales débiles y anoréxicos entre otros problemas (5,7). Esta causa es la que produce en toda ganadería un nivel bajo en los parámetros normales de producción y una déficit en la eficiencia reproductiva (8).

Debido a que es una enfermedad con una variabilidad de síntomas entéricos o respiratorios, pueden pasar de ser una enfermedad subclínica o convertirse en un problema grave que mataría al animal infectado, aquellos bovinos, ovinos, caprinos infectados que sobreviven al virus se convierten en los principales reservorios por lo tanto es vital que no se comercialice estos animales (9).

# 2.2. Etiología

El virus de la diarrea viral bovina es un pestivirus de la familia flaviviridae es decir que es un virus de ARN con envoltura (10). Las características principales del virus es su variabilidad y su maleabilidad por tener una falta de una exonucleasa que es capaz de corregir las secuencias genéticas erróneas (11).

# 2.3. Morfología

El VDVB es un virus de un tamaño pequeño y esféricos que miden de 40 a 60 nm de diámetro, se componen de una cadena simple de ARN compactada por una nucleocápside proteica rodeada por una membrana fosfolipídica con proteínas

estructurales y no estructurales (12,13), el genoma del virus tiene un aproximado de 12.3 kb de largo (14).

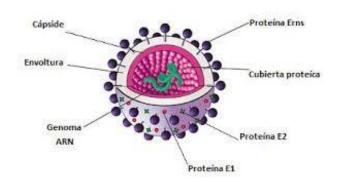


figura 1. Morfología del virus de la diarrea viral bovina (15)

2.3.1. Proteínas virales. El virus que presenta un genoma de ARN monocatenario es capaz de formar varias proteínas estructurales(16), y las proteínas que tiene presente el virus de la diarrea viral bovina son 12 en total son 4 estructurales y 8 no estructurales (17).

# 2.3.1.1. Estructurales

- La proteína viral estructural Erns la secreta células infectadas y se unirán en la periferie de la célula huésped (18).
- E1(GP48) es una glicoproteína que se encuentra en la envoltura nuclear y tiene una función enzimática de ARNasa (19).
- E2(GP53) glicoproteína de gran importancia porque es capaz de realizar producción de anticuerpos en contra de una vacunación o la infección y es altamente antigénica (19).
- C(P14) proteína que forma la cápside del virus y se encarga de mantener el ARN genómico (19).

## 2.3.1.2. No estructurales

- La proteína estructural Npro (p20) esta proteína es encargada de la proteólisis de la poliproteína del genoma, el gen P7 no se lo considera como una proteína estructural que es necesario para la infectividad (18)
- Las NS2 y NS3 (p80) realizan la codificación de una proteína que está presente en las cepas citopáticas desarrollando la enfermedad de las mucosas y además produce la serina proteasa y la helicasa (18,19)
- NS23(p125) es la proteína que ayuda a la replicación viral en el hospedero (19).
- La NS4A ayuda en la función y actividad de la serina y proteasas producidas por las NS2 y NS3 (18).
- La función de la ns4b es la replicación del genoma del virus y rediseño de la membrana del huésped
- La NS5A y NS5B son elementos del ARN polimerasa dependiente del complejo ARN (18).

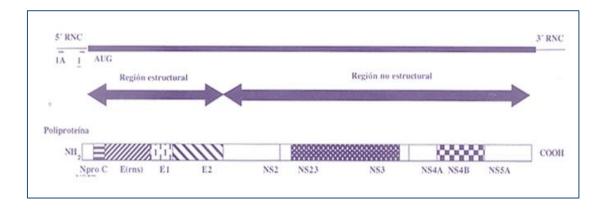


Figura 2. Proteínas estructurales y no estructurales (20)

El genoma del virus que presenta el ARN de cadena simple y esta se divide en 3 regiones: las regiones 3' y 5' no codificantes y una región media codificante (20)

#### 2.4. Clasificación

El virus de la diarrea viral bovina se presenta en genotipos 1 y 2 que representan diferencias en el genoma y los biotipos que son los citopáticos y los no citopáticos que hace referencia fenotípica del virus (10).

- 2.4.1. Biotipos. Los biotipos se dividen por su citopatogenicidad en vdvb citopático (CP) y no citopático (NCP) (21). Su clasificación depende de su capacidad de realizar una lisis celular en cultivos de tejidos del animal (22).
  - El virus citopático (CP) es el que causa daños en la estructura celular como son la vacuolización citoplasmática y llegando a causar muerte celular, por lo tanto el vdvb cp está estrechamente relacionado con el ncp de forma homóloga, debido a que al combinarse un animal pi con un CP dará como resultado la enfermedad de las mucosas (21,23).
  - El virus no citopático (NCP) no causa modificaciones en las estructuras de las células (21). Sin embargo, son capaces de atravesar la barrera placentaria provocando abortos, anomalías congénitas, la inmunotolerancia, problemas entéricos, respiratorio y hasta la obtención de animales persistentemente infectados, debido a que el virus NCP está ampliamente presente en las poblaciones bovinas (9,23).
- 2.4.2. Genotipos. Las cepas del virus DVB genotípicamente tiene una gran variabilidad y se dividen en dos tipos DVB tipo 1 (agrupados en 16 subtipos) y DVB tipo 2 (agrupados en 3 subtipos) que son los más conocidos aunque hay un DVB tipo 3 conocido como hobi-like virus es muy atípico (15,21), este virus es muy similar a las infecciones que se manifiestan en el DVB 1 y 2 (24).

DVB tipo 1 es uno de los genotipos que predominan en un 90 % a nivel mundial y representa mayor variabilidad en sus cepas (25). El virus DVB tipo 1 es responsable de procesos leves y con sintomatología inaparente, por lo que presenta lesiones moderadas en el aparato digestivo y en los órganos del sistema linfoide además de que causa patologías reproductivas (12)

DVB tipo 2 representa a la enfermedad aguda grave debido a que causa el síndrome hemorrágico en el animal, existiendo fiebre, trombocitopenia, linfopenia llegando a provocar muerte del animal por las constantes hemorragias agudas (12).

# 2.5. Patogénesis

- 2.5.1. Hospedador. Los pestivirus particularmente infectan solo al ganado vacuno que son ungulados del orden Artiodactyla, infectando a bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, camellos, alpacas, llamas, búfalos y rumiantes silvestres (12,26,27). El virus presenta una gran afinidad por el sistema reproductor y el sistema inmunitario como son las células linfocitarias y también por las epiteliales (28).
- 2.5.2. Fuentes de infección. Las principales fuentes de infección de la DVB es el hospedero mismo por su constante permanencia al diseminar el virus infectando a fetos o causar inmunotolerancia (4). Estos animales son persistentemente infectados IP y eliminaran a través de sus secreciones y excreciones como son: saliva, orina, heces, lágrimas, semen, leche y la secreción nasal, además se conocen otras fuentes de infección como son fetos abortados, placentas (10,29)
- 2.5.3. *Transmisión*. El virus de la diarrea viral bovina se puede transmitir de dos maneras: vertical u horizontal, por contacto directo e indirecto (12,30).
- 2.5.3.1. *Transmisión vertical*. La transmisión vertical de la VDVB puede ocurrir en las hembras gestantes lo cual se conoce como transmisión placentaria porque el virus

puede cruzar esta barrera e infectar al feto (12,30). Es una de las cualidades de esta transmisión es que genera animales persistentemente infectados ip, ya que las hembras gestantes se infectan entre los días 30 a 150 días y transmiten el virus de generación en generación (29). El estadio más contagioso del virus en los animales pi es a partir del primer o segundo día antes de aparecer la sintomatología clínica hasta el octavo o noveno día cuando ya son visibles los síntomas (31).

2.5.3.2. Transmisión horizontal. La transmisión horizontal del virus DVB ocurre por contacto directo o contacto indirecto con animales infectados: la transmisión directa es la primordial fuente de infección porque se da por inhalación e ingestión del virus a través de las secreciones nasales, oculares, uterinas, saliva, leche, semen, placenta o el líquido amniótico; la transmisión indirecta se da por vectores o fómites como insectos hemofílicos, narigueras, biberones, agujas contaminadas con sangre de un animal infectado (12,30).

Existe también una transmisión que es por transferencia de embrión de vacas pi, aunque la mayor cantidad de ooquistes permanecen sin infectar existe un porcentaje menor que estén infectados con VDVB por lo que se recomienda realizar lavados de los embriones antes de implantarlos, además cuando se realiza una inseminación artificial o natural se debe analizar el semen para determinar la infección (9).

# 2.6. Respuesta inmune

Los virus son organismos microscópicos que tienen la capacidad de multiplicarse dentro de una célula provocando que el animal enferme (32), el VDVB tiene una afinidad por sistema inmunológico provocando una fase de inmunosupresión por lo tanto el sistema inmune responderá con la presencia de células B y T dirigiéndose en contra de las proteínas estructurales y no estructurales del virus (13,19).

Además se puede tener la presencia de una subpoblación de los linfocitos T cooperadores 1 y 2 (TH1 y TH2) que es una respuesta especifica en contra del virus sin embargo el virus provoca una respuesta mediada por células que llevara a que las células presentadoras de antígeno ACP reduzcan su función en la estimulación de las células T (19,33).

# 2.7. Signos clínicos

Los signos clínicos que presente el animal dependerá del periodo de incubación que son de 3 a 10 días y un periodo virérmico entre 5 a 12 días, atacando a sus células y órganos diana para luego iniciar un periodo clínico (12).

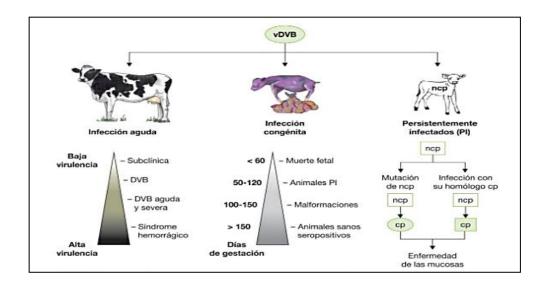


Figura 3. Signos clínicos de acuerdo a la presentación de la infección (12)

2.7.1. Infección aguda. La mayor parte de las infecciones de DVB que presenta el animal son agudas siendo estas subclínicas y de forma transitoria (34). Generalmente las infecciones agudas pasarán por distintos periodos, desde síntomas muy leves hasta graves en el animal y por lo general atacan a animales jóvenes (28). Debido a que presentaran una inmunosupresión de forma general y tendrán una disminución de las células linfocitarias en especial de las células T (35).

2.7.1.1. Fase subclínica. La mayoría de bovinos que se infecta por una cepa CP o NCP se presentará una infecciones subclínicas o de forma transitoria, en un porcentaje del 70 a 90% cuando tiene contacto con el virus, existiendo un aumento de temperatura muy leve además el animal presentará inmunosupresión debido a que existe una disminución de linfocitos (12,28,36).

2.7.1.2. Fase aguda. La infección aguda se presenta a partir de los 7 a 10 días en donde existe la excreción del virus a través de las secreciones del animal (9,28). Las primera manifestaciones clínicas en aparecer son la pérdida del apetito, fiebre, salivación, letargia, disminución láctea, tos, descargas oculonasales y diarrea leve, además de la presentación hematológica de la disminución de leucocitos, linfocitos y trombocitopenia (12,25).

En ocasiones suelen presentarse úlceras gastrointestinales u orales, una disminución de la tasa de fertilidad en machos y hembras, generalmente afectara animales inmunocompetentes de 6 meses a 2 años, esta fase aguda tiene una alta morbilidad pero existe una nula o baja de mortalidad de los animales (12).

2.7.1.3. Fase aguda grave. Esta fase es poco frecuente afectando a animales de todas las edades y existe una elevada morbilidad y mortalidad provocando en ocasiones la muerte del animal 48 horas tras la infección, las características de esta fase es la presencia de fiebre de 40 a 41°c, diarreas acuosas, ausencia en la secreción láctea, problemas respiratorios, úlceras a nivel oral, gastroenteritis y alteraciones en los órganos linfoides (12,31).

