



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

TITULO:

**“PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA EN LAS
GANADERÍAS DEL CANTÓN GONZANAMÁ”**

Tesis previa a la obtención del título
de Médico Veterinario Zootecnista

1859
AUTOR:

Luis Alfredo González Cuenca

DIRECTOR:

Dr. Hermógenes René Chamba Ochoa Mg. Sc.

Loja – Ecuador

2015

CERTIFICACIÓN

Dr. Hermógenes René Chamba Ochoa Mg.Sc.
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación denominado “**PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA EN LAS GANADERÍAS DEL CANTÓN GONZANAMÁ**” realizada por el egresado Luis Alfredo González Cuenca, previo a la obtención del título de Médico Veterinaria y Zootecnista, ha sido dirigido y prolijamente revisado desde el inicio de su ejecución; por lo tanto, se autoriza su presentación para la calificación correspondiente.

Loja, Octubre 19 del 2015.



Dr. Hermógenes René Chamba Ochoa. Mg. Sc
DIRECTOR DE TESIS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

**AREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

Loja, 21 de Octubre del 2015.

Tribunal de Grado

CERTIFICA:

Que luego de haber procedido a la calificación de Tesis escrita del trabajo de investigación titulado "PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA EN LAS GANADERÍAS DEL CANTÓN GONZANAMÁ" , del señor egresado, Luis Alfredo González Cuenca; y, al haber constatado que se ha incluido en el documento las observaciones y sugerencias realizadas por los miembros del Tribunal, autorizamos al interesado, continuar con los trámites correspondientes para su impresión, empastado y sustentación publica del referido trabajo de investigación.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Segundo Barragán Fierro Mg.Sc



.....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Rolando Sisalima Jara Mg. Sc.



.....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Patricia Soledad Ayora
Fernández.



.....

AUTORÍA

Yo, Luis Alfredo González Cuenca, declaro ser el autor del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Autor: Luis Alfredo González Cuenca

Firma.....

Cédula. 1104999105

Fecha: 21 de octubre del 2015

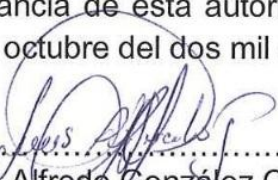
CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL, Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO.

Yo, **Luis Alfredo González Cuenca**, declaro ser autor de la tesis titulada: **“PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA EN LAS GANADERÍAS DEL CANTÓN GONZANAMÁ”**, como requisito para optar al grado de Médico Veterinario Zootecnista, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los veintiún días del mes de octubre del dos mil quince, firma el autor.

Firma: 

Autor: Luis Alfredo González Cuenca

Cedula: 1104999105

Dirección: Loja (Loja)

Correo electrónico: escorpion198910@hotmail.com

Teléfono: 0939867807

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de Tesis:	Dr. Hermógenes René Chamba Ochoa Mg.Sc.
Tribunal de Grado:	Dr. Segundo Barragán Fierro, Mg. Sc. PRESIDENTE
	Dr. Rolando Sisalima, Mg. Sc. VOCAL
	Dra. Patricia Ayora VOCAL

AGRADECIMIENTO

Dejo constancia de mi imperecedera gratitud a la Universidad Nacional de Loja al Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia en cuyas aulas tuve la oportunidad de estudiar, formarme, y alcanzar mi meta de ser un profesional de la Medicina Veterinaria, a todos sus distinguidos Catedráticos por haberme compartido sus sabios conocimientos y enseñanzas.

El Autor

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a mis padres quienes fueron el pilar fundamental para poder culminar con mi formación y cumplir una meta más de mi vida.

A mi hermana Esperanza quien estuvo en los momentos más difíciles apoyándome en todo momento día a día que con sus sabios conocimientos supo inculcarme valores de respeto humildad, honradez y se convirtió en la persona ejemplar a seguir. A todos mis hermanos quienes me apoyaron para la realización de esta tesis.

A mi novia Reyna por ser una persona súper especial y maravillosa que estuvo en todo momento a mi lado y que me apoyo en la elaboración de este documento.

A todos mis amigos y compañeros que compartimos durante 5 años las aulas y que estuvieron en las buenas y malas.

