



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA DIARREA VIRAL BOVINA
EN EL HATOS DE LECHE EN LA PROVINCIA DE EL ORO

ROMAN OLAYA ANTHONY JOSUE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

MACHALA
2022



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA DIARREA VIRAL
BOVINA EN EL HATOS DE LECHE EN LA PROVINCIA DE EL
ORO

ROMAN OLAYA ANTHONY JOSUE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

MACHALA
2022



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA DIARREA VIRAL BOVINA EN EL
HATOS DE LECHE EN LA PROVINCIA DE EL ORO

ROMAN OLAYA ANTHONY JOSUE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

AGUILAR GALVEZ FERNANDO LENIN

MACHALA, 21 DE SEPTIEMBRE DE 2022

MACHALA
2022

DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA DIAREA VIRAL BOVINA EN HATOS DE LECHE DE LA PROVINCIA DE EL ORO

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

8%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	es.linkfang.org Fuente de Internet	4%
2	repositorio.utmachala.edu.ec Fuente de Internet	3%
3	Submitted to Universidad Internacional de la Rioja Trabajo del estudiante	1%
4	sisbib.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 20 words

Excluir bibliografía

Activo

CLAUSULA DE SESION DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

El que suscribe, Anthony Josué Román Olaya, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito, titulado..... , 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 protestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca dentro de las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

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

El autor como gerente de autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la Universidad Técnica de Machala 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 en formato electrónico y digital a través de su repositorio digital institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener un beneficio económico.

Machala, 23 de Septiembre del 2022



ROMAN OLAYA ANTHONY JOSUE

0750602146



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA DIAREA VIRAL BOVINA EN
HATOS DE LECHE DE LA PROVINCIA DE EL ORO**

ROMAN OLAYA ANTHONY JOSUE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

MACHALA

2022



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA DIAREA VIRAL BOVINA EN
HATOS DE LECHE DE LA PROVINCIA DE EL ORO**

ROMAN OLAYA ANTHONY JOSUE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

MACHALA

2022



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TRABAJO TITULACION – PROYECTO TECNICO

DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA DIAREA VIRAL BOVINA EN

HATOS DE LECHE DE LA PROVINCIA DE EL ORO

ROMAN OLAYA ANTHONY JOSUE

AGUILAR GALVEZ FERNANDO LENIN

MACHALA JULIO 2022

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo al propósito de mi vida, mi familia, ya que representa una pieza fundamental para la obtención de mi grado profesional como médico, estoy seguro que a través de este será mucho más grato prever salud y bienestar para mi hogar y mi comunidad durante este largo trayecto de vida.

A mi madre y a mi padre porque sus constantes cuidados y compañía formaron los cimientos para poder cumplir con mis metas en cada etapa de esta carrera.

A mis abuelos, por su inmutable apoyo incondicional que sin duda alguna sin ellos hubiese sido imposible lograr este objetivo.

A mis hermanos y sobrino porque su compañía me ha llenado de paz y sosiego durante todo este tiempo.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer primero que nada a mi familia por ser motor y motivo de cada día. A todos y cada uno de mis docentes por sus invaluable enseñanzas no solo correspondientes a la cátedra sino a aquellos valores humanos que han desarrollado durante toda su vida profesional, que será el mejor legado que un mentor puede dejarle a su aprendiz.

Al Dr. Lenin Aguilar quien fue mi tutor y guía durante el transcurso de toda esta investigación, a la Dra. Lorena Zapata por su preocupación y consejos los cuales son y serán parte del profesional que seré en el futuro, así mismo al Dr. Robert Sanchez y Dra. Ana Guerrero por sus siempre muy amables indicaciones.

También agradecerles un mundo a todas las personas que sin sus pequeñas acciones no habría sido posible llevar a cabo este trabajo, muchas gracias a Dayana; Dr. Ludena; Dr. Eras; Dr. Mena.

Además, y no siendo menos importante quiero agradecer a cada uno de mis amigos con quienes coincidimos durante este largo trayecto, nada sería absolutamente igual sin el abrigo de su amistad.

UNIVERSIDAD TECNICA DE MACHALA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

***“DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA DIARREA VIRAL
BOVINA EN HATOS DE LECHE DE LA PROVINCIA DE EL
ORO”***

Autor: Román Olaya Anthony Josué

Tutor: Aguilar Gálvez Lenin Fernando

RESUMEN

Es muy recurrente observar al ganado adquirir una infección ocasionada por la diarrea viral bovina (DVB). El producto de esta infección viral es una muy diversa gama de hallazgos clínicos. El tipo de cuadro clínico y magnitud de síntomas dependen de la interacción de varios factores macros como el hospedero y micros el biotipo viral además de los factores medioambientales. Se revisa la dinámica de la enfermedad viral (DVB) en hatos lecheros en los distintos puntos geográficos de la provincia de El Oro para determinar presencia de anticuerpos mediante un ELISA durante un determinado tiempo geológico.

Existen varios métodos de diagnóstico para la detección tanto de material viral como de material serológico, si bien los que requieren material viral presentan ciertas complicaciones en especial con la obtención de la muestra para el análisis, al contrario del ELISA que es más factible debido a que se necesita leche individual o de un grupo de vacas para el desarrollo del método diagnóstico, por lo que se puede mantener un monitoreo mucho más óptimo para las condiciones de campo.

Se han documentado reportes acerca de la circulación anticuerpo contra DVB en la provincia de El Oro, sin embargo, han sido estudios a nivel de cantón a diferencia del presente trabajo en donde se logró el muestreo de cuatro cantones, entre ellos Machala, Chilla, El Guabo, Santa Rosa habiéndose obtenido resultados tanto seropositivos como seronegativos a través de la aplicación del kit comercial para el desarrollo del ELISA de marca CIVTest ELISA BDV-BD p80.

ABSTRACT

It is very recurrent to observe cattle acquire an infection caused by bovine viral diarrhea (BVD). The product of this viral infection is a very diverse range of clinical findings. The type of clinical picture and magnitude of symptoms depend on the interaction of several macro factors such as the host and micros, the viral biotype, as well as environmental factors. The dynamics of the viral disease (DVB) in dairy herds in the different geographical points of the province of El Oro is reviewed to determine the presence of antibodies by means of an ELISA during a certain geological time.

There are several diagnostic methods for the detection of both viral material and serological material, although those that require viral material present certain complications, especially with obtaining the sample for analysis, unlike ELISA, which is more feasible because Individual milk

or milk from a group of cows is needed for the development of the diagnostic method, so a much more optimal monitoring can be maintained for field conditions.

Reports have been documented about the antibody circulation against DVB in the province of El Oro, however, they have been studies at the canton level, unlike the present work where the sampling of four cantons was achieved, including Machala, Chilla, El Guabo, Santa Rosa, having obtained both seropositive and seronegative results through the application of the commercial kit for the development of the CIVTest ELISA BDV-BD p80 brand ELISA.

CONTENIDO

INTRODUCCION	11
1.- REVISION BIBLIOGRAFICA	13
1.1.- Etiología	13
1.2.- Morfología.....	14
1.3.- Tipos de cepas	15
1.4.- Patogénesis.....	15
1.5.- Transmisión	16
1.6.- Respuesta inmune.....	16
1.7.- Cuadro clínico	17
1.8.- Infección persistente (animales persistentemente infectados).....	17
1.9.- Diagnostico diferencial	18
1.11.- Medidas de control para DVB	24
1.12.- Programas de control internacional para detección de DVB	24
1.13.- Rol de las vacunas	25
2.- DISEÑO METODOLÓGICO	27
2.1.- Localización de la zona de estudio.....	27
2.2.- Equipo de laboratorio usado.....	29
2.3.- Materiales.....	29
2.4.- Procedimiento Para La Toma De Muestras	30
2.5.- Procedimiento para análisis en laboratorio	30
2.6.- Validación e interpretación de resultados.....	32
3.- RESULTADOS Y DISCUSION	33
3.1.- Determinación de la positividad para ab de DVB en los tanques de leche muestreados en la Provincia de El Oro.	33
3.2.- Determinación de positividad para ab de DVB en los diferentes cantones	34

3.3.- Determinación de positividad para ab de DVB según el plan reproductivo del hato lechero.....	36
3.4.- Determinación de positividad para ab de DVB de acuerdo al estado de vacunación.....	37
3.5.- Determinación de la validez del ensayo en el muestreo grupal	39
3.6.- Mapa epidemiológico de El Oro.....	40
4.- CONCLUSIONES	42
5.- RECOMENDACIONES	43
6.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44
7.- ANEXOS.....	48

INTRODUCCION

Alrededor de todo el mundo, los estudios de prevalencia muestran que la infección por el virus de la Diarrea Viral Bovina se encuentra ampliamente extendida en la mayoría de los países ganaderos. El contacto directo con animales PI es probablemente el método más importante de transmisión de infección; sin embargo, los estudios de campo han demostrado que algunas infecciones también ocurren en ausencia de animales PI. Esto puede deberse a contacto con animales infectados de forma aguda o contacto con otras especies infectados con BVDV. Diferentes formas de transmisión indirecta como agujas y equipos contaminados han sido probadas experimentalmente, y se considera que la transmisión indirecta tiene cierta importancia desde el punto de vista económico ya que la BVDV es una de las enfermedades de mayor presencia que causa déficits en la producción láctea.

Si un animal PI (persistentemente infectado) es introducido directamente en un rebaño lechero, la mayoría de los animales serán infectados en unos pocos meses. En muchas ocasiones, sin embargo, puede ocurrir que se infecten por otros medios que no sean la introducción directa de animales PI. En estos casos, la infección a menudo se transmite a unos pocos animales después de lo cual se detiene. Además, también sucede que la infección se refuerza cuando los animales PI son nacidos en el mismo hato. Las líneas familiares de animales PI que dan a luz terneros PI son bastante comunes y puede hacer que la infección continúe durante varios años. Es por ello que el objetivo general del presente trabajo investigativo es:

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la presencia anticuerpos de Diarrea Viral Bovina mediante la aplicación del método Inmunoenzimático de ELISA de las muestras de leche en los distintos hatos lecheros ubicados en la Provincia de El Oro.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Detectar la presencia de anticuerpos circulantes de DVB en distintas granjas bovinas de la Provincia de El Oro.
- Validar la técnica diagnóstica ELISA para Diarrea Viral Bovina en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Machala
- Analizar la distribución epidemiológica de la Diarrea Viral Bovina en la provincia de El Oro.