2.7.1.4. Síndrome hemorrágico. Es la evolución de la fases aguda grave presentándose una mortalidad próxima al 25%, el animal tendrá los siguientes síntomas fiebre alta, diarrea con sangre, secreciones mucosas y oculares, hemorragias petequiales, anemia,

equimosis de la mucosa, sangrado nasal y se mostrará un cuadro con niveles bajos de linfocitos, plaquetas y neutrófilos (12,31,37).

2.7.2. Infección congénita. Los efectos que causa la infección congénita dependerá de la etapa de gestación en donde se produce la infección ya que el virus es capaz de traspasar la barrera placentaria (9,25,28). El virus se desarrollara en esta etapa y se replicara dentro del feto y evitara que exista una respuesta inmune tanto fetal como maternal (38). Si el contagio del virus se da en los primeros 18 días de la vaca gestante, aun cuando no existe implantación del embrión no habrá una infección del feto (28).

Si se produce el contagio antes de los 25 a 40 días se producirá un aborto y en consecuencia muerte del feto o se producirán animales momificados y reabsorción embrionaria (12,25,28). Entre los 60 y 120 días (2 a 4 meses) el feto será un animal inmunotolerante a otra cepa del virus y será un PI que permanecerá como reservorio para que el virus sea transmitido (39). Los animales que son persistentemente in afectados tendrán una conversión alimenticia regular, son propensos a enfermedades y tendrán una elevada tasa de mortalidad (40).

En los 120 a 150 días de gestación el animal presentara un nacimiento con malformaciones hipoplasia cerebelar, poliencefalia, microcefalia, hidrocefalia, defectos esqueléticos como son la hipotricosis y la artrogriposis, alteraciones ópticas como la neuritis del nervio óptico, hipoplasia tímica y pulmonar existiendo un alto grado de mortalidad perinatal y abortos, sin embargo partir de los 150 días a más se darán nacimientos de animales débiles que por lo general mueren y otros nacen normales siendo seropositivos del VDVB (9,12,25,28).

2.7.3. Infección persistente. La tenencia de animales pi en una ganadería suele ser desapercibidos ya que estos animales no presentan signos clínicos de la enfermedad (41), por lo tanto diremos que un animal persistentemente infectado es aquel que se

infecta del virus en el primer trimestre de gestación y se convierte en un hospedero que presenta el virus y continúa infectando a otros animales, pues le consideran un reservorio ya que presenta grandes cantidades del virus en sus excreciones y secreciones como leche, saliva, sangre, orina, semen, se conocen que en algunos animales pi llegan a su madurez sexual y se reproducirá y el ganadero al utilizar animales para la reproducción deberá analizar al ganado para evitar la propagación del virus (9,28).

La presencia de animales de IP en el rebaño a menudo puede pasar desapercibida debido a que tales animales no siempre muestran signos clínicos y, por lo tanto, a menudo sirven como reservorio viral para exponer e infectar a los compañeros de rebaño susceptibles.

2.7.4. Enfermedad de las mucosas. Es una enfermedad mortal y se desarrolla a partir de una animal persistentemente infectado con un biotipo no citopático y se da una sobre infección con un biotipo citopático y mutarán, aunque esto es poco frecuente (9,28).

La enfermedad se caracteriza por presentar depresión del animal, anorexia, diarreas con presencia de sangre, secreciones mucopurulentas edema corneal, erupciones mucocutáneas, lesiones en la mucosa del aparato digestivo, enteritis fibrinosa, hemorragias en el tracto digestivo; la edad en el que son afectados son animales de 6 a 24 meses teniendo en cuenta que existe una bajo morbilidad y una alta mortalidad de 2 a 3 semanas después de la aparición de los síntomas (12,28).

2.7.5. Diarrea viral bovina crónica. Esta forma de presentación suele ser la repercusión de la enfermedad de las mucosas y se presenta por la aparición de intermitente diarreas, ulceraciones en las pezuñas y en la cavidad nasal y oral, el animal debilitado morirá en pocas semanas tras sufrir la infección (15).

# 2.8. Diagnóstico diferencial

La diarrea viral bovina presenta muchos síntomas, los cuales son el producto de la variabilidad de las cepas del virus provocando así problemas entéricos, respiratorios y entre otros (12).



Figura 4. Diagnóstico diferencial del VDVB

# 2.9. Prevención y control

El prevenir y controlar la infección es una de las medidas que deben tomar toda ganadería, se debe seguir un enfoque estratégico para impedir la entrada de la enfermedad, principalmente con el diagnóstico para tomar las mejores decisiones y así poder establecer las medidas preventivas contra la infección (7,25). Asegurando la eliminación de animales PI y realizar vacunaciones a animales susceptibles ante la infección para así tener una erradicación del virus (42).

- 1. Realizar una delimitación del lugar para evitar animales silvestres, controlar la entrada de personas y vehículos (25).
- 2. Evitar realizar iatrogenia por el uso inadecuado de instrumental de trabajo que se encuentre con fluidos de animales sospechosos (25).

- 3. Realizar un buen manejo a la entrada de animales nuevos como es realizar cuarentenas, evitar la compra de vacas gestantes, conocer el origen del animal y el manejo sanitario de la ganadería (25).
- 4. Identificación y remoción de los animales persistentemente infectados ya que son los principales diseminadores del virus (31).
- 5. Vacunación, inmunización estratégica a los 30 días post parto, cuando el rebaño es susceptible (31)
- 6. Las vacas adultas se vacunarán al año una o dos veces y que contengan los biotipo 1 y 2, mientas tanto los terneros se vacuna a los 4 o 8 meses y se revacunara a los 13 meses (43)
- 7. Inmunizar a los animales susceptibles (31)

Los estudios que se realizan en animales con niveles altos de exposición a la enfermedad DVB deben colocar programas de control y erradicación, como realizar anualmente un análisis de ELISA como una estrategia de vigilancia en contra del virus (44).

La exposición del ganado ante la presencia del VDVB a lo largo de su vida, hace que se realicen vacunaciones para proteger de la infección, sin embargo las vacunas con virus atenuados o inactivos pueden que no sean óptimos, por esta razón se están utilizando proteínas inmunodominates como sustito de vacunas (45).

## 2.10. Diagnóstico de la diarrea viral bovina

Básicamente los proyectos de control y erradicación se deben a las pruebas de diagnóstico debido a que existen un amplio tipo y severidad de lesiones y por lo tanto solo se podrán evidenciar por microscopia para identificar y eliminar animales pi por el VDVB, las pruebas se basan en el aislamiento del virus, detección del antígeno viral o los anticuerpos al presentarse el virus y la detección de ácido nucleico (13,28,30).

En general existen dos tipos de pruebas (13):

- A. Pruebas directas: estas pruebas se realizan con muestras obtenidas durante los tres primeros días de ser observados los síntomas clínicos, teniendo como objetivo utilizar los glóbulos blancos para aislamiento viral, detección de antígeno o genoma viral, en razón de que el VDVB tiene una gran afinidad por ellos (46).
- B. Pruebas indirectas: son las más utilizadas en el laboratorio ya que determinan la presencia de anticuerpos específicos contra el VDVB, siendo la seroneutralización (SN) y la prueba de Enzime Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (13,46)
- 2.10.1. Aislamiento viral. El método de aislamiento viral es uno de los más específicos por su alta sensibilidad, además de que es muy costoso y este método no puede diferenciar animales persistentemente infectados (15,19). Los paso a seguir para el aislamiento viral es trabajar con la línea celular que posee susceptibilidad al VDVB, ya que es un trabajo muy largo y será capaz de detectar anticuerpos ya sean mono o policlonales, se trabaja con muestras nasales, oculares, plasma, suero, sangre, fluidos seminales u órganos conservados de las necropsias como bazo, timo, hígado y pulmones ya que presentan cantidades altas de linfocitos (29).
- 2.10.2. Inmunohistoquímica. Esta prueba es útil para determinar el antígeno de la diarrea viral bovina a través de tejidos fijados en formol al 10% y parafinados de animales muertos, tomando en cuenta que la muestra no sobrepase un periodo no más de un día y estas se la realiza con tejidos como piel, hipófisis, placentas, ganglios linfáticos, corazón, estómagos, hígado entre otras (32). Esta técnica es un poco más metódica y es necesario que lo realice un técnico para evitar errores (28), pero esto nos permite muy buenos resultados en comparación con las muestras sanguíneas que tienen un mayor riesgo de falsos positivos (15).

Muy brevemente describimos la técnica con biopsias realizadas en el pabellón auricular del animal con medidas de 1cm de ancho por 0,5 cm de largo por lo general es en la punta de la oreja, se desinfecta con yodo y se realiza la recolección en un tubo de ensayo lleno de formol al 10% durante 24 h, y se realiza la deshidratación con alcohol etílico de forma creciente para luego ser aclarado con xilol y se lo incluye en parafina para posteriormente obtener cortes e 5 micrómetros y se realiza la inmunohistoquímica el tejido (32).

- 2.10.3. Técnica de seroneutralización (SN). Esta técnica consiste en la identificación de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina (15), ya que identifica la capacidad que tiene los anticuerpos para neutralizar o inhibir la cepas del virus por medio de diluciones (19). El efecto protector que tiene el suero es gracias a los anticuerpos que neutralizaran al antígeno, en caso de animales virémico inmunocompetente tienen una disminución de los anticuerpos lo cual hace que esta técnica sea poco efectiva para determinar animales con VDVB (47).
- 2.10.4. Detección del ácido nucleico viral (PCR). El método de diagnóstico de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) presenta una alta sensibilidad y es muy rápido, lo cual nos permite realizarlo en pool de sangre o hasta en muestras de tanque de leche en grandes cantidades y en menor tiempo, aunque se conoce que debido a su sensibilidad da falsos positivos(15,19). El método consiste en realizar copias de un ADN molde que se unirán al ácido nucleico del virus a través de una enzima transcriptasa reversa que amplificará el ARN vírico (15,28).
- 2.10.5. Elisa de captura de antígeno. El método diagnóstico de ELISA de captura es el cual atrapa a los anticuerpos monoclonales para capturar el antígeno de la diarrea viral bovina en las muestras sanguíneas que se hayan recogido del animal, esta prueba es económica y rápida y se la utiliza para detectar en especial a los animales persistentemente infectados (15,19).

En la placa de ELISA se encuentra adherido los anticuerpos monoclonales que capturaran al antígeno viral del suero sanguíneo, se lo combina con un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa, dando como resultado la unión antígeno/anticuerpo en el cual se observará un cambio de coloración para las muestras positivas, ya que se ha visto que la sensibilidad y especificidad son muy alta en este método de diagnóstico (19)

2.10.6. Método inmunoenzimático (ELISA). Es una de las técnicas más utilizadas en la medicina veterinaria ya que nos permite analizar el sistema inmunitario e identificar el agente infeccioso presente en el animal (32), debido a su sensibilidad y especificidad en la identificación de anticuerpos el cual da una facilidad para trabajar gran cantidad de muestras en muy corto tiempo (48).

La técnica trabaja empleando el anticuerpo específico unido a una enzima que identificara la presencia de animales infectados por el virus, se determinará con la presencia del color al agregar un sustrato que reaccionara con la enzima presente en el anticuerpo, para la lectura se utilizará espectrofotómetro y según la coloración intensa u opaca se deberá a la cantidad del anticuerpo unido al antígeno (15,32).

- ❖ Elisa competitivo consiste en que el anticuerpo que tiene la muestra competirá con el conjugado para unirse al antígeno, debido a esto cuando se agregue el sustrato no se encontrara la enzima que está presente en el anticuerpo ya que este ha sido reemplazado por el conjugado dando así una muestra positiva al no haber presencia de color (32).
- ❖ Elisa no competitivo esta consiste en formar el complejo antígeno anticuerpo que al añadir el conjugado tendrán una reacción con el sustrato que al encontrar la enzima darán una coloración y existen dos tipos, los que determinarán al antígeno siendo los directos y los que determinarán a los anticuerpo siendo los indirectos (32).

# 3. DISEÑO METODOLÓGICO PRELIMINAR

# 3.1. Localización de la zona de estudio.



Figura 5. Mapa del Cantón Santa Rosa (49).