Luis Alfredo

ÍNDICE GENERAL

PORTADA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
APROBACIÓN.....	iii
AUTORÍA.....	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. ANTECEDENTES.....	3
2.2. ETIOLOGÍA Y ESTRUCTURA DEL VIRUS.....	3
2.3. VARIABILIDAD.....	6
2.3.1. Biotipos.....	7
2.3.2. Genotipos.....	8
2.4. EPIDEMIOLOGIA.....	9
2.4.1. Fuentes de la Infección.....	9
2.4.2. Métodos de Transmisión.....	10
2.4.3. Transmisión Vertical.....	10
2.4.4. Transmisión Horizontal.....	11
2.5. EPIDEMIOLOGÍA DE LOS ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS O PORTADORES DEL VDVB.....	11
2.6. PREVALENCIA DE LA DIARREA VIRAL BOVINA.....	12
2.7. PATOGÉNESIS.....	13

2.7.1.	Infección Subclínica.....	13
2.7.2.	Infección Aguda.....	14
2.7.3.	Enfermedad de las Mucosas.....	15
2.7.4.	Síndrome Hemorrágico.....	15
2.7.5.	Complejo Respiratorio.....	15
2.7.6.	Infección Persistente.....	16
2.7.7.	Infección Venérea.....	16
2.7.8.	Virus de la Diarrea Viral Bovina en Terneros Recién Nacidos.....	16
2.7.9.	Infecciones en Hembras Gestantes.....	17
2.8.	ASPECTOS INMUNOLÓGICOS.....	17
2.9.	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	18
2.9.1.	Elisa Indirecto.....	18
2.9.2.	Pasos Generales de un Elisa.....	20
2.9.3.	Kit para la Detección de Anticuerpos Frente al Virus de la Diarrea Vírica Bovina. (Bvdv). Idexx.....	20
2.9.3.1.	Reactivos.....	21
2.9.3.2.	Preparación de los reactivos.....	21
2.9.3.2.1	Solución de lavado.....	21
2.9.3.2.2	Preparación de las muestras.....	22
2.9.3.3.	Protocolo de ensayo.....	22
2.10.	Resultados.....	23
2.11.	Cálculos.....	24
2.11.1.	Cálculo de la Media del Control Negativo.....	24
2.11.2.	Cálculo de la Media del Control Positivo.....	24
2.11.3.	Cálculo del Resultado de la Muestra Analizada.....	24
2.11.4.	Interpretación de los Resultados.....	24
2.12.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1.	MATERIALES.....	26
3.1.1.	Materiales de Laboratorio.....	26
3.1.2.	Materiales de Campo.....	26

3.1.3.	Muestras Biológicas.....	27
3.1.4.	Materiales de Oficina.....	27
3.2.	MÉTODOS.....	27
3.2.1.	Ubicación y Delimitación del Área de Estudio.....	27
3.2.2.	Duración del Ensayo.....	28
3.2.3.	Método de Muestreo.....	28
3.2.4.	Tamaño de la Muestra.....	28
3.2.5.	Recolección de Muestras de Sangre.....	29
3.2.6.	En el Campo.....	29
3.2.6.1	Toma de la muestra.....	29
3.2.6.2.	Transporte de la muestra.....	30
3.2.7.	En el Laboratorio.....	30
3.2.7.1.	Manejo de la muestra.....	30
3.2.7.2	Extracción del suero.....	30
3.2.8.	Corrido de la Prueba.....	30
3.2.8.1.	Preparación de los reactivos.....	30
3.2.8.1.1.	Solución de lavado.....	30
3.2.8.1.2.	Preparación de la muestra.....	31
3.2.8.1.3.	Protocolos del ensayo.....	31
3.2.9.	Registro de Datos.....	32
3.3.	Variables.....	32
4.	RESULTADOS.....	34
5.	DISCUSIÓN.....	45
6.	CONCLUSIONES.....	46
7.	RECOMENDACIONES.....	49
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	50
9.	ANEXOS.....	56