1.- REVISION BIBLIOGRAFICA

La afección conocida como diarrea viral bovina es una enfermedad que se halla presente en varias explotaciones ganaderas del país trayendo como consecuencia varios factores perjudiciales entre ellos económicos y sanitarios para el ganado en general ya que se presenta con abortos, animales débiles, caquéticos y anoréxicos. (1) Esto ocasiona bajos niveles en parámetros de producción, así como deficiencias en los rendimientos reproductivos. (2)

Dado que la enfermedad describe una condición de signos clínicos muy variables y no tan específicos como entéricos o respiratorios puede pasar desapercibido como una enfermedad subclínica o en otro caso volverse mortal para el animal infectado. (3) Los animales como bovinos, caprinos u ovinos que han sido infectados y logran sobrevivir a la enfermedad pueden convertirse en los principales reservorios por lo que es indispensable evitar la comercialización de dichos animales. (2)

1.1.- Etiología

El agente viral del DVB es un pestivirus perteneciente a la familia flaviviridae el cual es un virus tipo ARN con envoltura. (1) Dicho virus posee una ausencia de exonucleasa que lo proveen de buenas propiedades de maleabilidad y variabilidad siendo capaz de corregir secuencias genéticas que se hallen con alteraciones erróneas. (3)

1.2.- Morfología

El agente viral de la DVB es un virus de ARN monocatenario que miden de 40 a 60nm a prox, cubierta de ua membrana fosfolipidica con la capacidad de formar varias proteinas; 4 estructurales y 8 no estructurales.(2)

Estructurales:

-Proteina estructural Erns

-GP48

-GP53

-P14

No estructurales:

-Proteina estructural p20

-p80

-p125

-ns4a

-ns4b

-ns5a y ns5b

(6)

1.3.- Tipos de cepas

El virus de la DVB puede presentarse en dos genotipos quienes se diferencian genómicamente entre sí (genotipo 1 y genotipo 2); además también pueden dividirse en biotipos citopáticos y no citopáticos los cuales se referencian fenotípicamente. (5)

-dVB tipo 1: Se trata del genotipo de mayor incidencia mundial con un porcentaje del 90%, además el que presenta mayor variabilidad en sus cepas. Se presenta cursando procesos de sintomatología leve presentando lesiones no graves en el tracto digestivo y órganos linfáticos, también acaba ocasionando patologías reproductivas. (2)

-dVB tipo 2: Este genotipo es la enfermedad en su forma más aguda por lo tanto mortal para el animal que la padece, cursando con sintomatología bien marcada de fiebre y constantes hemorragias, clínicamente se observa una trombocitopenia y linfopenia. (4)

1.4.- Patogénesis

Hospedador: Los pestivirus presentan una particular afinidad por animales ungulados del orden artiodactyla como bovinos, ovinos, caprinos, camélidos, búfalos y rumiantes silvestres. El pestivirus muestra un especial tropismo hacia las células epiteliales del sistema reproductor y los linfocitos del sistema inmune. (5)

Fuentes de infección: El hospedero representa la principal fuente de infección debido a una permanente diseminación a fetos o desarrollar inmunotolerancia. (4) Se conocen como animales persistentemente infectados (ip) los cuales excretarán y secretarán el virus a través de la saliva, orina, heces, lágrimas, semen, leche y secreción nasal. (6) Además se conocen otros focos de infecciosos como placentas o fetos abortados. (3)

1.5.- Transmisión

-*T. Vertical:* Se trata cuando la infección ocurre de madre a hijo también se conoce como transmisión placentaria, el virus tiene la capacidad de romper dicha barrera e infectar al feto generando así animales ip (persistentemente infectados). (5)

-*T. Horizontal:* Es horizontal cuando ocurre de un animal infectado a uno sano ya sea por contacto directo o indirecto; el directo se da cuando ocurre inhalación o ingesta del virus a través de cualquier de los productos de excreción y el indirecto a través de fómites como insectos hemofílicos, narigueros, biberones, agujas. (7)

También es posible la transmisión por contacto sexual a través de semen u óvulos infectados. (8)

1.6.- Respuesta inmune

Los microorganismos como los virus logran enfermar al hospedador al multiplicarse valiéndose de la maquinaria de replicación genómica de la célula, en el caso del virus de la diarrea viral bovino se presenta tropismo por los linfocitos del sistema inmune, el sistema inmune responderá generando células especializadas B y T (8).

Las células o linfocitos T cuentan con una subpoblación de linfocitos T cooperadores 1 y 2 como respuesta específica contra el virus, como consecuencia este provoca una respuesta que reduce la actividad de las células presentadoras de antígeno (ACP) (10).

1.7.- Cuadro clínico

Fase aguda: Una gran parte de los procesos de diarrea viral son de tipo agudo, puede aparecer al séptimo o décimo día después de haber estado en contacto con cualquier de los productos de excreción contaminados (9). Se manifiesta en forma de fiebre, anorexia, letargia, sialorrea, baja de producción láctea, descarga nasal y ocular así como diarrea leve y a veces puede aparecer úlceras gastrointestinales (11). En el estudio de hemograma puede observarse disminución de leucocitos, linfocitos y trombocitopenia (12). Los animales inmunodeprimidos de 6 meses y 2 años de edad son generalmente los mayormente afectados, este periodo agudo se caracteriza por tener una alta probabilidad de desarrollar la enfermedad (morbilidad) pero con baja probabilidad de mortalidad.(10)

Esta fase debe diferenciarse de la fase aguda grave la cual si posee una alta mortalidad y se puede caracterizar por un síndrome hemorrágico con fiebre muy altas, diarreas acuosas, problemas respiratorios entre otros.(11)

Fase subclínica: Aquellos animales que hayan estado en contacto con cepas (CP o NCP) existirá un 70 a 90% de probabilidad en desarrollar una infección subclínica la cual se presenta con un leve aumento de la temperatura con una inmunosupresión por la disminución de linfocitos. (1)

Fase crónica: Esta fase se caracteriza por la intermitente aparición de diarreas, úlceras en cavidades nasal y oral además de las pezuñas. Si el animal se encuentra inmunodeprimido podría ser mortal al cabo de algunas semanas. (1)

1.8.- Infección persistente (animales persistentemente infectados)

Suelen ser animales que se infectan con el agente patógeno de forma vertical, estos animales suelen pasar desapercibidos ya que no presentan signos clínicos aparentes y funcionan como un reservorio ya que continúan infectando a otros animales a través de agentes virales presentes en productos de excreción y secreción como orina, leche, saliva, semen.(13) Se consideran

conveniente realizar un control y diagnósticos de esta enfermedad ya que el animal una vez llegada la madurez sexual y se reproducirá procreando otros animales con esta misma condición.(10)

1.9.- Diagnostico diferencial

El agente viral causante de la DVB es un virus con una marcada propiedad de variabilidad por lo que sus distintas cepas pueden causar todo tipo de problemas ya sea gastroentéricos, respiratorios, reproductivos, entre otros, dificultando así su diagnóstico y tratamiento. Se consideran múltiples agentes etiológicos a descartar entre ellos. (4)

Bacterianas		Fúngicas
Salmonelosis		Aspergilosis
Leptospirosis		Mucormicosis
Brucelosis		Micotoxinas
Fiebre Q		Parasitosis
Colibacilosis		Toxoplasmosis
Compilobacteriosis		Neosporosis
Clostridiosis		Tricomoniasis
Víricas		Otras
Fiebre aftosa		Medicamentos
Lengua azul		Plantas toxicas
Enfermedad de Schmallerberg		Alimento

Rinotraqueitis infecciosa bovina		Genéticas
Fiebre catarral maligna		Estomatitis erosiva
Peste bovina		

1.10.- Métodos Diagnósticos Para DVB

Detección mediante la respuesta inmune de DVB

- **Test de neutralización viral**

Cuando se calibran correctamente, los ensayos de neutralización de virus (VN) son sensibles y específicos ensayos para la detección de anticuerpos contra BVDV, y han sido reconocidos durante mucho tiempo como la prueba de referencia para la serología de BVDV. Hoy en día, la prueba generalmente se realiza en 96 pocillos placas de microtitulación, donde los sueros de prueba diluidos en serie se incuban con un citopatógeno virus de desafío antes de que se agreguen células bovinas susceptibles y se incuben con el virus neutralizado durante 4 días. Debido a la alta especificidad de la prueba, es esencial utilizar un virus de desafío antigénicamente similar a los virus de campo en la población a probar. El ensayo VN requiere inversiones sustanciales en selección y monitoreo de cultivos celulares y medios para dar resultados de prueba satisfactorios, y, por lo tanto, no es adecuado para el examen de pocas o esporádicas muestras (15).