• Latitud: 3° 27′ 08″ S

• Longitud: 79° 57′ 42″ W

• Altitud media: 8-13 m s.n.m.

• Temperatura: 26°C aprox.

Humedad relativa: 90%

Santa Rosa es uno de los cantones de la Provincia de El Oro, con una extensa población y con una superficie de 889.3 km2, que se localiza en la región Litoral del Ecuador a 8 - 13 m.s.n.m., está delimitada al norte con los cantones Machala y Pasaje, al sur con el cantón Piñas, al oeste con el cantón Arenillas y el Océano Pacífico y al este con el cantón Atahualpa

Presenta una humedad relativa del 90 % y puede llegar a una temperatura de 26°c por su clima lluvioso tropical. El uso de sus tierras las dedican en mayor parte a la actividad ganadera y agrícola. El cantón Santa Rosa está conformada por 8 parroquias que son: Santa Rosa, Bellavista, La Avanzada, La Victoria, San Antonio, Torata, Bellamaría y Jambelí

Las ganaderías del Cantón Santa Rosa donde se realizó el respectivo muestreo de los animales se encuentran: Ganaderías "Nicvanna" ubicada a 1km Vía Puerto Jeli con sus coordenadas 3°25'49.6"S - 79°59'00.3"W, "Las Lomas" ubicada Vía la Troncal de la Costa, 2 km antes del restaurante Campestre con las coordenadas 3°30'10.6"S - 79°58'53"w, "Karfel" ubicada Vía Bella María, cerca al Estero Medina con coordenadas geográficas 3°28'11.7"S - 79°55'57,6"W.

Cuadro 1. Ubicación Geográfica de las ganaderías del Cantón Santa Rosa

Hacienda	Propietario	Coordenadas	Población bovina
G. Nicvana	Dr. Iván Ludeña	3°25'49.6"S 79°59'00.3"W	30
G. Las Lomas	Shuber Muñoz Durán	3°30'10.6"S	74
		79°58'53"w	
G. Karfel	María Fernanda Noblecilla	3°28'11.7"S 79°55'57,6"W	70



Figura 6. Ubicación de la Ganadería Nicvanna

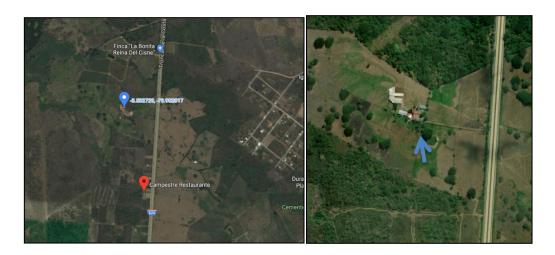


Figura 7. Ubicación de la Ganadería Las Lomas



Figura 8. Ubicación de la ganadería Karfel

Además del estudio de campo se realizó el estudio de laboratorio en la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Machala, localizado en la ciudad de Machala de la provincia de El Oro, con sus coordenadas geográficas: Latitud: 3°17' 16", longitud: 79°54' 05", ubicada a una altitud de 5 m.s.n.m y con una temperatura que oscila entre 22 a 35°C.

#### 3.2. Materiales.

# 3.2.1. Material de campo

- Overol
- Botas de caucho
- Marcador permanente
- Guantes de examinación
- Alcohol
- Capuchón para tubos al vacío
- Agujas de toma múltiples #20, #21
- Vacutainer 10ml
- Cooler
- Geles Fríos
- Recipiente de desechos corto punzantes

#### 3.2.2. Materiales de laboratorio

- Mandil
- Centrífuga
- Micro Pipeta de precisión 10-100 ul
- Micro Pipeta de precisión 100-1000 ul
- Cronómetro
- Puntas de pipetas Azules y amarillas
- Agua destilada
- Adhesivos para cubrir microplacas
- Papel absorbente

• Kit DVB Elisa de bloqueo CIVTEST Bovis BVD/BD P80 marca Hipra

#### 3.2.3. Reactivos

- Placas tapizadas con antígenos BVDV
- Control positivo en suero y leche
- Control negativo en suero y leche
- Solución de lavado
- Diluyente de sueros
- Solución de Conjugado
- Solución de Sustrato TMB
- Solución de frenado o paro

#### 3.3. Variables

- Edad
- Lugar de muestreo
- Sexo
- Raza
- Estado de vacunación
- Animales enfermos de DVB

## 3.4. Medición de variables

**Estado de vacunación:** se evalúa el estado de vacunación del animal de la forma Si vacunado, No vacunado.

**Edad:** se evaluó la edad de los animales por grupos de la siguiente forma. Grupo A (0-1,4 año), Grupo B (1,5 a 5,4 años) y Grupo C (5,5 a 12 años)

**Sexo:** la variable categórica nominal del sexo del animal, se lo evaluó como Machos y Hembras

Raza: la evaluación de la raza se la determino si son raza Pardo suizo, Brahman mestizo, Gyr, Holtein mestizo o mestizo

**Animales enfermos de DVB:** se evaluó la presencia de anticuerpo en contra del virus y se la mide por su coloración. Positivo alto, positivo medio, positivo Bajo y Negativo

Cuadro 2. Operacionalización de las variables

Variable	Indicador	Dato final de medición	Tipo de variable
	(peso/balanza)		
Lugar del muestreo	Ubicación	G. Nicvanna G. Las Lomas G. Karfel	Categórica nominal
Vacunación del animal	Vacunación	Si, vacunado No, Vacunado	Categórica nominal
Edad	Edad en Grupos de animales	Grupo A: 0-1,4 Años Grupo B: 1,5 – 5,4 años Grupo C: 5,5-12 años	Categórica ordinal
Sexo	Tipo de sexo	Hembra o Macho	Categórica nominal
Raza	Tipos de Razas	Pardo suizo, Bhaman mestizo, Holstein, Gyr Mestizo	Categóricas nominal
Animales enfermos DVB	Coloración de la muestra	Positivo: sin coloración Positivo bajo: coloración amarillo pálido Negativo bajo: amarillo Negativo: Amarillo intenso	Categórica nominal

## 3.5. Metodología

La presente investigación pretende muestrear animales del Cantón Santa Rosa que se dediquen a la ganadería a nivel de la Provincia de El Oro y en donde se produce la mayor cantidad de carne y leche para el consumo y la industrialización, además este cantón es uno de los que produce una considerable movilización y concentración de animales de diferentes partes del País, hecho importante de considerar para el entendimiento de la epidemiología de la enfermedad a nivel local, regional y nacional. En el cantón Santa Rosa se dará referencia a que se realice un muestreo de 3 fincas modelos que reúnan las características para un adecuado trabajo de muestreo.

Para la determinación del virus de la DVB se realiza un muestreo al azar de los animales analizar, se utilizará el plasma sanguíneo, las que serán recolectadas de la vena coccígea o yugular con los tubos vacutainer tapón rojo sin anticoagulante, llevándolos en un termo al laboratorio donde se centrifugará la muestra. Se utilizará un kit comercial inmunoenzimático de bloqueo para la detección de anticuerpo ante la presencia de DVB.

- 3.5.1. Análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó mediante estadística descriptiva en la cual se consideró la frecuencia de cada una de las variables obtenidas en las parroquias del cantón Santa Rosa, y estos datos recolectados de la investigación se incorporaron en una base de datos de Excel, para lo cual se determinó porcentajes apoyándose en cuadros y figuras para una mejor comprensión.
- 3.5.2. Población de la muestra. El número para el cálculo de la muestra es a partir de una población de 174 animales pertenecientes al total de animales de las ganaderías muestreadas en el Cantón Santa Rosa. Y se determinó una muestra de 120 animales para la estimación de nuestra investigación, calculándola con la formula correspondiente con un intervalo de confianza del 95% y una estimación de error del 0.05%. Sin embargo se tomó más animales para el muestreo llegando a tener 145 muestras con la finalidad de mejorar la investigación dentro de cada ganadería.

Formula:

$$n = \frac{N}{1 + \frac{e^2 2(N-1)}{z^2 (p*q)}}$$

**Donde:** 

N= Tamaño de la muestra

Z= Nivel de confianza deseado (0,95%=1,96)

P= Proporción de la población con la característica deseada (éxito) (0.50)

Q= Proporción de la población sin la característica deseada (fracaso) (0.50)

E= nivel de error dispuesto a cometer (0.05)

N= tamaño de la población 174

$$n = \frac{174}{1 + \frac{0.05^2(174 - 1)}{1.96^2(0.25)}}$$

$$n = \frac{174}{1 + \frac{0.4325}{0.9604}}$$

$$n = \frac{174}{1.45}$$

$$n = 120$$

# 3.5.3. Hipótesis de la investigación

**Ho:** El virus de la Diarrea Viral Bovina no tiene circulación epidemiológica en el Cantón Santa Rosa de la provincia de El Oro

**Ha:** El virus de la Diarrea Viral Bovina no tiene circulación epidemiológica en el Cantón Santa Rosa de la provincia de El Oro

3.5.4. Muestreo de sangre. Los animales a tomarse en consideración para el muestreo están las vacas de ordeño, vacas secas y becerros recién nacidos hasta un año de edad que haya o no presentado síntomas de la posible infección. Se obtendrá la muestra en un tubo vacutainer de 10ml y conservarse hasta que se realice el respectivo análisis. Los animales jóvenes que resulten positivos a la prueba deberán ser sometidos a un segundo análisis para diferenciar infección transitoria de animales persistentemente infectados (IP). Los análisis se realizarán en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala, Ecuador.

3.5.5. Análisis por ELISA. El Elisa competitivo es una herramienta útil para conocer el diagnóstico del hato ganadero y saber si presenta la enfermedad ya que hace posible la detección de animales en estadios tempranos de la infección. Elisa se fundamenta en el uso de antígeno o anticuerpo marcados por una enzima, para que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. (47).

3.5.5.1. Descripción del kit. Se utilizará un kit de la marca CIVTEST BOVIS BVD/BD P80 de la Marca HIPRA. Este kit se basa en un Elisa de bloqueo debido a que está diseñado para detectar anticuerpos frente a una proteína específica presente en todas las cepas de BVD y BDV (proteína no estructural p80). Las placas están tapizadas con un antígeno inactivo de BVDV. El sistema indicador para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra la p80, en las muestras es un anticuerpo monoclonal conjugado a peroxidasa específico de la p80 (ACM-p80).

En el caso de una muestra negativa, que no contenga anticuerpo contra la p80, ningún anticuerpo de la muestra se unirá a la p80 adherida al pocillo y así, posteriormente, el ACM-p80/HRPO podrá unirse a esta. La posterior adicción de un sustrato cromogénico específico de la peroxidasa permitirá poner de manifiesto la presencia del acm-p80/HRPO en el pocillo siguiendo la absorbancia a 450nm.

En el caso de una muestra positiva, los anticuerpos contra la p80 presente en la misma se unira a la p80 adherida al pocillo, bloqueando de este modo la posterior unión del acm-p80/HRPO, que será más tarde lavado del pocillo. Mediante este principio, el test discrimina entre la presencia (resultado positivo, sin coloración) o ausencia (resultado negativo, aparición de color amarillo) de anticuerpo anti-p80 en las muestra analizadas. En ningún caso tiene la capacidad de detectar los anticuerpos consecuencia de la vacunación a virus muerto.

#### 3.5.5.2. Protocolo Corto

## Preparación de los reactivos

Equilibrar los reactivos a temperatura ambiente antes de comenzar el procedimiento del ensayo. Solución de lavado (10x) (Vial N°0): para reconstituirla añadir 1 volumen de solución de lavado (10x) a 9 volúmenes de agua destilada o desionizada.

## Preparación de las muestras

Tanto los controles Positivos y Negativos suero (viales N°5 y N°6 como las muestras de suero individual de los animales deben diluirse 1/10 ul en solución diluyente de suero (Vial N°1).

## Desarrollo del ensayo

- 1. Despegue la cubierta adhesiva de plástico agregue:
- Suero: dispensar 100 μl tanto de los control negativo y positivo diluidos 1/10 como de las muestras diluidas 1/10 en solución diluyente de suero (vial Nº1) a los pocillos apropiados en la placa.
- 3. Cubra la placa con una cubierta adhesiva e incubar:
- 4. Protocolo corto: 60 minutos a + 36  $^{\circ}$  C + 38  $^{\circ}$  C.