ÍNDICE DE CUADROS

Contenido.....	pág.
Cuadro 1. Reactivos para la realización de la prueba de Elisa.....	20
Cuadro 2. Numero de muestras a recolectar de cada sector.....	28
Cuadro 3. Prevalencia de diarrea viral bovina en las ganaderías del cantón Gonzanamá.....	33
Cuadro 4. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo a la zona.....	34
Cuadro 5. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo a los pisos altitudinales.....	35
Cuadro 6. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo al número de partos.....	36
Cuadro 7. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo a la raza.....	37
Cuadro 8. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo al sistema de manejo.....	38
Cuadro 9. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo a la bioseguridad.....	39
Cuadro 10. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo al sexo.....	40
Cuadro 11. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo a los métodos de reproducción.....	41
Cuadro 12. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo a los signos clínicos	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	pág.
Figura 1. Representación esquemática del virus de DVB.....	4
Figura 2. Representación gráfica de la zona de estudio.....	26
Figura 3. Prevalencia de diarrea viral bovina en las ganaderías del cantón Gonzanamá.....	34
Figura 4. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo a la zona.....	35
Figura 5. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo a los pisos altitudinales.....	36
Figura 6. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo al número de partos.....	37
Figura 7. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo a la raza.....	38
Figura 8. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo al sistema de manejo.....	39
Figura 9. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo a la bioseguridad.....	40
Figura 10. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo al sexo.....	41
Figura 11. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo a los métodos de reproducción.....	42
Figura 12. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo a los signos clínicos	43

**“PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA EN LAS
GANADERÍAS DEL CANTÓN GONZANAMÁ”**

RESUMEN

La Diarrea Viral Bovina es una enfermedad que produce grandes pérdidas en los hatos ganaderos, de ahí la importancia de realizar un estudio sobre la prevalencia de la enfermedad en las ganaderías del Cantón Gonzanamá, mediante la detección del VDVB en la sangre de los bovinos, utilizando la prueba de ELISA indirecto, para ello se seleccionó 157 muestras de sangre, tomando en cuenta: la zona, pisos altitudinales, número de partos, raza, sistema de manejo, normas de bioseguridad, métodos de reproducción y signos clínicos. De las 157 muestras analizadas; 36 resultaron positivas, con una prevalencia total del 22.9%. Los índices más alto de acuerdo a la zona se presentaron en la parroquia de Gonzanamá con el 10.8%; se determinó que la enfermedad se encuentra con mayor frecuencia a niveles altitudinales de 1751 a 2100 m.s.n.m. con el 13.4% de prevalencia; así mismo bovinos hembras que tienen de 3 a 4 partos presentaron el porcentaje más alto con el 14%. La bovinos mestizos presentaron mayor porcentaje de positividad con un 16.5%; el sistema intensivo presentó el 22.9% de prevalencia; en hatos ganaderos que no aplican ningún tipo de normas de bioseguridad presentan el 21%. Las ganaderías que aplican la monta natural como método de reproducción presentó los valores más altos de prevalencia con el 22.9%; concluyendo que la mayoría de los casos positivos a Diarrea Viral Bovina no presentaron sintomatología de la enfermedad. A través de éstos resultados podemos deducir que existe una alta prevalencia de Diarrea Viral Bovina en las ganaderías del Cantón Gonzanamá.

Palabras clave. Prevalencia, Diarrea Viral Bovina. Gonzanamá, ELISA, Ganaderías.

ABSTRACT

Bovine Viral Diarrhoea is a disease that causes heavy losses in herds of livestock, hence the importance of conducting a study on the prevalence of the disease among herds within the canton of Gonzanamá through BVDV detection in the blood of cattle, using the indirect ELISA test. For this test 157 blood samples were selected, taking into account: the area, altitudinal tiers, number of births, breed, management system, biosafety standards, methods of reproduction and clinical signs. Of the 157 samples tested; 36 were positive, with an overall prevalence of 22.9%. The highest rates, according to the area, occurred in the parish of Gonzanamá with 10.8%; it was determined that the disease most often occurs at altitudinal levels of 1751-2100m which demonstrated a prevalence rate of 13.4%; Likewise, female cattle which have given birth 3-4 times had the highest percentage with 14%. Mixed-breed bovines presented a higher percentage of positivity with 16.5%; the intensive system showed a prevalence rate of 22.9%; on cattle ranches that do not apply any biosafety standards the rate shown was 21%. The farms that apply natural breeding and reproduction methods presented the highest values of prevalence with 22.9%; concluding that the majority of the positive Bovine Viral Diarrhea cases showed no symptoms of the disease. Through these results we can deduce that there is a high prevalence of Bovine Viral Diarrhea in the cattle ranches within the canton of Gonzanamá.