- **Inmunoensayo enzimático**

Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) son métodos de diagnóstico versátiles que puede diseñarse para detectar casi cualquier molécula inmunorreactiva. Para BVDV serología se han vuelto populares por varias razones; son independientes de la célula cultivos, se pueden aplicar fácilmente para la detección masiva, los resultados

de las pruebas se pueden leer en pocas horas y se pueden obtener resultados confiables con leche como material de prueba. Son posibles dos protocolos principalmente diferentes, amplificación de actividad (AA) o sistemas de modulación de actividad (AM). Entre los sistemas AA de uso común son ELISA indirectos, donde el antígeno se inmoviliza y se usa para atrapar anticuerpos específicos, que posteriormente se detectan mediante antiglobulinas específicas de especie conjugadas con enzimas y un sustrato cromogénico. La especificidad de tales sistemas está determinada por la elección de antígeno viral, que pueden ser partículas de virus purificadas, detergente extractos de células cultivadas inoculadas con BVDV, virus único antígenos inmovilizados con Mabs o proteínas virales recombinantes producida en bacterias. En los sistemas AM, los anticuerpos específicos de virus en el la muestra de prueba compite con o bloquea la unión de anticuerpos específicos de virus conjugados, dando como resultado una señal más baja para las muestras positivas. Cuando se compara el rendimiento de tales ELISA con el de un ensayo VN, solo aquellos. Se puede esperar que el uso de partículas de virus purificadas como antígeno dé los mismos resultados, pero, aun así, generalmente se han encontrado acuerdos aceptables para los ELISA anti NS2-3. Si los ELISA para la serología de BVDV se van a desarrollar internamente, una fuente conveniente del antígeno son cultivos celulares inoculados con BVDV, p. como lo describe. Los kits ELISA también están disponibles comercialmente. Entre los problemas observados con los ELISA AA para la serología de BVDV están los altos y variables señales de fondo causadas por contaminaciones en el antígeno de prueba, o reactividad cruzada de las antiglobulinas conjugadas con enzimas que dan como resultado una baja relación señal/ruido. AM ELISA basado en el bloqueo de Mabs conjugados con enzimas puede diseñarse para tener una alta capacidad analítica especificidad, pero es esencial que los Mabs empleados reconozcan todas las cepas de virus para para asegurar una suficiente sensibilidad epidemiológica (19).

Detección de componentes virales

- **Aislamiento de viral desde la célula**

El BVDV se puede replicar en muchos tipos diferentes de cultivos celulares. Comparado con muchos otros virus, los títulos de virus obtenidos en cultivos celulares son bajos y también pueden variar considerablemente para diferentes aislados de virus. Por lo tanto, la optimización del cultivo celular. El sistema es importante si el popular formato de múltiples pocillos de microtitulación para la prueba de series de se utilizan muestras. Entre los cultivos celulares más sensibles se encuentran los cultivos de paso bajo de células primarias de riñón bovino, cornetes y testículos. El suero fetal de ternera es utilizado para complementar el medio de cultivo celular debe estar libre de BVDV y BVDV- anticuerpos específicos. La sensibilidad de un sistema de cultivo celular determinado dependerá principalmente del volumen del inóculo y el período de incubación. Para la detección de ncp BVDV en sangre de PI animales, células cultivadas en placas de microtitulación de 96 pocillos e inoculadas con 10 ± 50 ml de suero durante 4 días puede dar resultados satisfactorios. Si se planean intentos de aislar BVDV de animales con infección aguda, leucocitos en sangre deben aislarse y cultivarse con células en frascos de cultivo más grandes durante dos o más pasajes. Dado que las células infectadas con ncp BVDV no se pueden distinguir de los controles no infectados, las células cultivadas generalmente se fijan e incuban con fluorocromo o enzima anticuerpos específicos de BVDV marcados. Para el ensayo de cp BVDV, las células cultivadas en matraces deben inocularse y examinarse diariamente por efecto citopático. Si está presente en títulos bajos, los focos de células lisadas pueden verse por fase microscopía de contraste, y si las células se fijan en esa etapa de la infección, el antígeno viral puede ser visto en la periferia de los focos. De lo contrario, un virus citopatogénico puede identificarse como BVDV por ej. por neutralización con anticuerpos específicos de BVDV. Se pueden utilizar pruebas de

neutralización cruzada utilizando sueros producidos contra diferentes cepas de virus. Para la demostración de diferencias antigénicas entre virus aislados. Más antigénico la diferenciación entre los tipos de BVDV se puede hacer con paneles de Mabs (21).

- **Detección de antígeno viral**

El principio básico de este método de diagnóstico es idéntico al del cultivo celular. Procedimiento de inmunotinción mencionado anteriormente, pero en lugar de células cultivadas para producción de antígeno, el antígeno preformado se detecta dentro o se extrae de las células tomado del animal huésped. Por reconocimiento morfológico de antígenos de BVDV localizados citoplasmáticamente en células infectadas, el examen inmunohistoquímico (IHC) de secciones de tejido proporciona un diagnóstico más específico que la detección de antígenos extraídos en una solución. El examen de biopsias de piel se ha correlacionado bien con los resultados de los análisis de sangre, pero las muestras de tejido son más difíciles de obtener de animales vivos que la sangre. Estos métodos son los más prometedores para diagnóstico post mortem de infección persistente con BVDV, pero debe evaluarse primero en muestras de ganado con infección aguda. Dado que la sangre está fácilmente disponible y también se usa para serología, muchos estudios sobre BVDV. Se han realizado pruebas de antígeno en sangre. Para pruebas rápidas e independientes de cultivos celulares de grandes series de muestras este método de prueba podría ser rentable. Los sistemas ELISA intensivos aparentemente han desalentado el uso generalizado del método (19).

Después de que los Mabs específicos de BVDV estuvieran disponibles, varios ELISA de captura de antígenos (agELISA) fueron desarrollados para la detección rápida de antígenos de BVDV extraídos de tejidos o leucocitos en sangre. Estos ag ELISA se basaron en Mabs específicos para uno o más antígenos virales tanto para la captura como para la detección del antígeno, o combinaciones de antisueros y Mabs. Dado que todos reconocen la proteína no estructural conservada antigénicamente NS2-3, deberían

poder detectar la mayoría, si no todas, las cepas de BVDV. el diagnostico rendimiento, la independencia de las instalaciones de cultivo celular y la velocidad de rendimiento ha hizo tales agELISAs invaluable para la prueba de series de muestras en el control organizado programas Inicialmente, tal agELISA parecía diagnosticar una infección persistente con BVDV selectivamente, pero informes posteriores han concluido que la sangre de ganado con infección aguda por BVDV también da positivo. Encontraron niveles de antígeno bajos y transitorios en cinco de 24 animales experimentando una infección aguda con BVDV, y que el 99% de los animales con altos niveles de. El antígeno de BVDV en leucocitos sanguíneos fue IP con BVDV. Sin embargo, conclusiones sobre el estado de la infección sobre la base de la realización de un agELISA puede no debe aplicarse en general a otras pruebas, ni a los resultados de las pruebas en diferentes poblaciones de ganado.

La secuenciación de nucleótidos de varios genomas de pestivirus ha servido como base para un rápido progreso en nuestra comprensión de la biología de estos virus. Este campo de la pestivirológica aún está sujeto a una intensa investigación, pero, se han obtenido suficientes datos para el desarrollo de pruebas diagnósticas sensibles y específicas, disponible para algunos años. Los primeros informes sobre la detección diagnóstica del ácido nucleico de BVDV en sondas radiactivas usadas con ácido para la hibridación de filtros, pero no hubo mejoras importantes en comparación con el diagnóstico establecido. Más tarde, numerosos informes sobre el uso de la polimerasa de transcripción inversa técnica de reacción en cadena (RT-PCR) para la amplificación de ADNc de BVDV, ensayos de RT-PCR utilizando cebadores específicos para estas regiones han ofrecido la mejor sensibilidad epidemiológica. La alta analítica la sensibilidad de los ensayos de RT-PCR doble o anidada generalmente no se requiere para las pruebas de rutina de muestras de sangre individuales para BVDV. Sin embargo, para algunas categorías de muestras, RT-PCR Los ensayos son muy útiles. Estos incluyen sangre de terneros PI

donde el virus se neutraliza. por anticuerpos maternos, sangre de animales con infección aguda, así como órganos muestras tóxicas para cultivos celulares.

Otra aplicación diagnóstica útil de la RT-PCR El método es el seguimiento de cultivos celulares y suero de ternero fetal utilizado como medio de cultivo celular. suplemento, los cuales pueden estar contaminados con BVDV. Secuenciación de nucleótidos de ADNc amplificado, p. por RT-PCR se ha utilizado para clasificación virológica de pestivirus de ruminantes estrechamente relacionados, incluso permiten una discriminación aún más fina entre los virus examinados (16).

1.11.- Medidas de control para DVB

Durante mucho tiempo, los intentos de controlar BVDV y reducir las pérdidas se limitaron a profilácticos prácticas de vacunación, implementadas principalmente para reducir o prevenir la enfermedad clínica en un rebaño (14). Sin embargo, el beneficio de prevenir la enfermedad en animales infectados transitoriamente es insignificante si se consideran las pérdidas totales (15). Durante la década de 1990 hubo una estrategia sistemática para el control de BVDV, basada en conocimiento de la epidemiología de la enfermedad y por lo tanto, se centró en la prevención de la infección fetal en gestación temprana, evolucionado dentro de la erradicación programas en los países escandinavos. Esta estrategia, a veces denominada estrategia general modelo de control BVDV, se basa en los tres elementos centrales 1) bioseguridad, para prevenir introducción de la infección en rebaños libres; 2) eliminación de animales IP en rebaños infectados para reducir la circulación de virus; y 3) continuo seguimiento de rebaños libres para la detección precoz de reinfección (16).