- 5. Retire el adhesivo y realizar el lavado de las placa 4 veces con 300 μl de solución de lavado diluida. Al final, invertimos la placa y la golpeamos firmemente sobre papel absorbente
- 6. Añadir 100 μl de solución de conjugado (Vial N°2) a cada pocillo.
- Cubrir la placa con una cubierta adhesiva e incubar durante 60 minutos a + 36°c
   + 38°c.
- 8. Retirar el adhesivo y realizar 4 lavado de cada pocillo con 300 μl con solución lavado diluido. Al final, invertir la placa y golpearla firmemente sobre papel absorbente.
- 9. Dispensar en cada pocillo 100 μl de solución de sustrato (Vial N°3). Agitar suavemente la placa durante 2 segundos.
- 10. Sellar la placa con una tapa adhesiva e incubar a temperatura ambiente (+  $20 \,^{\circ}$  C +  $25 \,^{\circ}$  C) en la oscuridad durante 10 minutos
- 11. Quitar la tapa adhesiva y dispensar en cada pocillo 100 μl de solución de paro (Vial N°4). Agitar golpeando ligeramente el flanco de la microplaca.
- 12. Limpiar la superficie inferior de la placa con papel absorbente. Leer la placa utilizando un lector de Elisa equipado con un filtro 450nm. Realizar previamente el blanco con el aire.

## Interpretación de resultados en suero individual

Valoración por coloración	Interpretación muestra	Animales
	Negativa	Libre de DVB o IPI
	Positivo bajo	Sospechoso (++) DVB

Positiva intermedio	Sospechoso (+++)DVB
Positiva alto	Infección DVB

Se considerara de acuerdo a la coloración a los animales positivos a las categorías positivos alto y positivo intermedio y a los animales a considerarse negativos serán los positivos bajos y los negativos.

# 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

La investigación de la presencia de anticuerpos en contra de la Diarrea viral Bovina en el Cantón Santa Rosa, determinaron los siguientes resultados.

# 4.1. Determinación de la presencia de anticuerpos virales en contra de DVB en los animales muestreados.

Del total de 145 animales muestreados, sometidos a la prueba de ELISA se obtuvieron resultados 7,59% (11 animales) positivos altos, 3,45% (5 animales) positivos medio, 2,07% (3 animales) positivo bajos y 86,90% (126 animales) negativos a la presencia de anticuerpos contra el VDVB.

Cuadro 3. Resultados obtenidos de la presencia de anticuerpos contra la DVB

RESULTADOS OBTENIDOS	NUMERO DE MUESTRAS	PORCENTAJE %
POSITIVO ALTO (++++)	11	7,59%
POSITIVO INTERMEDIO (+++)	5	3,45%
POSITIVO BAJO (++)	3	2,07%
NEGATIVO (-)	126	86,90%
TOTAL	145	100,00%

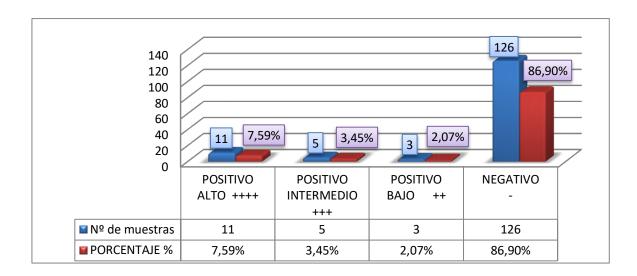


Gráfico 1. Resultados obtenidos de la presencia de anticuerpos contra DVB en el Cantón Santa Rosa

**Fuente:** Autor

Las enfermedad de la diarrea viral bovina se encuentra presente en los diferentes hatos ganaderos a nivel mundial y según la investigación dentro del Cantón Santa Rosa existe un porcentaje del 7,59% de animales Seropositivos, 3,45% de positivos intermedios y un porcentaje de 2,07% de animales con un positivo bajo que son sospechosos a la enfermedad, sin embargo Abad 2016 indica que Estados Unidos presento un 89% de animales con VDVB y estudios en México indica que existen un mayor porcentaje en el centro del país con 73,2 % y un porcentaje del 12,27% en la parte sur (2). Valdez, 2018 expresa que en Cusco- Perú existe una prevalencia del 50,8% de animales que presentan los anticuerpos contra el virus (50), también mediante investigaciones Labanda 2015 indica que la provincia de Loja presentando una total de seroprevalencia de 29% en los bovinos lecheros (51).

Por lo tanto el porcentaje de la investigación difiere de los datos estadísticos de otros autores por lo que infiere que el manejo del ganado a nivel del Cantón no ha mejorado de todo ya que aún existe presencia del virus dentro de la zona pero de forma controlada. Pero debemos tomar en cuenta el motivo de preocupación si existe un animal infectado ya que produce infección ha sido asociada con el aborto epidémico en ganado de leche, además la forma de transmisión vertical hace que la infección se perpetúe en los hato de forma rápida (52).

# 4.2. Determinación según el lugar de muestreo de los bovinos muestreados

En el Cuadro 4, se presenta el número de animales muestreados de acuerdo a la ubicación dentro del Cantón Santa Rosa y que fueron sometidos a la prueba de ELISA dando como resultados de los 28 animales procedentes de la ganadería Nicvanna, positivos altos 2 animales (1,38%), positivos intermedios 3 animales (2,07%), positivos bajos 1 animal (0,69%) y negativos 22 animales (15,17%); de los 59 animales procedentes de la ganadería Las Lomas, positivos altos 1 animal (0,69%), positivos intermedios 0 animales (0%), positivos bajos 1 animal (0,69%) y negativos 57 animales (39,31%); de los 58 animales procedentes de la ganadería Karfel positivos altos 8 animales (5,52%), positivos intermedios 2 animales (1,38%), positivos bajos 1 animal (0,69%) y negativos 47 animales (32,41%), los porcentajes también son expresados en la Gráfico 2.

Cuadro 4. Resultados de la presencia de anticuerpos contra DVB de acuerdo a su procedencia

			Resultados				
GANADERIAS	N° DE ANIMALES	%	%TOTAL	Positivos altos (++++)	Positivo intermedio (+++)	Positivo bajo (++)	Negativo
NICVANNA	28	19,31%	1,38%	2,07%	0,69%	15,17%	
LAS LOMAS	59	40,69%	0,69%	0%	0,69%	39,31%	
KARFEL	58	40%	5,52%	1,38%	0,69%	32,41%	
TOTAL	145	100,00%	7,59%	3,45%	2,07%	86,90%	

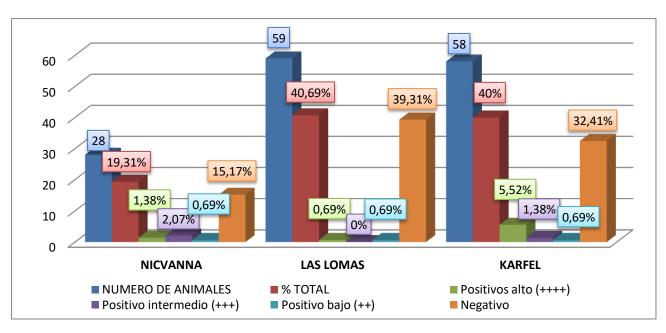


Gráfico 2. Representación de animales muestreados de acuerdo con el lugar de muestreo

Fuente: Autor

Los datos de la investigación de animales seropositivos en el lugar de muestreo que son las 3 ganaderías pertenecientes al Cantón Santa Rosa se determina que el mayor porcentaje de animales con presencia de anticuerpos es la ganadería Karfel sumando todos los positivos en consideración a la investigación dan un total de 6,9% (5,52 + 1,38) de animales seguido de la ganadería Nicvanna con un total de 3,45% de animales con la infección y sospechosos y por último la Ganadería Las Lomas con dos animales dando 0,69%. Se considera que por cada hato ganadero existe un animal infectado o sospechoso, así como lo indica Valdez 2018 que la amplia distribución del virus en los animales de los hatos muestreados indica que existen factores que contribuyen directa o indirectamente a la difusión del virus (50).

Según Labanda, 2015 tomando en cuenta los resultados anteriores y actuales de la seroprevalencia de VDVB, debido que la enfermedad aumenta de forma gradual y en muchos casos es subclínica, es decir asintomática diseminándose fácilmente, siendo casi imperceptible por el ganadero o el mismo veterinario y la falta de estudios serológicos de rutina de esta enfermedad que a veces no son realizados por su alto costo terminan

presentándose perdidas económicas al ganadero por no tomar las medidas necesarias (51).

# 4.3. Determinación según la edad de los bovinos muestreados

Según los 145 animales muestreados para la prueba de Elisa, que se representa en el cuadro 5, de acuerdo a la edad de 0-1,4 años positivos altos (0,69%), positivos intermedios (0%), positivos bajos (0,69%) y negativos (2,07%); de 1,5-5,4 años positivos altos (3,45%), positivos intermedios (2,07%), positivos bajos (1,38%) y negativos (64,14%); de 5,5 -12 años positivos altos (3,45%), positivos intermedios (3,45%), positivos bajos (2,07%) y negativos (86,90%); los porcentajes también son expresados en la Gráfico 3.

Cuadro 5. Resultados de la presencia de anticuerpos contra DVB de acuerdo a la edad

			tados			
EDAD	N° DE MUESTRAS	% TOTAL	Positivos altos (++++)	Positivo intermedio (+++)	Positivo bajo (++)	Negativo
0-1,4 AÑOS	5	3,45%	0,69%	0%	0,69%	2,07%
1,5 -5,4 AÑOS	103	71,03%	3,45%	2,07%	1,38%	64,14%
5,5 12 AÑOS	37	25,52%	3,45%	1,38%	0%	20,69%
TOTAL	145	100,00%	7,59%	3,45%	2,07%	86,90%

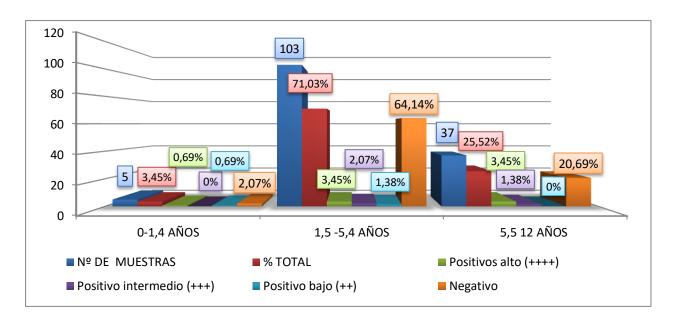


Gráfico 3. Representación de animales muestreados de acuerdo con la edad

Fuente: Autor

Se agrupo a los animales muestreados en tres categorías las cuales en las categoría de 0 a 1,4 año existe infección en un porcentaje menor. Por otra parte Escudero, 2013 indica que en estudios realizados en la provincia de Azuay, Manabí, Santo Domingo, Cotopaxi y Chimborazo mencionan que no se realizaron muestreos animales menores de 6 meses debido a que existiría una interferencia con los anticuerpos maternales y se evita falsos positivos (15).

Por lo tanto los animales que tiene un porcentaje mayor de positivos y sospechosos son los que están en los rangos de edad de 1,5-.5,4 y 5,5-12 años debido a su mayor porcentaje 5,52% y 4,83% respectivamente. Escudero, 2013 se mostraron en otros estudios en Argentina que existe una alta prevalencia de anticuerpos en vacas adultas y que los bovinos menores de 12 meses son propensos al virus, por lo tanto el autor de estos animales enfatiza que existe animales con un porcentaje del 17,14% y estos son mayores a 5 o 8 años lo cual valida nuestra investigación. Esto se debe a que están pasando por su edad reproductiva y pueden diseminar con mayor rapidez el virus (15).