Keywords. Prevalence, Bovine Viral Diarrhea, Gonzanamá, ELISA, Cattle Ranches.

1. INTRODUCCIÓN

La Diarrea Viral Bovina es una enfermedad de curso agudo, que se caracteriza por producir hemorragias y erosiones en la mucosa oral, gástrica e intestinal. Tiene alta morbilidad y baja mortalidad y se originó en los EE. UU. (Olafson y col., 1946)

Históricamente y desde la visión clínica la infección por VBVD fue reconocida como la enfermedad de las mucosas, sin embargo más tarde se la asoció con abortos, muertes perinatales y malformaciones congénitas.

El VDVB miembro del género Pestivirus, familia Flaviviridae del genoma ARN, pequeño con una envoltura lipoproteínica, rodeado por una membrana fosfolipídica con tres glicoproteínas ancladas a ella. (Nettleton, 1995)

Esta enfermedad tiene una distribución mundial y la infección tiende a ser endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas. La mayoría de las encuestas en los diferentes países alcanza niveles de 0,5 a 2% de bovinos persistentemente infectados (PI) y 60 a 80% de bovinos seropositivos (Houe, 1999)

La infección del virus se presenta en una forma aguda, con manifestaciones leves o subclínicas con un corto periodo de replicación viral en los tejidos y eliminación viral, seguido de una completa recuperación debido a una sólida respuesta inmunitaria humoral y celular. Si el animal esta gestante, el virus atraviesa la placenta y puede ocasionar un conjunto de fetopatías que van desde la reabsorción embrionaria, aborto o malformaciones congénitas hasta el nacimiento de terneros infectados en forma persistente como resultado de la infección fetal entre 40 a 120 días de gestación. El ternero que nace infectado es inmunotolerante al virus, y por lo tanto, portador y principal diseminador del virus.

Se considera que un solo animal portador puede infectar al 90% de los animales del hato (House, 1995).

Para realizar el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos.

- 1 Determinar la prevalencia de la Diarrea Viral Bovina de acuerdo, a la zona pisos altitudinales, número de partos, raza, sistema de manejo, métodos de reproducción en las ganaderías del Cantón Gonzanamá.
- 2 Efectuar un análisis de correlación de los casos seropositivos diagnosticados por medio del método Elisa indirecto y los signos clínicos de esta enfermedad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES.

Diarrea Viral Bovina (DVB) afecta al ganado bovino y fue descrito por primera vez en Nueva York (EE.UU.), como una gastroenteritis acompañada de diarrea suave, úlceras en mucosa oral y nasal, y abortos en hembras gestantes (Olafson y col., 1946). Años más tarde se describió la Enfermedad Mucosa (EM) en ganado de carne y leche de diferentes edades en Iowa y otros estados de EE.UU., donde también se observaron lesiones ulcerativas a nivel de mucosas y diarrea (Ramsey y Chivers, 1953). Ambos cuadros se deben al mismo agente, el virus Diarrea Viral Bovina (VDVB), perteneciente al género Pestivirus de la familia Flaviviridae (Becher et al., 1997).

2.2. ETIOLOGÍA Y ESTRUCTURA DEL VIRUS.

El VDVB es de forma esférica de 40 - 60 nanómetros (nm) de diámetro, constituido por una cápside icosaédrica de 25 a 37 nm. de diámetro, de naturaleza proteica y una envoltura externa. (Kobrak y Weber, 1997; San Juan et al, 1999).

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es un miembro del género pestivirus de la familia Flaviviridae, junto con los virus de la peste porcina clásica y la enfermedad de las fronteras en las ovejas (Murphy et al., 1995). El genoma del VDVB es un RNA de polaridad positiva de 12.5 Kb, posee sólo un marco abierto de lectura (ORF) y en cada uno de sus extremos presenta regiones sin traducir o UTR (Untranslated región).

El extremo 5' UTR presenta una secuencia de nucleótidos que imita la estructura CAP, de los mRNAs con función de sitio de entrada ribosomal interno (IRES) que media la transducción de la poli proteína viral.