1.12.- Programas de control internacional para detección de DVB

Debido a su papel crucial en la propagación del BVDV, los terneros PI son el principal objetivo de los programas de control de enfermedades, que están en marcha en varios países (17). A pesar del objetivo común de erradicación del virus de la respectiva población bovina, se

seleccionaron diferentes enfoques para los programas (18). Mientras que el “modelo escandinavo” se basó en la serología de la leche a gran escala, el “modelo suizo” se basó en la prueba directa de antígeno o genoma viral de todos los animales sin preselección serológica (19). Este último resultó beneficioso especialmente para las regiones con una alta prevalencia inicial del virus y un alto nivel de comercio y transporte de ganado combinado con campañas de vacunación en curso. La pieza central del "enfoque suizo", que también se adoptó en países como Alemania e Irlanda, es la detección de animales IP lo antes posible, principalmente mediante pruebas basadas en la muesca en la oreja de cada ternero recién nacido para detectar la presencia de antígeno viral o genoma, y su eliminación de los respectivos población de ganado (15). Una vez que se eliminan todos los animales PI, los rebaños no vacunados se vuelven gradualmente seronegativos, lo que permite el seguimiento basado en la serología del estado libre de enfermedad (16). En aquellos rebaños no vacunados y libres de BVDV, la serología de la leche a granel se puede usar para detectar la introducción del virus (15). Como enfoque alternativo, se podrían aplicar pruebas puntuales en animales jóvenes mayores de 6 meses (para evitar la influencia negativa de los anticuerpos derivados de la madre adquiridos por la ingesta de calostro). El “modelo escandinavo”, por otro lado, se basó directamente en la serología a gran escala para preseleccionar granjas con un riesgo elevado de presencia de animales IP (19). A partir de entonces, todos los animales de los rebaños con altos niveles de anticuerpos se analizaron individualmente para detectar el genoma del virus o el antígeno y se eliminaron los animales con PI detectados. Finalmente, se estableció un seguimiento serológico continuo. Por lo tanto, en su fase final, ambos enfoques se basan en el seguimiento basado en la serología del estado libre de enfermedad (18).

1.13.- Rol de las vacunas

Los programas de vacunación modernos están diseñados no sólo para prevenir enfermedades clínicas, sino también para proteger contra la viremia y prevenir el feto infección, y varios estudios

de provocación indican que tanto las vacunas inactivadas como las vacunas vivas puede prevenir la infección fetal bajo control condiciones experimentales (20). Sin embargo, la eficacia de estas vacunas para proteger a los fetos contra la infección en condiciones de campo ha sido cuestionado, y observaciones de campo, donde han nacido terneros PI vacunados (25). Y porque el 100% de eficacia y cobertura es necesarios para evitar que la infección sea establecida, si se introduce, la vacunación tiene, a pesar del uso generalizado, no logró reducir la incidencia y prevalencia de BVDV, en parte también explicado por la frecuente planteó la preocupación de que la vacunación puede crear una falsa sensación de seguridad, creando una oportunidad para ruptura de bioseguridad (18). En el contexto del control sistemático de BVDV, la vacunación se ha descrito como opcional elemento en áreas donde el riesgo de reintroducción en rebaños libres se percibe como muy alto (21).

2.- DISEÑO METODOLÓGICO

2.1.- Localización de la zona de estudio.



- Coordenadas: 3°16'00"S 79°58'00"O
- Temperatura: 25°C aprox.
- Humedad relativa: 85%
- Altitud: Media:1000msnm – Maxima:3750msnm – Minima:0msnm

La Provincia de El Oro es una de las 24 provincias que son parte de la República del Ecuador, se halla en el sur del país, en la zona geográfica conocida como región litoral o costa. Su capital administrativa es la ciudad de Machala, la cual además es la urbe más grande y poblada. Ocupa

un territorio de unos 5.879 km², siendo la décima séptima provincia del país por extensión. Limita al norte con Guayas, al sur y este con Loja, por el noreste con Azuay, y al occidente con la provincia de Zarumilla, Perú.

En el territorio oreense habitan 715.751 personas, según la proyección demográfica del INEC para 2020, siendo la sexta provincia más poblada del país. La Provincia de El Oro está constituida por 14 cantones, de las cuales se derivan sus respectivas parroquias urbanas y rurales. Según el último ordenamiento territorial, la provincia de El Oro pertenecerá a una región comprendida también por las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, aunque no esté oficialmente conformada, denominada Región Sur.

Es uno de los más importantes centros administrativos, económicos, financieros y comerciales del Ecuador. Las actividades principales de la provincia son el comercio, la ganadería, la industria y la agricultura. Su rica región genera un gran comercio basado en la producción agrícola, de camarón, arroz, banano, cacao entre otros.

Al suroeste, es el más importante puerto exportador de banano de Ecuador y por lo tanto, Machala es conocida también como la "capital bananera del mundo", debido a que la actividad de la ciudad y la provincia gira en torno a la exportación de banano. Los tanques que fueron muestreados son indicados a continuación con su respectiva georreferencia.

- **Granja:** Hda Santa Inés – Parroquia El Cambio - Machala
- **Coordenadas GPS:** 3°17'25.0"S 79°54'50.8"W
- **Granja:** Hda Dr. Ivan Ludeña – Parroquia Puerto Jeli - Santa Rosa
- **Coordenadas GPS:** 3°25'51.1"S 79°59'01.3"W
- **Granja:** Hda Sr. Humberto Nagua – Sector Dumari – Cantón Chilla
- **Coordenadas GPS:** 3°25'33.8"S 79°40'37.5"W
- **Granja:** Hda. Sr Victor Espinosa – Sector Dumari – Cantón Chilla

- **Coordenadas GPS:** 3°26'18.6"S 79°40'22.4"W
- **Granja:** Hda. Sr. Máximo Belduma - Sector Dumari – Cantón Chilla
- **Coordenadas GPS:** 3°26'24.5"S 79°40'57.4"W
- **Granja:** Hda. Ing. Carmen Espinosa - Sector umari – Cantón Chilla
- **Coordenadas GPS:** 3°26'40.1"S 79°39'54.5"W
- **Granja:** Hda. Sra. Zoila Belduma - Sector Dumari – Cantón Chilla
- **Coordenadas GPS:** 3°26'20.8"S 79°41'11.2"W
- **Granja:** Hda. Sr. Miro Loja – Sector Dumari - Cantón Chilla
- **Coordenadas GPS:** 3°26'26.0"S 79°41'10.5"W
- **Granja:** Hda. Sr. Arnulfo – Sector Dumari - Cantón Chilla
- **Coordenadas GPS:** 3°26'15.8"S 79°41'27.3"W

2.2.- Equipo de laboratorio usado

- Nevera inducible 580
- Lector de microelisa Rayto rt
- Centrifuga DYNAC
- Incubadora Memmert
- Micropipetas

2.3.- Materiales

- Frascos estériles
- Varilla recolectora
- Guantes de látex
- Alcohol antiséptico
- Alcohol potable
- Encendedor

- Rotuladores
- Atomizador
- Caja térmica de refrigeración (cooler)
- Kit CIVTest ELISA BDV-BD p80

2.4.- Procedimiento Para La Toma De Muestras

Las muestras de leche fueron obtenidas de los diferentes hatos lecheros ubicados en distintos cantones de la Provincia de El Oro. Se estuvo presente durante el tiempo de ordeño, se realizó la identificación de cada animal así como de los tanques de leche destinadas a la producción del día. Una vez finalizado el ordeño se procedió a la recolección de la muestra de leche (muestras investigadas).

Se inicia el muestreo con la esterilización de la varilla colectora, para lo cual se rocía alcohol potable al 96%, con un atomizador estándar en cantidad suficiente para flameo. Se espera unos minutos a que la llama se consuma y el alcohol seque completamente de la varilla, luego de esto se introdujo la misma en el tanque de leche y se mezcló en sentido horario/antihorario para asegurar la homogenización de la muestra.

Inmediatamente se tomó un volumen de leche de aproximadamente 50ml desde el fondo del tanque y se colocó en el frasco estéril de almacenamiento (recipiente comercial para orina) y se cierra herméticamente. Finalmente se procedió a rotular el frasco para identificación, y se llevó a transportador refrigerante (cooler) para su posterior traslado al laboratorio.

Todas las muestras el mismo día fueron llevadas al laboratorio de microbiología ambiente uno de la FCA y ubicadas en el refrigerador para muestras de fluidos a temperaturas 20°C – 4°C.

2.5.- Procedimiento para análisis en laboratorio

Para el procesamiento de las muestras se respetó las instrucciones dispuestas por el fabricante HIPRA - CIVTEST BOVIS BDV/BD P80 descritas a continuación:

Dejar que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente y asegurarse de que estén bien mezclados realizando una inversión suave del frasco.

Preparar una hoja de datos para identificar los pocillos individuales para cada muestra y control.

Los controles positivos y negativos deben analizarse por duplicado.

La solución de lavado debe prepararse a una dilución de 9 volúmenes de agua destilada por cada 1 volumen de solución de lavado.

1. Despegar la cubierta adhesiva del plástico y dispensar 100ul tanto de los controles positivo y negativo diluidos $\frac{1}{2}$ como de las muestras diluidas $\frac{1}{2}$ en solución de lavado (1x) (Vial N°0) a los pocillos apropiados en la placa.
2. Cubrir la placa con una cubierta adhesiva e incubar toda la noche entre 15 y 24 horas a +2 °C - +8 °C.
3. Retirar el adhesivo y realizar 4 lavados de cada pocillo con 300ul de Solución de lavado diluida. Al final, invertir la placa y golpearla firmemente sobre papel absorbente.
4. Anadir 100ul de solución de conjugado (Vial N° 2) a cada pocillo.
5. Cubrir la placa con una cubierta adhesiva e incubar 60 minutos a +36°C - +38°C.
6. Retirar el adhesivo y realizar 4 lavados de cada pocillo con 300ul de solución de lavado diluida. Al final, invertir la placa y golpearla firmemente sobre papel absorbente.
7. Dispensar en cada pocillo 100ul de solución de sustrato (vial No 3). Agitar suavemente la placa durante 2 segundos.
8. Sellar la placa con una tapa adhesiva e incubar a temperatura ambiente (+20 °C - +25°C) en la oscuridad durante 10 minutos.
9. Quitar la tapa adhesiva y dispensar en cada pocillo 100ul de solución de paro (vial No 4). Agitar golpeando ligeramente el flanco de la microplaca.

10. Limpiar la superficie inferior de la placa con un papel absorbente. Leer la placa utilizando un lector de ELISA equipado con un filtro de 450nm. Realizar previamente el blanco con el aire. Registrar los datos.

2.6.- Validación e interpretación de resultados

Validación: Se la realiza con los valores obtenidos en el lector de Elisa en los controles positivos y negativos. El test será válido si el valor de la DO (Densidad Óptica) media del control negativo es > 0,65 y el control positivo presenta un %IN (Porcentaje de inhibición) >60.