## 4.4. Determinación según el sexo de los bovinos muestreados

De acuerdo 145 animales muestreados para la prueba de Elisa por su sexo, lo expresamos en el Cuadro 6, las hembras representan el 7,59% de positivos altos 3,45% de positivos intermedios, 2,07% de positivos bajos y el 85,52% negativos; los machos representan el 0% de positivos altos 0% de positivos intermedios, 0% de positivos bajos y el 1,38% negativos, representados en el Gráfico 4.

Cuadro 6. Resultados de la presencia de anticuerpos contra DVB de acuerdo al sexo del animal

			Resultados				
SEXO	N° DE ANIMALES	% total	Positivos altos (++++)	Positivo intermedio (+++)	Positivo bajo (++)	Negativo	
HEMBRA	143	98,6%	7,59%	3,45%	2,07%	85,52%	
МАСНО	2	1,4%	0%	0%	0%	1,38%	
TOTAL	145	100,0%	7,59%	3,45%	2,07%	86,90%	

Fuente: Autor

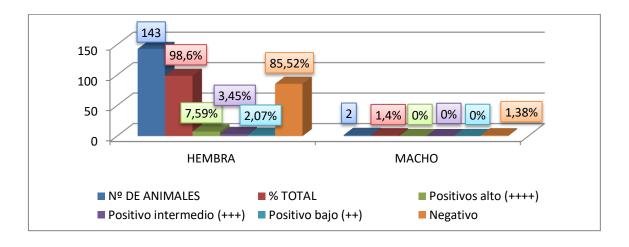


Gráfico 4. Representación de animales muestreados de acuerdo al sexo del animal

De acuerdo a nuestra gráfica las hembras y los machos no tiene una igualdad en el muestreo debido a que solo existen 2 animales machos con el 1,4% y el resto son hembras 98,6% por lo tanto se realizó una estadística descriptiva

Sin embargo Valdez, 2018 indica que en su investigación los anticuerpos contra el VDVB fueron detectados en porcentajes similares en hembras y machos de todas las razas (50), pero Huaylla, 2018 difiere con lo dicho por lo que indica que este agente patógeno constituye una de las causas más importantes de las fallas reproductivas y se observa una leve superioridad en hembras porque están en constante contacto con sus madres en el hato a comparación de los machos que están aislados del establo (53).

## 4.5. Determinación según los bovinos muestreados vacunados

La prueba de Elisa realizada a los 145 de animales determina que el resultado de anticuerpos encontrados de acuerdo a su estado de vacunación es: vacunadas con un 0% de positivos, 0% de positivos bajos, 0,69% de negativos bajos y el 37,93% negativos; no vacunadas el 1,38% de positivos, 6,21% de positivos bajos, 3,45% de negativos bajos y 50,34% de negativos.

VACUNACIÓN	N° DE ANIMALES	% TOTAL	Positivos alto (++++)	Positivo intermedio (+++)	Positivo bajo (++)	Negativo
VACUNADAS	56	38,62%	0%	0%	0%	38,62%
NO VACUNADAS	89	61,38%	7,59%	3,45%	2,07%	48,28%
TOTAL	145	100,00%	7,59%	3,45%	2,07%	86,90%

Cuadro 7. Resultados de la presencia de anticuerpos contra DVB de acuerdo a la vacunación del animal.

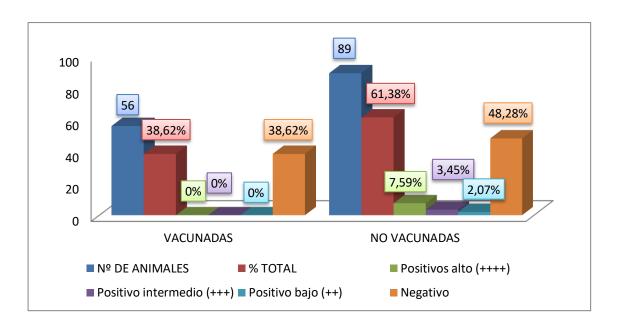


Gráfico 5. Representación de animales muestreados de acuerdo con el estado de vacunación

Fuente: Autor

En la investigación existen animales previamente vacunados en contra del virus pero se toma en cuenta el periodo de inmunización del animal y la vacunación con virus muerto y por lo tanto existe un 61,38% de animales no vacunados, obteniendo 7,59% y 3,45% de animales positivos y sospechosos respectivamente. La prueba de Elisa contra el VDVB p80 no difiere de la investigaciones según Buitrago, 2018 que los hatos que son vacunados con virus vivo modificado no ofrecerán resultados veraces del estado de infección de los animales, dado que los anticuerpos vacunales son detectados con esta proteína estructural del virus, pero si los hatos que son vacunados con virus muerto o que no vacunan salen negativos a la prueba diagnóstica contra VDVB p80, pueden sugerir ausencia de infección en los animales (5). Y cabe mencionar que en una investigación anterior Buitrago, 2015 indica que la prueba diagnóstica que detecta anticuerpos frente la proteína p80, está basado en el principio de competición entre el anticuerpo bovino y una peroxidasa unida a un anticuerpo monoclonal anti-p80 y que en ningún caso, tiene la capacidad de detectar los anticuerpos consecuencia de la vacunación a virus muerto (54).

## 4.6. Determinación según la raza de los bovinos muestreados

Los resultados estadísticos de acuerdo a las razas representadas en el Cuadro 8, dando un total de 145 animales muestreados. En el Gráfico 6, se representan los porcentajes correspondientes: mestizas 3,45% de positivos altos, 1,38% de positivos intermedios, 0,69% de positivos bajos y el 32,41% negativos; Brahman mestizas 0,69% de positivos altos, 0,69% de positivos intermedios, 0% de positivos bajos y el 7,59% negativos; Pardo suizo 1,38% de positivos altos, 0,69% de positivos intermedios, 0 % de positivos bajos y el 25,52% negativos; Gyr 0% de positivos altos, 0% de positivos intermedios, 0,69 % de positivos bajos y el 5,52% negativos; y por último la raza Holstein mestiza 2,07% de positivos altos, 0,69% de positivos intermedios, 0,69 % de positivos bajos y el 15,86% negativos

Cuadro 8. Resultados de la presencia de anticuerpos contra DVB de acuerdo a la raza de los animales muestreados.

			Resultados				
RAZAS	ANIMALES	% TOTAL	Positivos altos (++++)	Positivo intermedio (+++)	Positivo bajo (++)	Negativo	
MESTIZA	55	37,93%	3,45%	1,38%	0,69%	32,41%	
BRAHMAN MESTIZA	13	08,97%	0,69%	0,69%	0%	7,59%	
PARDO SUIZO	40	27,59%	1,38%	0,69%	0%	25,52%	
GYR	9	06,21%	0%	0%	0,69%	5,52%	
HOLSTEIN MESTIZA	28	19,31%	2,07%	0,69%	0,69%	15,86%	
TOTAL	145	100,00%	7,59%	3,45%	2,07%	86,90%	

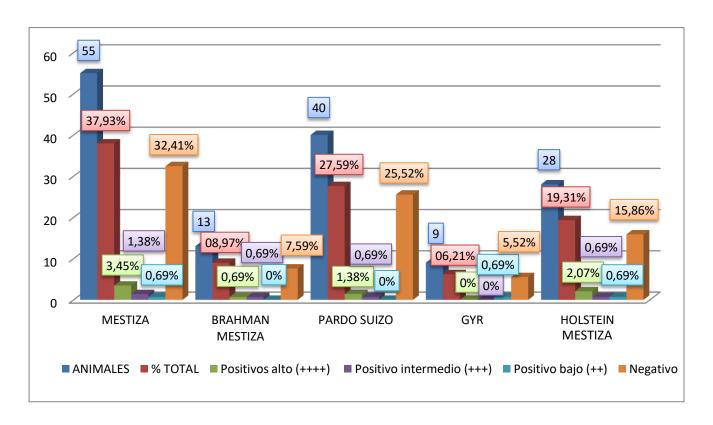


Gráfico 6. Representación de animales muestreados de acuerdo con la raza de los animales

Fuente: Autor

Los animales presente en la investigación son de raza Mestizo por los diferentes cruces para mejorar el ganado, Brahmán, Pardo suizo, Holstein mestiza y Gyr, las cuales por su porcentaje son propensas a infectarse con el virus ya que existe un porcentaje elevado en especial cuando existe un macho infectado y trasmite el virus a través del semen.

Lavanda, 2015 nos indicas que las razas Holstein y Pardo suizo con sus respectivos mestizos son las que en mayor número se encuentran en las ganaderías lecheras y la mayoría de ellas han pasado por cruces con el fin de mejorar su genética y por ende la producción de leche en la granja, para ello se pudieron haber ingresado animales de otros sitios con el fin de realizar esta actividad sabiendo que el 70% o más de bovinos infectados con el vDVB desarrollan la enfermedad subclínica pero eliminan virus por sus secreciones, por lo que un bovino infectado subclínicamente puede ser transportado de un lugar a otro y como es el caso de algunas ganaderías que no vacunan para la enfermedad de diarrea viral bovina estos animales pueden ser contagiados (51).

#### 5. CONCLUSIONES

La presente investigación concluye que los animales que son considerados positivos dentro de la investigación son de un total de 16 animales con un porcentaje de 11,04% positivos, mientras que los animales considerados negativos son 129 animales con un porcentaje del 88,97% negativos. Además al considerar la variable sexo las hembras presentan un porcentaje del 11,07% en comparación con los machos del 0%, pero esto se debe a que no existe una igualdad entre la cantidad de machos y hembras.

Pero si podemos decir que dentro de nuestra investigación la edad de referencia de los animales más susceptibles a la enfermedad son los que varían de 1,5-5., 4 con un porcentaje total de positivos del 5,52% y negativos 65,52%

A través de la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) reconocemos que es una de las técnicas más adecuada para realizar estudios epidemiológicos gracias a la facilidad, sensibilidad y especificidad que presenta para detectar los anticuerpos.

La distribución geográfica de la diarrea viral bovina presenta una amplia distribución y es uno de los factores de riesgo frente a la movilización de animales entre ganaderías, además por la compra y venta de animales sin registros sanitario demostrando que el virus circula entre los animales inmunosuprimidos sin presentar sintomatología

#### 6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con este tipo de diagnóstico de enfermedades de gran importancia como es la diarrea viral bovina, tomando en consideración un mayor número de muestra y tratar de realizarlo a un nivel total de la provincia.
- La técnica de ELISA es una técnica de alta sensibilidad y una especificidad y se la puede tomar como referencia para el diagnóstico del virus de la diarrea viral, además para no obtener valores subjetivos se recomienda la utilización de un lector de placa de ELISA
- Se recomienda realizar un mapeo del lugar de investigación y recolectar un número mayor de muestras
- Además se recomienda trabajar con animales que presente sintomatología que nos puedan indicar le presencia de la enfermedad
- Fomentar la correcta utilización de vacunas para Diarrea Viral Bovina en los hatos ganaderos del Cantón Santa Rosa con la finalidad de que los ganaderos tengan conocimiento y tomen las medidas preventivas para su ganado
- La estrategia que se propone es la gestión de la bioseguridad como base primordial. Debido a que se debe prestar especial atención a las entradas de nuevos animales, ya que es la principal vía de acceso del virus, y se lo hace con el propósito de prevenir la introducción de animales PI y así realizar control adecuado de los parámetros zootécnicos y sanitarios dentro de un hato ganadero.