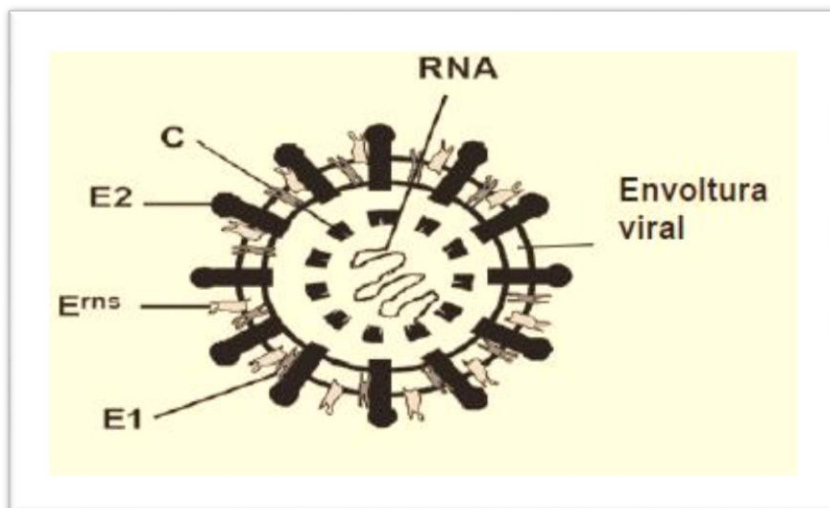


Figura 1. Representación esquemática del virus de DVB.

La información genética del virus de la DVB, está contenida en una molécula de ARN de simple cadena de polaridad positiva, el genoma está constituido de 12.0 a 12.5 kilobases (Paton,1995; Potgieter, 1995; Neill y Ridpath, 2001).

El primer evento de la biosíntesis del virus es la traducción del código genético en una poliproteína que es cortada durante y post traducción de la misma para dar lugar a las diferentes proteínas estructurales y no estructurales del virus (Neill y Ridpath, 2000).

Las proteínas estructurales son codificadas por el primer tercio cerca al 5', y las proteínas no estructurales son codificadas por los dos tercios posteriores del 3', con excepción de la proteína P20/Npro la cual es codificada por el primer tercio del genoma viral. (Neill y Ridpath, 2000; Potgieter, 1995).

Entre las principales proteínas estructurales y no estructurales que constituyen la partícula viral se tiene:

P20/N, responsable de la proteólisis de la poliproteína producto de la traducción del genoma.

E0/gp48, es una glicoproteína asociada a la envoltura viral, responsable en parte de la inducción de los anticuerpos neutralizantes (Paton, 1995), y cumple una función de una ARNasa y es secretada al espacio extracelular por exocitosis durante la replicación viral.

P14/C, es la proteína más abundante y constituye la cápside viral y antígeno del grupo viral. Su función es empaquetar el ARN genómico y proporcionar las interacciones necesarias para la formación de la envoltura del virión.

E2/gp53, es la glicoproteína más importante del virión y antígeno del serotipo. Esta glicoproteína contiene los epítomos que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes luego de una infección o vacunación. Contiene una región hipervariable y altamente mutable. Es el sitio donde ocurren las mutaciones y cambios antigénicos que dan lugar a la aparición de cepas variantes del VDVB (Bruschke et al, 1997).

P125/ NS23. Es una proteína no estructural indispensable para la multiplicación del virus; es la más conservada en todos los pestivirus. Los animales infectados o vacunados con virus modificado desarrolla una fuerte respuesta humoral contra esta proteína responsable de las reacciones cruzadas con los VCP y VEF (Potgieter, 1995).

P80/NS3, esta proteína surge a partir de la p125 determina el fenotipo del VDVB, tiene actividad de licasa en el extremo de carbono terminal y de proteasa

en el extremo amino terminal. Está presente únicamente en el biotipo citopatogénico del virus (Paton, 1995.)