Interpretación: Para la interpretación de los resultados es necesario transformar las DO en porcentajes de inhibición (%IN) utilizando la siguiente formula (en ella se utiliza la media de DO obtenidas en las 2 réplicas del control negativos).

$$\%IN = \left[\frac{\text{Media } DO_{450} \text{ Control Negativo} - DO_{450} \text{ Muestra}}{\text{Media } DO_{450} \text{ Control Negativo}} \right] \times 100$$

Interpretación de resultados en **muestra de tanque de leche (Bovino):**

VALOR %IN	INTERPRETACIÓN MUESTRA	*PREVALENCIA DE ANIMALES POSITIVOS (P)
Inferior a 35	NEGATIVA	P < 10%
Mayor o igual a 35 e inferior a 60	POSITIVA +	10% <= P < 30%
Superior o igual a 60	POSITIVA ++	P >= 30%

* Dado que el volumen de leche que aporta cada vaca al tanque es variable, el valor de prevalencia a partir de la muestra de tanque debe considerarse orientativo.

3.- RESULTADOS Y DISCUSION

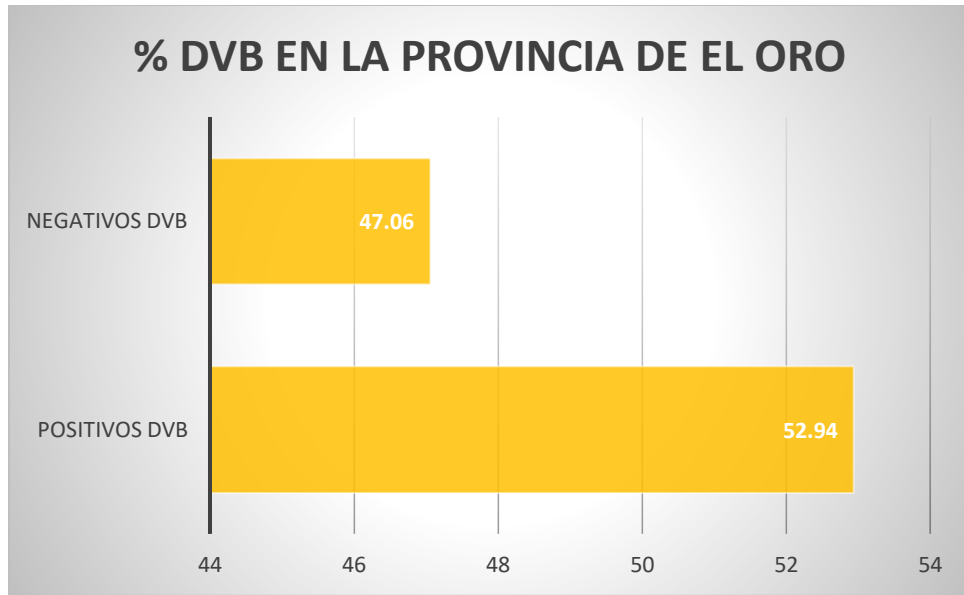
3.1.- Determinación de la positividad de DVB en los tanques de leche muestreados en la Provincia de El Oro.

El muestreo fue realizado en distintos cantones de la Provincia de El Oro, entre ellos: Machala, Santa Rosa, Chilla, El Guabo; siendo muestreados un total de 34 tanques los cuales eran propiedad de los 13 distintos hatos lecheros que fueron visitados.

Del total de 34 tanques dieron como resultado 16 tanques negativos y 18 tanques positivos. Por lo se pone en evidencia que es posible la circulación de anticuerpos de DVB en la condiciones meteorológicas y geográficas de la Provincia de El Oro.

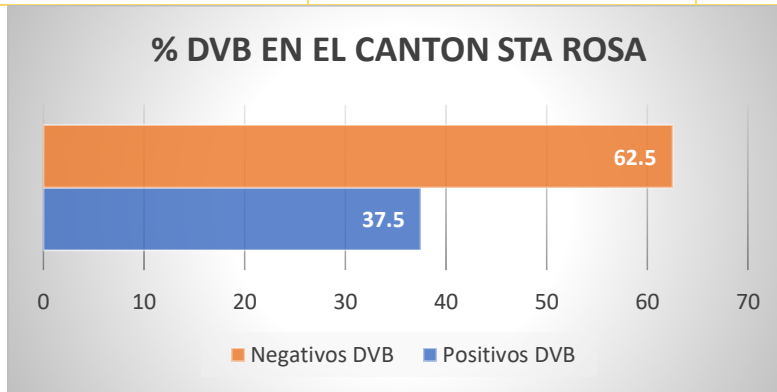
Esto último coincide con un estudio realizado en 2011 por Saa (9) en cual así mismo evidencio la circulación de anticuerpos de DVB en el sur de la sierra y amazonia ecuatoriana. Además de un estudio realizado por Narváz en 2021 (24) el cual así mismo realizo un estudio de detección de anticuerpos de DVB en suero sanguíneo en la provincia de Cotopaxi, demostrando circulación de anticuerpos de DVB en condiciones climáticas diferentes a las de la Provincia de El Oro.

RESULTADO OBTENIDO	NUMERO DE MUESTRAS	%
Positivos DVB	18	52,94
Negativos DVB	16	47,06
Total	34	100

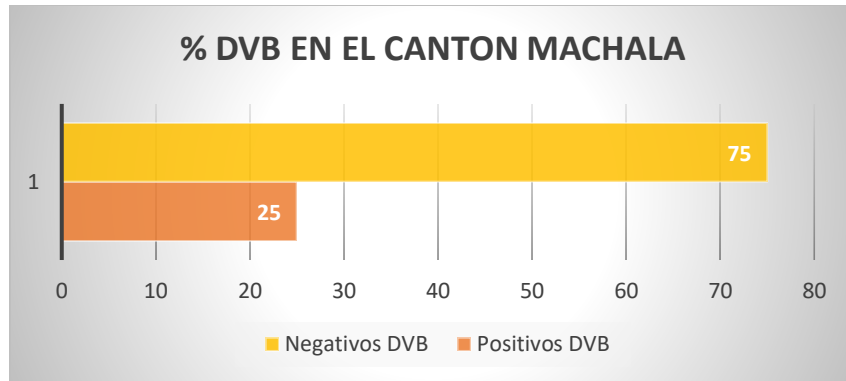


3.2.- Determinación de positividad de DVB en los diferentes cantones

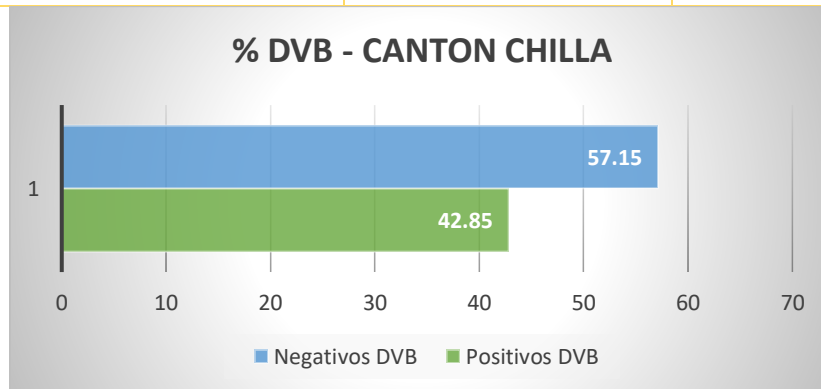
Santa Rosa		
RESULTADO OBTENIDO	NUMERO DE MUESTRAS	%
Positivos DVB	3	37,5
Negativos DVB	5	62,5
Total	8	100



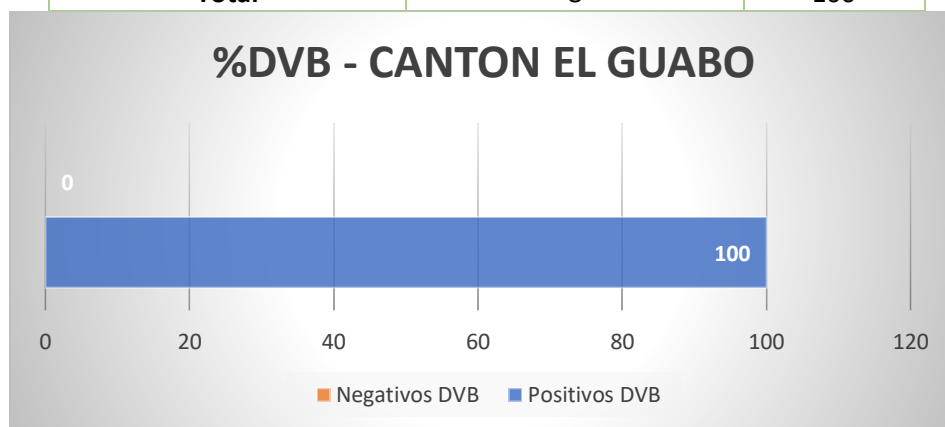
Machala		
RESULTADO OBTENIDO	NUMERO DE MUESTRAS	%
Positivos DVB	1	25
Negativos DVB	3	75
Total	8	100



Chilla		
RESULTADO OBTENIDO	NUMERO DE MUESTRAS	%
Positivos DVB	6	42,85
Negativos DVB	8	57,15
Total	14	100