# 7. BIBLIOGRAFÍA

- Rosete Fernández JV, Ríos Utrera Á, Zárate Martínez JP, Olazarán Jenkins S, Granados Zurita L, Fragoso Islas A, et al. Prevalencia de anticuerpos contra diarrea viral bovina en vacas no vacunadas en los estados de Puebla, Tabasco y Veracruz, México. Rev Mex Ciencias Pecu [Internet]. 2018;9(3):555–66. Available from: https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/4599/39 30
- Abad-Zavaleta J, Ríos-Utrera A, Rosete-Fernández JV, García-Camacho A, Zárate-Martínez JP. Prevalencia de rinotraqueítis infecciosa bovina y diarrea viral bovina en hembras en tres épocas del año en la Zona Centro de Veracruz. Nov Sci [Internet]. 2016 [cited 2019 Aug 17];8(16):213–27. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S2007-07052016000100213
- Donoso A, Inostroza F, Celedón M, Pizarro-Lucero J. Genetic diversity of Bovine Viral Diarrhea Virus from cattle in Chile between 2003 and 2007. BMC Vet Reseach [Internet]. 2018 [cited 2019 Sep 3];14:314. Available from: https://doi.org/10.1186/s12917-018-1641-7
- Rivera D, Rincón J, Echeverry J. Prevalencia de algunas enfermedades infecciosas en bovinos de resguardos indígenas del Cauca, Colombia, 2017. 2017
   [cited 2019 Jul 16]; Available from: https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/983/1483
- 5. Buitrago E, Jiménez C, Zambrano JL. Identificación de factores asociados con la exposición al virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en terneras de hatos lecheros de la sabana de Bogotá. Rev Med Vet ISSN 0122-9354, Nº 36, 2018 (Ejemplar Dedic a enero-junio), págs 63-73 [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 16];(36):63-73. Available from: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6229142
- 6. Marschik T, Obritzhauser W, Wagner P, Richter V, Mayerhofer M, Egger-58

Danner C, et al. A cost-benefit analysis and the potential trade effects of the bovine viral diarrhoea eradication programme in Styria, Austria. Vet J [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2019 Sep 9];231:19–29. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023317302289?via%3Di hub

- Corro A, Escalona J, Mosquera O, Vargas F. Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de Diarrea Viral Bovina en vacas y novillas no vacunadas en el Municipio Bolívar del estado Yaracuy, Venezuela. Gac Ciencias Vet [Internet].
   2017 [cited 2019 Jul 16];22(1):27–32. Available from: https://core.ac.uk/download/pdf/146445226.pdf
- 8. Viana RB, Kzam A do SL, Monteiro BM, Campello CC, Sousa EDM, Souza DC de, et al. Sensitivity and specificity of indirect ELISA for the detection of antibody titers against BVDV from beef cattle raised in Pará State. Semin Ciências Agrárias [Internet]. 2017 Oct 3 [cited 2019 Jul 3];38(5):3049. Available from: http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/25233
- OIE. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres [Internet]. 8va edición. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL; 2018 [cited 2019 Jul 29]. 1.833. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\_standards/tahm/3.04.07\_BVD.pdf
- 10. Doménech A et al. Manual Gráfico Inmunología y Enfermedades Infecciosas en Vacuno [Internet]. Servet. Grupo Asís Biomedia S.L, editor. Zaragoza-España; 2017 [cited 2019 Jun 27]. 56–57 p. Available from: https://basesdedatos.utmachala.edu.ec:2136/lib/utmachalasp/reader.action?docID =5213695&query=diarrea%2Bviral%2Bbovina%2Bpor%2Belisa
- 11. Peña Cortes LF. Estudio serológico de diarrea viral bovina en la microrregión del valle del cesar. Actas Iberoam Conserv Anim AICA [Internet]. 2011;1:309–12. Available from: https://translate.google.com/translate?hl=en&sl=es&u=https://aicarevista.jimdo.c om/app/download/12983785125/Pena2011\_1\_309\_312.pdf%3Ft%3D154255889 7&prev=search

- 12. Garcia I, Zafra R. Enfermedades Infectocontagiosas En Rumiantes: Manuales Clínicos de Veterinaria [Internet]. 1era edici. Morgaz J, Pilar M, Galan A, editors. España: ELSEVIER; 2019 [cited 2019 Jul 29]. 21–29 p. Available from: https://books.google.com.ec/books?id=NjyjDwAAQBAJ&pg=PA21&dq=diarrea +viral+bovina&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjujJOPqdnjAhXqqFkKHTeoDysQ 6AEIMjAC#v=onepage&q=diarrea viral bovina&f=false
- Cabezas A. Determinación de la prevalencia de diarrea viral bovina (DVB) en las islas San Cristóbal y Santa Cruz del Archipiélago de Galápagos [Internet]. 2012. Available from: http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/2865
- 14. Falkenberg SM, Dassanayake RP, Neill JD, Ridpath JF. Improved detection of bovine viral diarrhea virus in bovine lymphoid cell lines using PrimeFlow RNA assay. Virology [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2019 Sep 3];509:260–5. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004268221730209X
- Escudero L. Determinación De La Prevalencia E Incidencia De Diarrea Viral Bovina De Seis Hatos Ganaderos De La Parroquia Canuto, Cantón Chone En La Provincia De Manbí [Internet]. 2013. Available from: http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/2894
- Hanon J-B, De Baere M, De la Ferté C, Roelandt S, Van der Stede Y, Cay B. Evaluation of 16 commercial antibody ELISAs for the detection of bovine viral diarrhea virus—specific antibodies in serum and milk using well-characterized sample panels. J Vet Diagnostic Investig [Internet]. 2017 Nov 14 [cited 2019 Sep 9];29(6):833–43. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638717724839
- 17. Neill JD, Workman AM, Hesse R, Bai J, Porter EP, Meadors B, et al. Identification of BVDV2b and 2c subgenotypes in the United States: Genetic and antigenic characterization. Virology [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2019 Sep 3];528:19–29. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682218303660#bib47
- 18. Chernick A, van der Meer F. Evolution of Bovine viral diarrhea virus in Canada from 1997 to 2013. Virology [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2019 Sep 3];509:232–

- 8. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682217302015
- 19. Cárdenas C. Evaluación serológica de la diarrea viral en bovinos productores de leche de la microcuenca Ccañipía, Espinar, Cusco [Internet]. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS ; 2009 [cited 2019 Aug 21]. Available from: https://pdfs.semanticscholar.org/2e52/a5047cb0909759a7808655563f0d6a33b3f6.pdf
- 20. Gollán A, Chimeno S, Piccone ME, Mariño B, Peralta C, Rodríguez R, et al. Aislamiento y caracterización del virus de la diarrea viral bovina en un ternero con síndrome purpúrico. Arch Med Vet [Internet]. 2006 [cited 2019 Aug 21];38(2):167–73. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0301-732X2006000200011&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- 21. Daves L, Yimer N, Arshad SS, Sarsaifi K, Omar MA, Yusoff R, et al. Seroprevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus Infection and Associated Risk Factors in Cattle in Selangor, Malaysia. Vet Med Open J [Internet]. 2016 Jul 12 [cited 2019 Jul 3];1(1):22–8. Available from: http://openventio.org/Volume1-Issue1/Seroprevalence-of-Bovine-Viral-Diarrhea-Virus-BVDV-Infection-and-Associated-Risk-Factors-in-Cattle-in-Selangor-Malaysia-VMOJ-1-105.pdf
- 22. Dow N, Chernick A, Orsel K, van Marle G, van der Meer F. Genetic Variability of Bovine Viral Diarrhea Virus and Evidence for a Possible Genetic Bottleneck during Vertical Transmission in Persistently Infected Cattle. Velayudhan BT, editor. PLoS One [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2019 Sep 9];10(7):e0131972. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0131972
- 23. Bolin SR, Grooms DL. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. Vet Clin North Am Food Anim Pract [Internet]. 2004 Mar [cited 2019 Aug 12];20(1):51–68. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072003000811
- 24. Gómez-Romero N, Basurto-Alcántara FJ, Verdugo-Rodríguez A, Bauermann F

- V., Ridpath JF. Genetic diversity of bovine viral diarrhea virus in cattle from Mexico. J Vet Diagnostic Investig [Internet]. 2017 May 4 [cited 2019 Sep 9];29(3):362–5. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638717690187
- 25. Irigoyen Laura de Miguel. La bioseguridad y la BVD en granjas de vacuno: factores de riesgo y actuación ante los mismos [Internet]. Faculta de veterinaria de la Universidad Zaragoza; 2018 [cited 2019 Jul 29]. Available from: https://zaguan.unizar.es/record/71148/files/TAZ-TFG-2018-1494.pdf
- Moennig V, Becher P. Control of Bovine Viral Diarrhea. Pathogens [Internet].
   2018 Mar 8 [cited 2019 Jul 18];7(1):29. Available from: http://www.mdpi.com/2076-0817/7/1/29
- 27. Zhu L, Lu H, Cao Y, Gai X, Guo C, Liu Y, et al. Molecular Characterization of a Novel Bovine Viral Diarrhea Virus Isolate SD-15. Zhang G, editor. PLoS One [Internet]. 2016 Oct 20 [cited 2019 Sep 9];11(10):e0165044. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0165044
- 28. Martínez V. Establecimiento de un Método de Diagnóstico para la Detección del Virus de la Diarrea Viral Bovina Mediante la Reacción en Cadena de Polimerasa [Internet]. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE; 2017 [cited 2019 Aug 14]. Available from: http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/13373/1/T-ESPE-057328.pdf
- 29. Pecora, Andrea & Perez A. MS. Actualización en diarrea viral bovina , herramientas diagnósticas y estrategias de prevención. INTA-Buenos Aires Argentina [Internet]. 2017;4–24. Available from: https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-actualizacion\_en\_diarrea\_viral\_bovina.pdf
- 30. Larghi M. Comparative study in the control of bovine viral diarrhea. Anim Heal Res Rev [Internet]. 2018 Dec 23 [cited 2019 Jul 18];19(2):125–33. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1466252318000129/type/journal\_article

- 31. ministerio de agricultura gobierno de Chile. Diarrea Viral B Ov I Na. 2008;

  Available from:

  http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/f\_tecnica\_diarrea\_viral\_bov.pdf
- 32. Navas P. Determinación de anticuerpos anti-diarrea viral bovina (DVB) mediante Elisa competitivo en una población cautiva de venados cola blanca (odocoileus virginianus) en Cundinamarca, Colombia [Internet]. Universidad de la Salle; 2013 [cited 2019 Aug 28]. Available from: http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/17541/T14.13 N228d.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- 33. Rondón I. Diarrea viral bovina: patogénesis e inmunopatología. Rev MVZ Córdoba [Internet]. 2006 Apr;11(1):694–704. Available from: https://www.redalyc.org/pdf/693/69311103.pdf
- 34. Palomares RA, Sakamoto K, Walz HL, Brock K V., Hurley DJ. Acute infection with bovine viral diarrhea virus of low or high virulence leads to depletion and redistribution of WC1+ γδ T cells in lymphoid tissues of beef calves. Vet Immunol Immunopathol [Internet]. 2015 Oct [cited 2019 Sep 9];167(3–4):190–5. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242715001737
- 35. Falkenberg SM, Dassanayake RP, Walz P, Casas E, Neill JD, Ridpath JF. Frequency of bovine viral diarrhea virus detected in subpopulations of peripheral blood mononuclear cells in persistently infected animals and health outcome. Vet Immunol Immunopathol [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2019 Sep 9];207:46–52. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242718303684
- 36. Valdez Edgar, Pacheco Ignasio, Vergara Walter, Pinto Juan, Fernández Fiorela, Guzmán Fiorela, et al. Identificación de bovinos persistentemente infectados y genotipo del virus de la diarrea viral en bovinos de Anta, Cusco, Perú. Rev Investig Vet del Perú [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 29];29(4):1522–32. Available from: http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15192
- 37. Villamil V, Ramírez G, Vera VJ, Jaime JA. Primera evidencia del Virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB) genotipo 2 en Colombia. Rev Med Vet Zoot

- [Internet]. 2018 [cited 2019 Aug 17];65(1):16. Available from: http://www.scielo.org.co/pdf/rfmvz/v65n1/0120-2952-rfmvz-65-01-00011.pdf
- 38. Smirnova NP, Webb BT, McGill JL, Schaut RG, Bielefeldt-Ohmann H, Van Campen H, et al. Induction of interferon-gamma and downstream pathways during establishment of fetal persistent infection with bovine viral diarrhea virus. Virus Res [Internet]. 2014 Apr 21 [cited 2019 Sep 9];183:95–106. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170214000550
- 39. Peddireddi L, Foster KA, Poulsen EG, An B, Hoang QH, O'Connell C, et al. Molecular detection and characterization of transient bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections in cattle commingled with ten BVDV persistently infected cattle. J Vet Diagnostic Investig [Internet]. 2018 May 11 [cited 2019 Sep 9];30(3):413–22. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638717753962
- 40. Workman AM, Heaton MP, Harhay GP, Smith TPL, Grotelueschen DM, Sjeklocha D, et al. Resolving Bovine viral diarrhea virus subtypes from persistently infected U.S. beef calves with complete genome sequence. J Vet Diagnostic Investig [Internet]. 2016 Sep 7 [cited 2019 Sep 9];28(5):519–28. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638716654943
- 41. Newcomer BW, Givens D. Diagnosis and Control of Viral Diseases of Reproductive Importance. Vet Clin North Am Food Anim Pract [Internet]. 2016

  Jul [cited 2019 Sep 9];32(2):425–41. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072016000128
- 42. Sayers RG, Sayers GP, Graham DA, Arkins S. Impact of three inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines on bulk milk p80 (NS3) ELISA test results in dairy herds. Vet J [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2019 Sep 3];205(1):56–61. Available from:
  - https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023315001227#s0010
- 43. Huaraca A. ELABORACIÓN DE UN MANUAL DE BUENAS PRÁCTICAS SANITARIAS EN BOVINOS DE DOBLE PROPÓSITO EN LA GRANJA EXPERIMENTAL SHITIG [Internet]. Escuela superior Politécnica de

- Chimborazo; 2016 [cited 2019 Aug 17]. Available from: http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/5348/1/17T1381.pdf
- 44. Sayers RG, Byrne N, O'Doherty E, Arkins S. Prevalence of exposure to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) in Irish dairy herds. Res Vet Sci [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2019 Sep 9];100:21–30. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528815000533
- 45. Pecora A, Malacari DA, Pérez Aguirreburualde MS, Bellido D, Escribano JM, Dus Santos MJ, et al. Development of an enhanced bovine viral diarrhea virus subunit vaccine based on E2 glycoprotein fused to a single chain antibody which targets to antigen-presenting cells. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2019 Sep 9];47(1):4–8. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754115000048
- 46. Godoy M. Reporte de caso; Diarrea viral bovina en el municipio de Aguazul Casanare practica rotatoria [Internet]. Colombia; 2016 [cited 2019 Aug 25]. Available from: http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/21265/14071046\_2016.pd f?sequence=1&isAllowed=y
- 47. REINHARDT G, CARRASCO L, TADICH N, RIEDEMANN S. Comparación entre dos técnicas de diagnóstico para diarrea viral bovina (DVB) en 50 predios de la X región, chile: Seroneutralización y Enzimoinmunoensayo indirecto (ELISA-I). Arch Med Vet [Internet]. 2001 [cited 2019 Apr 12];33(2):173–83. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0301-732X2001000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- 48. Arnaiz I. El diagnóstico de laboratorio en los programas de control de IBR y BVD [Internet]. Galicia; 2014 [cited 2019 Aug 21]. Available from: http://axonveterinaria.net/web\_axoncomunicacion/criaysalud/37/cys\_37\_64-70\_diagnostico\_en\_programas\_de\_control\_IBR\_BVD.pdf
- 49. Escudero L. LÍNEA DE BASE DE LA PROVINCIA DE EL ORO. CARACTERIZACIÓN TERRITORIAL Y SOCIODEMOGRÁFICA:

- MACHALA, PASAJE, SANTA ROSA Y ZARUMA. [Internet]. Ecuador: PYDLOS; 2014 [cited 2019 Aug 19]. 50 p. Available from: https://www.unicef.org/ecuador/LIBRO\_DE\_EL\_ORO\_Parte1.pdf
- 50. Valdez G. E, Pacheco P. I, Vergara A. W, Pinto L. J, Fernández B. F, Guzmán F. F, et al. Detección de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral en bovinos de la provincia de Anta, Cusco, Perú. Rev Investig Vet del Perú [Internet]. 2018 Nov 25 [cited 2019 Sep 13];29(4):1500. Available from: http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/151 87
- 51. Labanda JA. Prevalencia de Diarrea Viral Bovina en vacas lecheras de la Ganadería del Cantón Loja [Internet]. Universidad Nacional de Loja; 2015 [cited 2019 Sep 13]. Available from: https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/10258/1/tesis Jorge Amable Labanda González.pdf
- 52. Vargas-Niño A, Jorge Vargas R, Parra-Martin JA, María Vásquez R, Agustín Góngora O, Mogollón-Waltero E. Serological status of IBR, BVD, leucosis, Leptospira and Neospora caninum in bovine females of the department of Santander, Colombia. Rev MVZ Cordoba [Internet]. 2018 [cited 2019 Sep 13];23(2):6671–80. Available from: https://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/revistamvz/article/view/1341/pdf
- 53. Huaylla J. Bovina (VDVB) en vacunos de la raza brown swiss en la cuenca lechera del distrito de Vilque [Internet]. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO; 2018 [cited 2019 Sep 13]. Available from: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/9075/Huaylla\_Paccosoncc o\_Julio\_Cesar.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- 54. Buitrago E. Determinación de la prevalencia de animales Persistentemente Infectados con el virus de Diarrea Viral Bovina (DVB) y factores de riesgo asociados con la exposición al virus en terneras de hatos lecheros de la Sabana de Bogotá [Internet]. Universidad Nacional de Colombia; 2015 [cited 2019 Sep 15]. Available from: http://bdigital.unal.edu.co/50723/1/1032389806.2015.pdf

## 8. ANEXOS



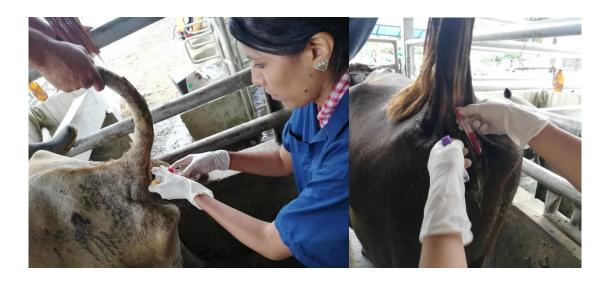
**Anexo 1.** Materiales para toma de muestra



Anexo 2 - 3. Toma de muestra ganaderia Nicvanna



Anexo 4 - 5. Animales de la ganaderia Nicvanna



**Anexo 6 - 7.** Toma de muestra Ganaderia Las Lomas



Anexo 8 - 9. Animales de la ganderia Las Lomas



Anexo 10 - 11. Toma de muestra en la ganadería Karfel



Anexo 12 - 13. Animales de la ganaderia Karfel





Anexo 14 - 15. Reactivo de la prueba de elisa. Controles positivo y negativo





Anexo 16 - 17. Placas tapizadas de antigeno. Pipeta y puntas azules y amarillas



Anexo 18. Muestras de los animales en tubos tapa roja

70



Anexo 19 - 20. Centrifugacion de las muestras 3000 rpm/10min



Anexo 21 - 22. Separacion del plasma sanguineo en otro tubo



Anexo 23 - 24. Dilucion de las muestras con el diluyente (Vial 1)



Anexo 25 - 26. Incubación de las muestras a 37°C/60 min



Anexo 27. Pocillos con las muestras incubándose

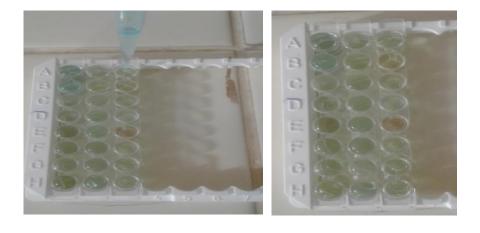
72



Anexo 28 - 29. Colocación de la solución de conjugado (vial 2) en los pocillos



Anexo 30. Placa con la solución de sustrato (Vial 3)



Anexo 31 - 32. Enjuage de los pocillos de las placas



Anexo 33. Secado de la placa con golpecitos en papel absorbente



Anexo 34. Colocación de la solución de paro (vial 4)



**Anexo 35.** Control P/N + Muestras 1-6 Ganadería Nicvanna



**Anexo 36.** Control P/N + Muestras 7-14 Ganadería Nicvanna



Anexo 37. Muestras Del 15-22 Ganadería Nicvanna



Anexo 38. Muestras 23-28 Nicvanna



Anexo 39. Muestras 1-8 Ganadería Las Lomas



**Anexo 40.** Control P/N + Muestras 9-14 Ganadería Las Lomas



Anexo 41. Muestras 15-22 Ganadería Las Lomas



**Anexo 42.** Muestras 23-30 Ganadería Las Lomas



Anexo 43. Muestras 31-38 Ganadería Las Lomas



Anexo 44. Muestras 39-46 Ganadería Las Lomas



Anexo 45. Muestras 47-54 Ganadería Las Lomas



**Anexo 46.** Control P/N + Muestras 55-59 Ganadería Las Lomas - 1 muestras G. Karfel



Anexo 47. Muestras 2-9 Ganadería Karfel



Anexo 48. Muestras 10-17 Ganadería Karfel



Anexo 49. Control+ Muestras 18-22 +blanco Ganadería Karfel



Anexo 50. Muestras 23-30 Ganadería Karfel



Anexo 51. Muestras 31-38 Ganadería Karfel



Anexo 52. Muestras 39-46 Ganadería Karfel



**Anexo 53.** Control P/N + Muestras 47-52 Ganadería Karfel



**Anexo 54.** Muestras 53-58 Ganadería Karfel+2 blanco

Anexo 55. Registro de animales muestreados en el Cantón Santa Rosa

Nº	GANADERIA	ANIMALES	VACUNACIÓN	EDAD	SEXO	RAZA	ANIMALES ENFERMOS
1		UBRE RAJADA	NO VACUNADO	4	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
2		PINTADA1	NO VACUNADO	3	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
3		6008 NEGRA	NO VACUNADO	6	HEMBRA	HOLSTEIN	POSITIVO MEDIO
4		MIA	NO VACUNADO	5	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
5		BORREGA 3965	NO VACUNADO	3	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
6		BLANCA	NO VACUNADO	6	HEMBRA	BRAHMAN MESTIZA	NEGATIVO
7		VACA AMARILLA	NO VACUNADO	3	HEMBRA	BRAHMAN MESTIZA	NEGATIVO
8		NEGRA PINTADA	NO VACUNADO	5	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
9		153	NO VACUNADO	6	HEMBRA	BRAHMAN MESTIZA	NEGATIVO
10		VACONA PINTADA AMARILLA	NO VACUNADO	2	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
11		FRENTE BLANCA	NO VACUNADO	4	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
12	NICVANNA	NEGRA RABO MOCHO	NO VACUNADO	3	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
13		LA DURA	NO VACUNADO	3	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
14		CACHO BLANCO	NO VACUNADO	3	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
15		BARBY 1	NO VACUNADO	4	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
16		PANDA	NO VACUNADO	4	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
17		COLORADA	NO VACUNADO	5	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
18		COLORADA CADIONA	NO VACUNADO	3	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
19		NEGRA GRANDE 433	NO VACUNADO	6	HEMBRA	BRAHMAN MESTIZA	POSITIVO MEDIO
20		PINTADA 2	NO VACUNADO	4	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
21		CACHUDA GOLPEADA	NO VACUNADO	4	HEMBRA	BRAHMAN MESTIZA	NEGATIVO
22		NEGRA GRANDE	NO VACUNADO	5	HEMBRA	BRAHMAN MESTIZA	POSITIVO
23		LA TUERTA	NO VACUNADO	5	HEMBRA	BRAHMAN MESTIZA	NEGATIVO
24		OSA PANDA	NO VACUNADO	4	HEMBRA	HOLSTEIN	POSITIVO BAJO