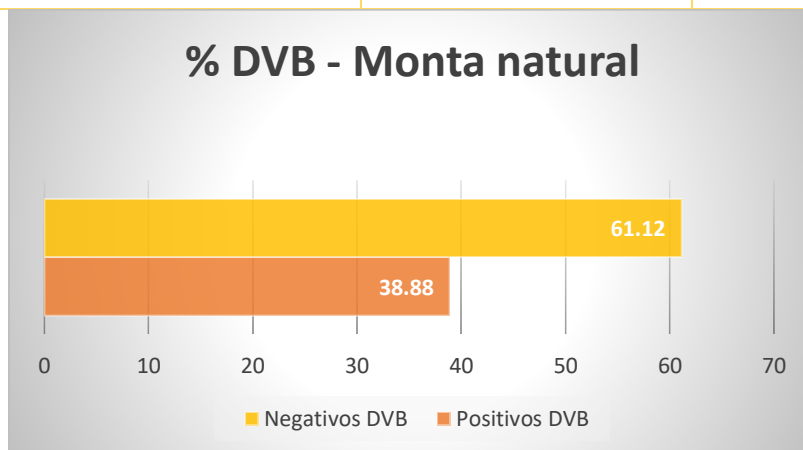
El Guabo		
RESULTADO OBTENIDO	NUMERO DE MUESTRAS	%
Positivos DVB	8	100
Negativos DVB	0	0
Total	8	100



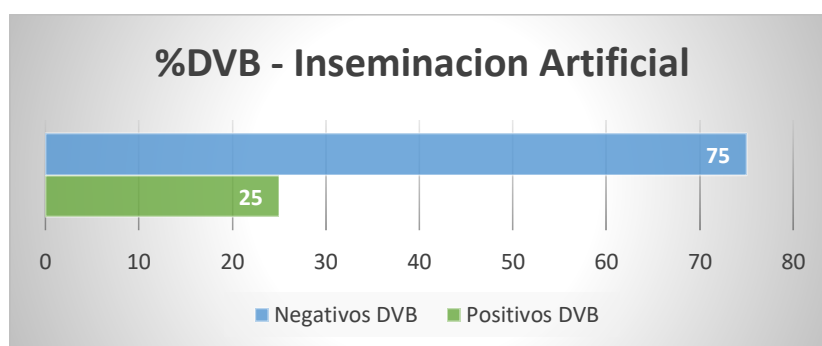
Del total de las muestras obtenidas en los distintos cantones, se puede determinar que el cantón con mayor circulación de anticuerpos es El Guabo con un total de 8 positivos, los cuales representan al 23,52% de total de tanques muestreados en la provincia.

3.3.- Determinación de positividad de DVB de acuerdo al plan reproductivo del hato lechero.

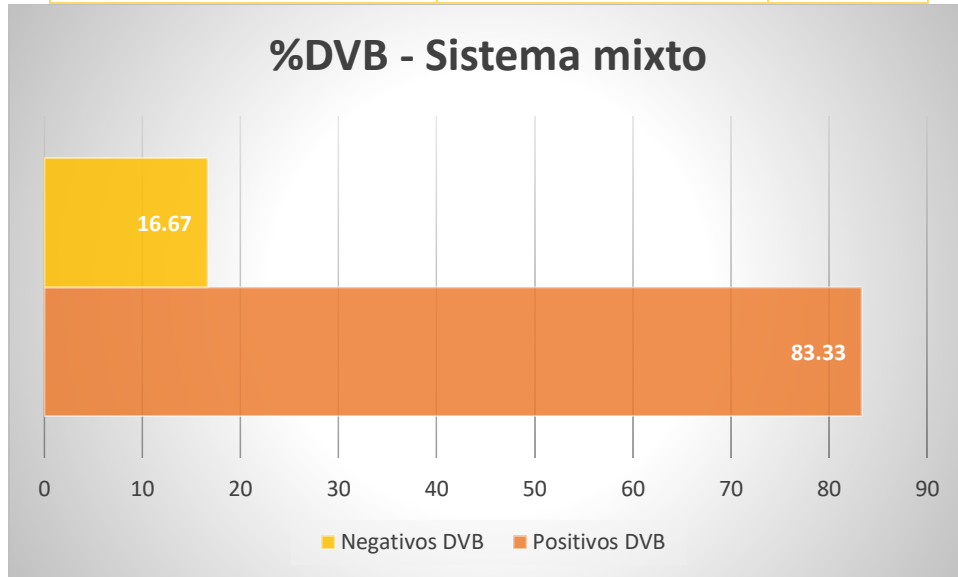
Monta natural		
RESULTADO OBTENIDO	NUMERO DE MUESTRAS	%
Positivos DVB	7	38,88
Negativos DVB	11	61,12
Total	18	100



Inseminacion		
RESULTADO OBTENIDO	NUMERO DE MUESTRAS	%
Positivos DVB	1	25
Negativos DVB	3	75
Total	4	100



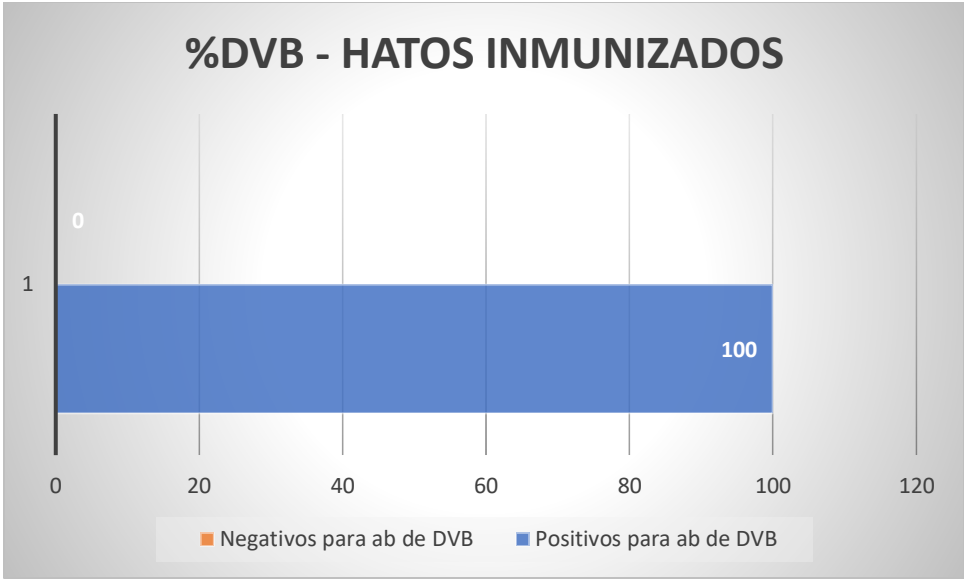
Mixto		
RESULTADO OBTENIDO	NUMERO DE MUESTRAS	%
Positivos DVB	10	83,33
Negativos DVB	2	16,67
Total	12	100



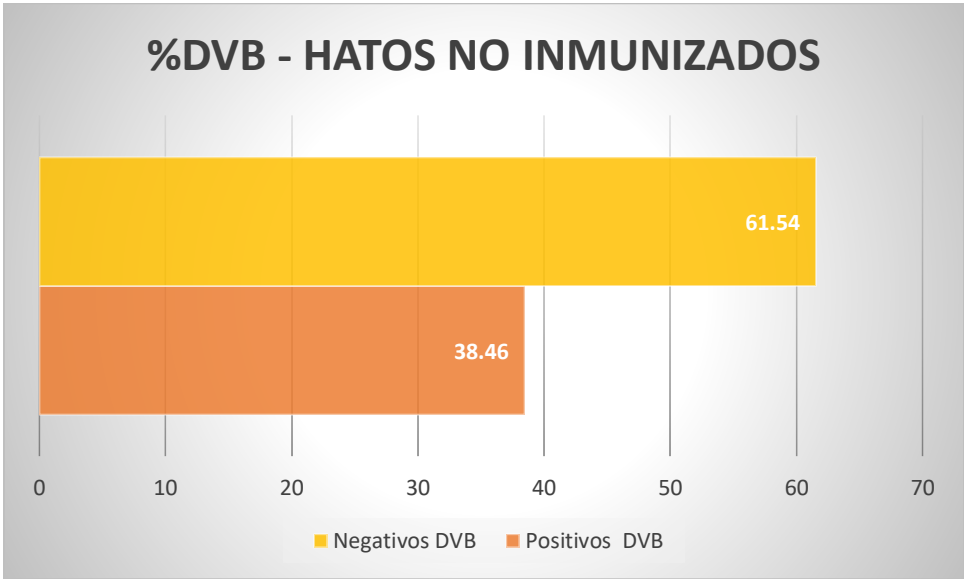
Del total de muestras analizadas se puede determinar que el mayor caso de positivos se dio en los hatos que mantiene un sistema mixto como tipo de plan reproductivo, siendo 10 casos positivos, el cual representa un 29,41% del total de las 34 muestras analizadas.

3.4.- Determinación de positividad de DVB de acuerdo al plan vacunal.

Inmunizados		
RESULTADO OBTENIDO	NUMERO DE MUESTRAS	%
Positivos para ab de DVB	8	100
Negativos para ab de DVB	0	0
Total	8	100



No inmunizados		
RESULTADO OBTENIDO	NUMERO DE MUESTRAS	%
Positivos DVB	10	38,46
Negativos DVB	16	61,54
Total	26	100



De las muestras tomadas de hatos que no cuentan con planes vacunales, se determinaron 10 casos positivos los cuales representan un 29,41% del total de 34 tanques de leches muestreados.

En hatos que cuentan con un plan vacunal son considerados como falsos positivos debido a la inmunización otorgada por la vacuna (Cattle Master Gold) la cual causa la producción de anticuerpos, que posteriormente llegarán a circulación y serán detectados durante el inmunoensayo.

3.5.- Determinación de la validez del ensayo en el muestreo grupal

Determinar la validez del ensayo es parte fundamental para la lectura de los resultados, ya que mediante los datos obtenidos de los controles positivos y negativos se garantiza el nivel de confiabilidad de la prueba diagnóstica (ELISA). A continuación, se muestran datos de densidad óptica (DO) y porcentaje de inhibición (%IN) obtenidos en cada grupo muestreado, realizado con un doble control positivo y negativo.