			NO			DADDO	
25		CHIQUITIN	NO VACUNADO	3	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
26		CACHO FINO	NO VACUNADO	4	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
27		BARBY 2	NO VACUNADO	5	HEMBRA	PARDO SUIZO	POSITIVO MEDIO
28		PINTADA- BLANCA- PATILLA	NO VACUNADO	5	HEMBRA	HOLSTEIN	POSITIVO
1		COLORADA GRANDE 894	VACUNADAS	12	HEMBRA	BRAHMAN MESTIZA	NEGATIVO
2		ROJA 1224	VACUNADAS	5	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
3		548 DIANA	VACUNADAS	12	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
4		COLORADA 1219	VACUNADAS	5	HEMBRA	BRAHMAN MESTIZA	NEGATIVO
5		1406	VACUNADAS	2	HEMBRA	BRAHMAN MESTIZA	NEGATIVO
6		1079	VACUNADAS	8	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
7		AMARILLA	VACUNADAS	3	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
8		NEGRA PUNTO EN LA FRENTE 6	VACUNADAS	5	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
9		ANTONIA	VACUNADAS	5	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
10		139	VACUNADAS	5,1	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
11		SONIA 91	VACUNADAS	4,9	HEMBRA	GYR	NEGATIVO
12		DOMENICA	VACUNADAS	4,1	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
13		PALOMILLA 135	VACUNADAS	5,4	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
14		NEGRA DOS AGUJEROS/OREJA	VACUNADAS	3,2	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
15	LAS LOMAS	143	VACUNADAS	3,2	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
16		LUISA C63	VACUNADAS	3,9	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
17		LUKITA 109	VACUNADAS	4,2	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
18		133	VACUNADAS	5,4	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
19		PARDA C73	VACUNADAS	3,1	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
20		BURRA 284	VACUNADAS	6,1	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
21		VACONA 1248	VACUNADAS	1,4	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
22		CELENA GUAYAS 02	VACUNADAS	7,1	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
23		C3	VACUNADAS	7,6	HEMBRA	GYR	NEGATIVO
24		HIJA ROMERO 91	VACUNADAS	3,7	HEMBRA	GYR	NEGATIVO
25		ARIANNA	VACUNADAS	4,9	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
26		MISTERIOSA	NO VACUNADO	1,5	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
27		ATILIO	VACUNADAS	1,8	MACHO	GYR	NEGATIVO
28		303	VACUNADAS	1,3	HEMBRA	GYR	NEGATIVO
29		PALOMILLA	VACUNADAS	4,1	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO

COLORADA 1387	30		LIDERESA	VACUNADAS	5	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
AMARILLA CARA   BLANCA 1398   VACUNADAS   LA   HEMBRA   MESTIZA   NEGATIVO					2.	HEMBRA		
BLANCA 1398	31			VACUNADAS		TIENTER	SUIZO	NEGATIVO
NEGRA CARA   BLANCA 1369	32			VACUNADAS	2	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
ROSALIA 1350   VACUNADAS   MESTIZA   NEGATIVO	32			VIICONIBIE	2	HEMDD A	TVIEW TIERT	1120111110
ROSALIA 1351	33		BLANCA 1369	VACUNADAS	2	HEMBKA		NEGATIVO
COLORADA   AMARILLA 1140   VACUNADAS   5   HEMBRA   MESTIZA   NEGATIVO	24		DOCALIA 1251	VACIINADAS	3	HEMBRA		NECATIVO
AMARILLA 1140	34			VACUNADAS	_		SUIZO	NEGATIVO
COLORADA	35			VACUNADAS	5	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
NEGRA 21	36		ROJA 1383	VACUNADAS	2	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
VACONA	37		COLORADA	VACUNADAS	3	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
AMARILLA   1304	38		NEGRA 21	VACUNADAS	6	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
AMARILLA 1304   VACUNADAS	39		VACONA	VACUNADAS	0,9	HEMBRA		NEGATIVO
VACONA	40		AMADILIA 1204	VACIINADAS	6	HEMBRA		NECATIVO
AMARILLA	40			VACUNADAS				NEGATIVO
A2	41			VACUNADAS	2	HEMBRA		NEGATIVO
42								
PINTADA 704	42			VACIINADAS	5	HEMBRA		NECATIVO
Section   Sect					12	HEMBRA		
Sence   Senc								
BLANCO     VACUNADAS   COLORADA   1376   VACUNADAS   COLORADA   CO				VICOIVIDIO			WILDTIE	TVLG/11110
COLORADA 1376	45		BLANCO 713	VACUNADAS	4	HEMBKA	MESTIZA	NEGATIVO
47 48 48 49 OJONA 1000 VACUNADAS 5,1 HEMBRA PARDO SUIZO NEGATIVO	46		COLORADA 1376	VACUNADAS	2	HEMBRA		NEGATIVO
OJONA 1000	47		C91 ROSALIA		0,7	HEMBRA	MESTIZA	POSITIVO
MANUELA 73	48		OJONA 1000	VACUNADAS	5,1	HEMBRA		NEGATIVO
MANUELA 73   VACUNADAS   4,11   HEMBRA   SUIZO   NEGATIVO	49		YOLANDA 51	VACUNADAS	7,7	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
S1	50		MANUELA 73		4,11	HEMBRA		
RAMONA VACUNADAS 5,8 HEMBRA MESTIZA NEGATIVO  PUNTO BLANCO 39 VACUNADAS 4,8 HEMBRA GYR NEGATIVO  1292 VACUNADAS 4 HEMBRA PARDO SUIZO NEGATIVO  1 VACUNADAS 3 HEMBRA HOLSTEIN NEGATIVO  1 VACUNADAS 3 HEMBRA HOLSTEIN NEGATIVO  1 VACUNADAS 12 HEMBRA PARDO SUIZO NEGATIVO  1 VACUNADAS 12 HEMBRA PARDO SUIZO NEGATIVO  1 KARFEL 1242 VACUNADAS 2 MACHO GYR NEGATIVO  NO VACUNADAS 5 HEMBRA PARDO SUIZO NEGATIVO  NO N	51		315		0,1	HEMBRA	GYR	
PUNTO BLANCO 39 VACUNADAS 4,8 HEMBRA GYR NEGATIVO  1292 VACUNADAS 4 HEMBRA PARDO SUIZO NEGATIVO  1 VACUNADAS 3 HEMBRA HOLSTEIN NEGATIVO  124 VACUNADAS 3 HEMBRA HOLSTEIN NEGATIVO  58 603 VACUNADAS 12 HEMBRA PARDO SUIZO NEGATIVO  1 TORETE G VACUNADAS 2 MACHO GYR NEGATIVO  NO VACUNADO 5 HEMBRA PARDO SUIZO NEGATIVO  NO VACUNADAS 2 MACHO GYR NEGATIVO	52		CHAVELA	VACUNADAS		HEMBRA	GYR	NEGATIVO
39	53			VACUNADAS	5,8	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
1 1292 VACUNADAS 4 HEMBRA SUIZO NEGATIVO  1 VACUNADAS 3 HEMBRA HOLSTEIN NEGATIVO  1 VACUNADAS 3 HEMBRA HOLSTEIN NEGATIVO  1 VACUNADAS 12 HEMBRA PARDO SUIZO NEGATIVO  1 TORETE G VACUNADAS 2 MACHO GYR NEGATIVO  NO VACUNADO 5 HEMBRA SUIZO NEGATIVO  NO VACUNADO 5 HEMBRA SUIZO NEGATIVO	54			VACUNADAS	4,8	HEMBRA		NEGATIVO
57 58 603 VACUNADAS 12 HEMBRA PARDO SUIZO NEGATIVO 1 KARFEL 1242 VACUNADAS 5 HEMBRA PARDO SUIZO NEGATIVO 1 HEMBRA NO VACUNADO 5 HEMBRA PARDO SUIZO NEGATIVO NEGATIVO	55		1292	VACUNADAS	4	HEMBRA		NEGATIVO
58 603 VACUNADAS 12 HEMBRA PARDO SUIZO NEGATIVO  TORETE G VACUNADAS 2 MACHO GYR NEGATIVO  NO NO SUIZO NEGATIVO  NO YACUNADO 5 HEMBRA SUIZO NEGATIVO	56		1	VACUNADAS			HOLSTEIN	NEGATIVO
58 603 VACUNADAS 12 HEMBRA SUIZO NEGATIVO 59 TORETE G VACUNADAS 2 MACHO GYR NEGATIVO  NO NO SUIZO NEGATIVO 1 KARFEL 1242 VACUNADO 5 HEMBRA SUIZO NEGATIVO	57		124	VACUNADAS	3	HEMBRA		NEGATIVO
TORETE G VACUNADAS 2 MACHO GYR NEGATIVO  NO NO VACUNADO 5 HEMBRA SUIZO NEGATIVO	58		603	VACUNADAS	12	HEMBRA		NEGATIVO
1 KARFEL 1242 NO VACUNADO 5 HEMBRA PARDO SUIZO NEGATIVO					2	МАСНО		
1000		KARFFI		NO	5		PARDO	
2   VACONA   NO   2   HEMBRA   MESTIZA   NEGATIVO	2	III IIII LL	VACONA	NO	2	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO

		AMARILLA	VACUNADO				
3	V	ACA BLANCA 1360	NO VACUNADO	3	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
4		1053	NO VACUNADO	8	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
5		1348	NO VACUNADO	3	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
6		755	NO VACUNADO	12	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
7		1149	NO VACUNADO	7	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
8		1287	NO VACUNADO	4	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
9		1135	NO VACUNADO	7	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
10		NEGRA	NO VACUNADO	7	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
11		1272	NO VACUNADO	8	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
12		1027	NO VACUNADO	9	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
13		1268	NO VACUNADO	4	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
14		AMARILLA	NO VACUNADO	7	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
15		1180	NO VACUNADO	6	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
16		119	NO VACUNADO	4,5	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
17		103	NO VACUNADO	4	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
18		1107	NO VACUNADO	7	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
19		1220	NO VACUNADO	5	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
20		1271	NO VACUNADO	4	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
21		1083	NO VACUNADO	8	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
22		1221	NO VACUNADO	5	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
23	8	825 NARANJA	NO VACUNADO	6	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
24		133	NO VACUNADO	5	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
25		104	NO VACUNADO	4	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
26		111 MARILIN	NO VACUNADO	3	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
27		211	NO VACUNADO	5	HEMBRA	MESTIZA	POSITIVO MEDIO
28		109	NO VACUNADO	4	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO

20	9165	NO	8	HEMBRA	WOY GEED !	NEG LEVIO
29	155 MANCHITA	VACUNADO NO	4	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
30		VACUNADO NO			HOLSTEIN PARDO	NEGATIVO
31	9164 PICUDA	VACUNADO	8	HEMBRA	SUIZO	POSITIVO
32	124	NO VACUNADO	4,6	HEMBRA	MESTIZA	POSITIVO BAJO
33	104	NO VACUNADO	4	HEMBRA	MESTIZA	POSITIVO MEDIO
34	118	NO VACUNADO	4	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
35	GATEADA	NO VACUNADO	3	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
36	RABO MOCHO	NO VACUNADO	5	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
37	AMARILLA	NO VACUNADO	3	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
38	ENCERADA	NO VACUNADO	2	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
39	1083	NO VACUNADO	8	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
40	1221	NO VACUNADO	5	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
41	9015	NO VACUNADO	7	HEMBRA	PARDO SUIZO	POSITIVO
42	120 GACHA	NO VACUNADO	4	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
43	232 MARAVILLA	NO VACUNADO	5	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
44	105	NO VACUNADO	4	HEMBRA	HOLSTEIN	POSITIVO
45	126	NO VACUNADO	4	HEMBRA	MESTIZA	POSITIVO
46	108 RUBIA	NO VACUNADO	4	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
47	129	NO VACUNADO	4	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
48	125 BLANCA	NO VACUNADO	4,5	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
49	110	NO VACUNADO	4	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
50	53	NO VACUNADO	8	HEMBRA	MESTIZA	POSITIVO
51	152	NO VACUNADO	4,5	HEMBRA	HOLSTEIN	NEGATIVO
52	155	NO VACUNADO	4,5	HEMBRA	MESTIZA	POSITIVO
53	9085 PARDA	NO VACUNADO	8	HEMBRA	MESTIZA	POSITIVO
54	136 MONA	NO VACUNADO	4	HEMBRA	MESTIZA	NEGATIVO
55	115	NO VACUNADO	4	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO

56	113	NO VACUNADO	3,6	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO
57	36	NO VACUNADO	10	HEMBRA	HOLSTEIN	POSITIVO
58	116	NO VACUNADO	4	HEMBRA	PARDO SUIZO	NEGATIVO