Grupo	Canton de muestreo	Granja	IN% positivo	DO negativa	Validacion
1	Machala	Santa Ines	70,693	1,76	Validada
	Machala	Santa Ines			
	Machala	Santa Ines	66,515	1,543	
	Machala	Santa Ines			

Grupo	Canton de muestreo	Granja	IN% positivo	DO negativa	Validacion
2	Santa Rosa	Dr. Ivan Ludeña	64,853	1,532	Validada
	Santa Rosa	Dr. Ivan Ludeña			
	Santa Rosa	Dr. Ivan Ludeña	68,678	1,501	
	Santa Rosa	Dr. Ivan Ludeña			

Grupo	Canton de muestreo	Granja	IN% positivo	DO negativa	Validacion
3	El Guabo	Dr. Eras	64,145	1,582	Validada
	El Guabo	Dr. Eras			
	El Guabo	Dr. Eras			
	El Guabo	Dr. Eras			
	El Guabo	Dr. Eras	68,265	1,525	
	El Guabo	Dr. Eras			
	El Guabo	Dr. Eras			
	El Guabo	Dr. Eras			

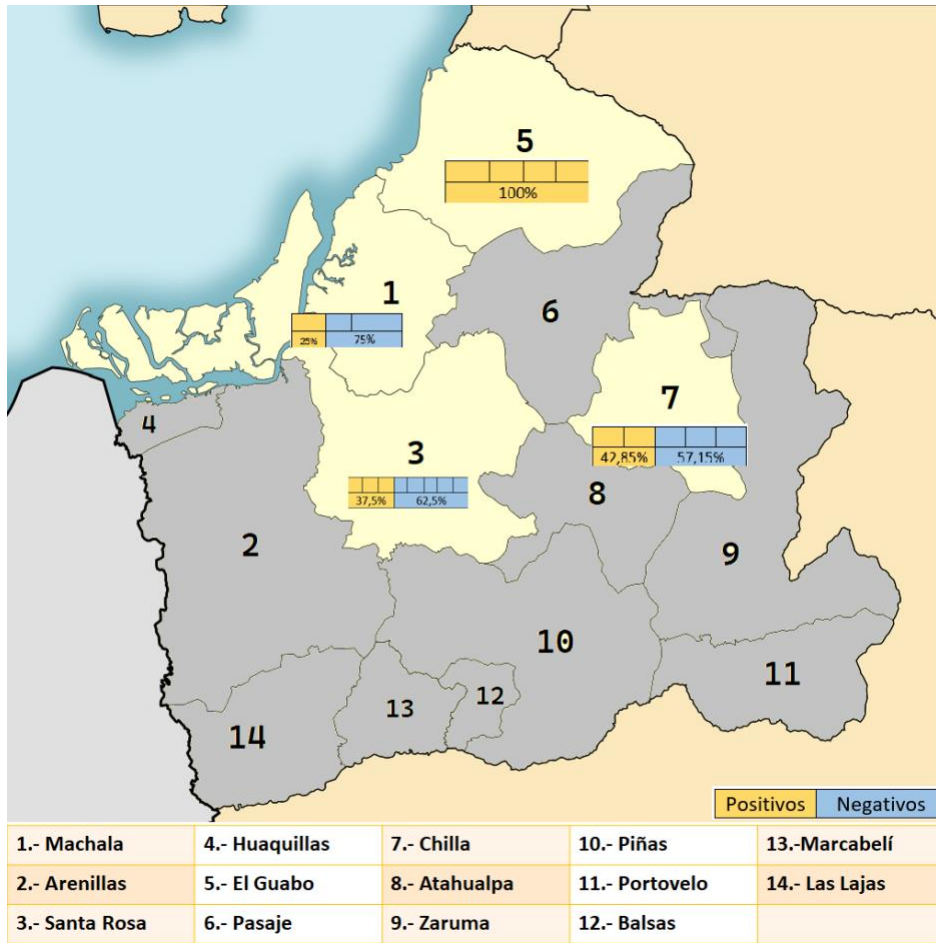
Grupo	Canton de muestreo	Granja	IN% positivo	DO negativa	Validacion
4	Chilla	Humberto Nagua	68,848	1,604	Validada
	Chilla	Luis Cuenca			
	Chilla	Victor Espinosa			
	Chilla	Carmen Espinosa			
	Chilla	Carmen Espinosa			
	Chilla	Maximo Belduma	62,975	1,529	
	Chilla	Zoila Belduma			
	Chilla	Miro Loja			
	Chilla	Arnulfo Garvay			
	Chilla	Rafael Azansa			

Grupo	Canton de muestreo	Granja	IN% positivo	DO negativa	Validacion
5	Chilla	Carmen Espinosa	73,476	1,734	Validada
	Chilla	Carmen Espinosa			
	Chilla	Carmen Espinosa	68,362	1,629	
	Chilla	Carmen Espinosa			

Grupo	Canton de muestreo	Granja	IN% positivo	DO negativa	Validacion
6	Santa Rosa	Dr. Mena	80,915	1,279	Validada
	Santa Rosa	Dr. Mena			
	Santa Rosa	Dr. Mena	62,624	1,236	
	Santa Rosa	Dr. Mena			

3.6.- Mapa epidemiológico de El Oro

A través de una ilustración geográfica se reportan los valores porcentuales de los casos positivos y negativos determinados durante la investigación.



4.- CONCLUSIONES

Se determino la presencia de anticuerpos circulantes de DVB mediante la aplicación del método Inmunoenzimatico ELISA, habiendo obtenido un 53% de casos positivos y un 47% de negativos.

Se detecto la circulación de anticuerpos para DVB diferenciándose según varios criterios de clasificación tales como: determinación individual de cada cantón muestreado, siendo El Guabo el cantón con mayor cantidad de positivos. Además, en el sistema reproductivo mediante inseminación artificial se obtuvieron el menor número de casos positivos (solo un caso positivo para este tipo de sistema), en comparación con los otros tipos de sistemas reproductivos como lo es la monta natural o el mixto.

Se realizo la validación de la técnica de Inmunoenzimatico ELISA mediante la obtención de los parámetros de DO y IN% obtenidos en cada grupo de leche analizada.

5.- 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 la 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.

6.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- The Clinical Manifestations of Bovine Viral Diarrhea Infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1995 Nov 1;11(3):425–45. From: [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30460-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30460-6)
- 2.- Epidemiology of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1995 Nov 1;11(3):521–47. From: [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30465-5](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30465-5)
- 3.- Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2004 Mar 1;20(1):5–19. From: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.006>
- 4.- Brodersen BW. Bovine viral diarrhoea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Vet Pathol.* 2014 Mar;51(2):453–64. From: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24476940/>
- 5.- Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet Microbiol.* 1999 Jan 1;64(2-3):123–34. From: [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00264-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00264-8)
- 6.- Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *The Veterinary Journal.* 2014 Feb 1;199(2):201–9. From: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024>
- 7.- Bovine Viral Diarrhoea Virus within and herd prevalence on pasture-based dairy systems, in southern Chile dairy farms. *Prev Vet Med.* 2022 Jan 1;198:105533. From: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105533>
- 8.- Karimi O, Bitaraf Sani M, Bakhshesh M, Harofteh JZ, Poormirzayee H. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies and risk factors in dairy cattle from the central desert of Iran. *Trop Anim Health Prod.* 2022 May 3;54(3):1–7. From: <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03180-0>

9.- Saa LR, Perea A, García-Bocanegra I, Arenas AJ, Jara DV, Ramos R, et al. Seroprevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. *Trop Anim Health Prod.* 2011 Aug 7;44(3):645–9. From: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21822791/>

11.- Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle from Sotaquirá, Colombia. *Veterinary and Animal Science.* 2021 Dec 1;14:100202. From: <https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.100202>.

12.- Risk factors associated with the within-farm transmission of bovine viral diarrhoea virus and the incidence of persistently infected cattle on dairy farms from Ibaraki prefecture of Japan. *Res Vet Sci.* 2020 Apr 1;129:187–92. From: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.02.001>

13.- Albrecht K, Linder M, Heinrich A, Höche J, Beer M, Gaede W, et al. Re-Introduction of Bovine Viral Diarrhoea Virus in a Disease-Free Region: Impact on the Affected Cattle Herd and Diagnostic Implications. *Pathogens.* 2021 Mar 18;10(3):360. From: <https://doi.org/10.3390/pathogens10030360>

14.- Factors associated with the bovine viral diarrhoea (BVD) status in cattle herds in Northwest Germany. *Vet Microbiol.* 2018 Mar 1;216:212–7. From: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.01.018>

15.- El Fadeel MRA, Soliman EM, Allam AM, ElKersh MF, El-Baky RMA, Mustafa A. Efficacy and durability of bovine virus diarrhoea (BVD) virus killed vaccine adjuvanted with monolaurin. *PLoS One.* 2022 Jul 14;17(7):e0269031. From: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269031>

16.- Wernike K, Beer M. International proficiency trial for bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibody detection: limitations of milk serology. *BMC Vet Res.* 2022 May 6;18(1):1–11. From: <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03265-w>

- 17.- Ståhl K, Alenius S. BVDV control and eradication in Europe--an update. *Jpn J Vet Res*. 2012 Feb;60 Suppl:S31–9. From: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22458198/>
- 18.- Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals*. 2003 Jun 1;31(2):113–8. From: [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00025-3](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00025-3)
- 20.- Compatibility of a live infectious bovine rhinotracheitis (IBR) marker vaccine and an inactivated bovine viral diarrhoea virus (BVDV) vaccine. *Vaccine*. 2007 Sep 4;25(36):6613–7. From: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.06.050>
- 21.- Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2004 Mar 1;20(1):115–29. From: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.001>
- 22.- Barrett DJ, More SJ, Graham DA, O’Flaherty J, Doherty ML, Gunn HM. Considerations on BVD eradication for the Irish livestock industry. *Ir Vet J*. 2011 Oct 3;64(1):1–10. From: <https://doi.org/10.1186/2046-0481-64-12>
- 23.- Pinior B, Garcia S, Minviel JJ, Raboisson D. Epidemiological factors and mitigation measures influencing production losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection: A meta-analysis. *Transbound Emerg Dis*. 2019 Nov;66(6):2426–39. From: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31328411/>
- 24.- Narváez KP. Prevalencia De Enfermedades Infecciosas Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (Ibr), Diarrea Viral Bovina (Dvb) Y Parainfluenza Bovina Tipo Iii (Pi3) En Pequeños Hatos Ganaderos En La Parroquia De San Andrés, Cantón Píllaro En La Provincia De Tungurahua. *Universidad Técnica de Cotopaxi*. 2021, Ago. 1-79. From: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/8001/1/PC-002040.pdf>

25.- Infection with Bovine Viral Diarrhea Virus in Cattle in Southern Papua, Indonesia. *Acta Trop.*
2020 Dec 1;212:105712. From: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105712>

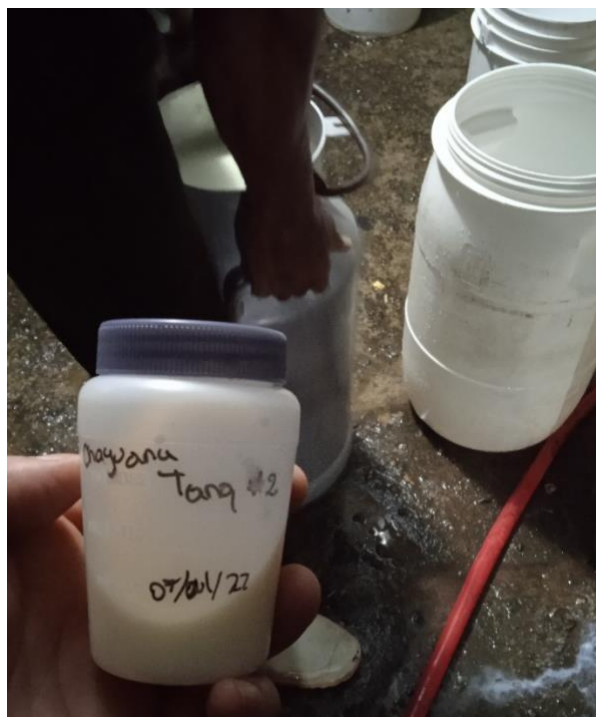
7.- ANEXOS



Memoria #1: Recoleccion de muestras en tanques de leche, in situ



Memoria #2: Tanques de leche listos para ser muestreados, in situ



Memoria #3: Muestra de leche recolectada



Memoria #4: Muestra de leche recolectada



Memoria #5: Muestras siendo llevadas a laboratorio en recipiente térmico.



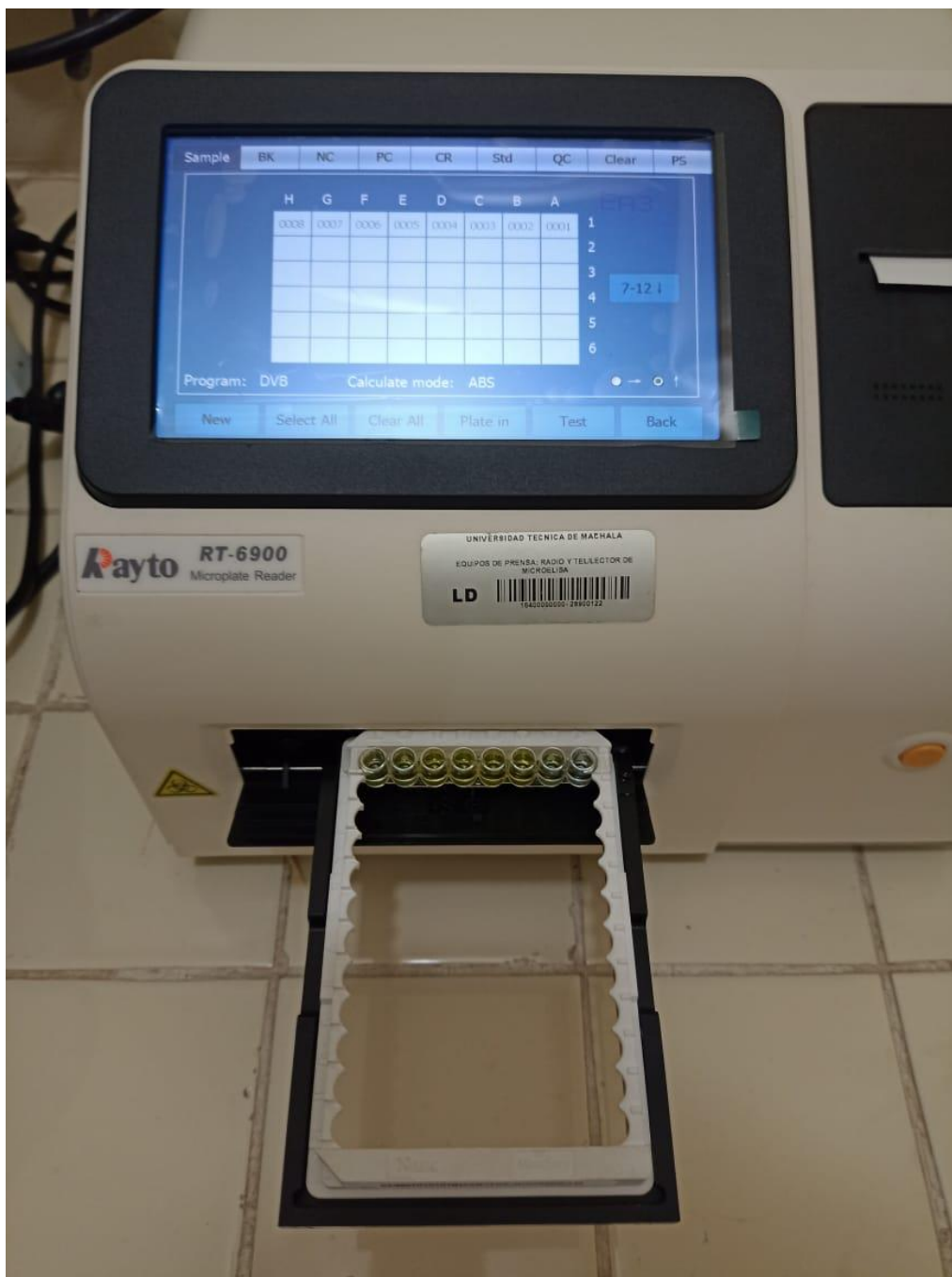
Memoria #6: Preparación de muestras (centrifugación) previo al ensayo



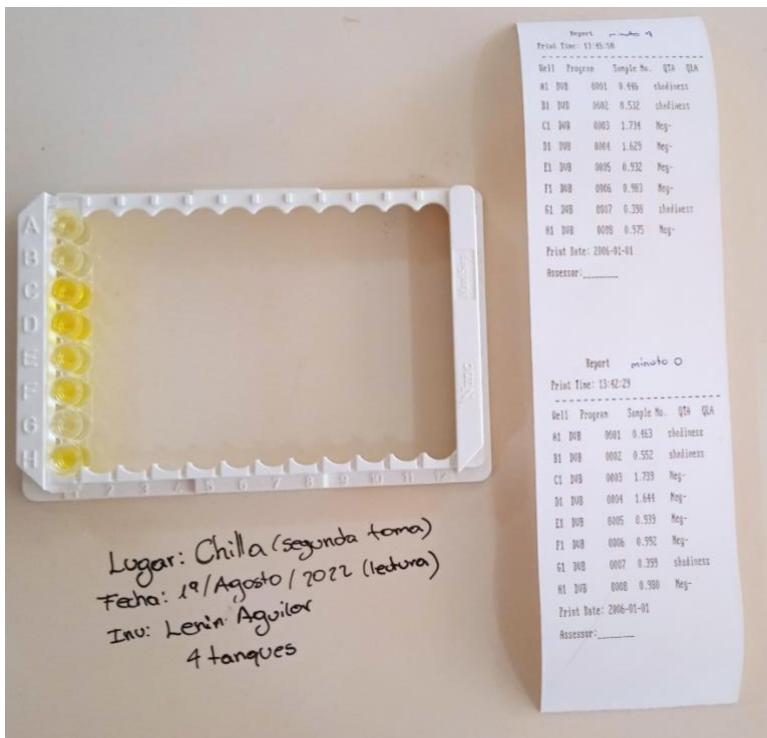
Memoria #7: Equipo y materiales usados durante el ensayo



Memoria #8: Uso de micropipeta durante el desarrollo del ensayo



Memoria #9: Colocación de microplaca dentro del lector de Elisa para obtención de resultados



Memoria #10: Obtención de resultados en el lector de micro Elisa

10/06/2022			
DESCRIPCIÓN	RESULTADOS OD	VALIDACIÓN % IN	PROMEDIOS
CONTROL POSITIVO	0,533	68,853	0,504
CONTROL POSITIVO	0,475	68,678	
CONTROL NEGATIVO	1,582	1,022	1,517
CONTROL NEGATIVO	1,501	1,022	
MUESTRA 1	1,627	7,287	
MUESTRA 2	0,897	40,851	
MUESTRA 3	1,149	24,233	
MUESTRA 4	1,175	22,519	

DESPUES DE LOS DOS MINUTOS			
DESCRIPCIÓN	RESULTADOS OD	VALIDACIÓN % IN	PROMEDIOS
CONTROL POSITIVO	0,497	68,216	0,462
CONTROL POSITIVO	0,427	70,992	
CONTROL NEGATIVO	1,49	1,223	1,472
CONTROL NEGATIVO	1,454	1,223	
MUESTRA 1	1,538	4,484	
MUESTRA 2	0,816	44,565	
MUESTRA 3	1,089	26,019	
MUESTRA 4	1,705	24,932	

Memoria #11: Lectura e interpretación de resultados



Memoria 12#: Equipo usado en el ensayo, Lector micro ELISA RAYTO



Memoria #13: Equipo usado durante el ensayo, centrifuga marca DYNAC



Memoria #14: Equipo usado durante el ensayo, Incubadora Memmert