2.3. VARIABILIDAD.

La principal característica de este virus es su variabilidad genética y antigénica. La característica principal de un virus ARN es su plasticidad y ésta se debe a la falta de una exonucleasa eficiente para corregir las bases mal incorporadas, ocasionando una sustitución de base de alta frecuencia (1 error por cada 10.000 nucleótidos polimerizados). El VDVB usa esta estrategia para sobrevivir, originando cepas mutantes que escapan a la respuesta inmunológica del hospedador. El cruce de especies crea otra oportunidad para la diversificación, ya sea por adaptación al nuevo hospedador o por evolución divergente. Sin embargo, el virus DVB aislado de cerdos y ovejas tienen características biológicas y antigénicas similares a los aislados del bovino.

Otra posible causa para la variabilidad es la oportunidad para la mutación que ofrecen los prolongados períodos de replicación en animales persistentemente infectados. Sin embargo, esta última posibilidad no parece suceder con el VDVB, demostraron que nuevas variantes antigénicas se originan durante el pasaje del virus en bovinos susceptibles que desarrollan una infección aguda. Esto sugiere que, mientras los animales persistentemente infectados son más importantes como reservorios, los animales con infección aguda pueden ser más importantes para la generación de nuevas variantes antigénicas. Las consecuencias de esta diversidad se reflejan en el espectro de manifestaciones clínicas y lesiones, dificultando además, su diagnóstico y limitando el espectro de protección brindada por el empleo de vacunas monovalentes Bolin y Ridpath (1992).

2.3.1. Biotipos.

El VDVB, presenta dos biotipos diferenciados por sus efectos en cultivo celular: biotipo citopatogénico (CP) y biotipo no citopatogénico (NCP) (Vanroose et al, 1998; Paton, 1995), el biotipo citopatogénico, causa vacuolización y muerte celular in vitro. Ambos biotipos producen la misma enfermedad con toda la gama del síndrome de la DVB (Vanroose et al, 1998).

El biotipo citopatogénico surge a partir del biotipo no citopatogénico del VDVB, esta diferenciación se da por el procesamiento de la proteína NS23 o p125 presente en el biotipo NCP; el biotipo CP posee además de la proteína p125, la proteína p80, la cual le confiere el fenotipo citopatogénico al virus. Análisis de secuenciamiento del genoma muestran que el biotipo CP, puede ser generado por una división proteolítica de un alterado NS23 (Collect et al, 1988), duplicación genética de NS3 (Meyers et al, 1992), delección genética de la NS2 (Tautz et al, 1994), o simple punto de mutación (Kummerer y Meyers, 2000; Vilcek et al, 2000).

En algunos casos incluyen reacomodo genético o recombinaciones con secuencias de ARN celular (Meyers et al, 1992). La mayoría de estos cambios genéticos ocurren en dos posiciones llamadas A y B del genoma (Meyers et al, 1998), la posición A esta localizado en la secuencia de ARN que codifica el aminoácido 1535, y la posición B se localiza en la secuencia que codifica el aminoácido 1589 de la proteína viral ambos dentro de la región NS2/3 (Neill y Ridpath, 2000).

Reciente información en los eventos de recombinación en el virus citopatogénico de genotipo VDVBII muestran que la mayoría de eventos ocurren primariamente con una transcripción celular simple, y esta recombinación ocurre en la posición A. (Neill y Ridpath, 2000).

El origen del virus CP, a partir del virus NCP del VDVB, explica el gran nivel de similitud antigénica encontrado entre estos dos biotipos del VDVB (CP/NCP); además, del origen espontáneo de la enfermedad de las mucosas ante la presencia de ambos biotipos en el mismo animal (Paton, 1995). El biotipo NCP del VDVB, es aislado comúnmente de animales con infección aguda y están presentes invariablemente en animales persistentemente infectados (PI) (Paton, 1995).

2.3.2. Genotipos.

A través de estudios de secuenciación genética el VDVB ha sido subdividido en dos genotipos, el tipo I y II (Pellerin et al, 1994.).

Las diferencias entre el genoma de ambos genotipos se encuentran en tres zonas hipervariables; dos de las cuales se encuentran en la gp53/E2 (Kobrak y Weber,1997).

En últimos estudios realizados, analizando la región 5' del genoma por RT-PCR, dentro del genotipo I se han diferenciado tres subgenotipos distintos denominados Ia, Ib y Ic (San Juan et al, 1999).

El genotipo I incluye las cepas de laboratorio y las vacunales: NADL, SINGER, NY-1, C virus, TGAN y Osloss.

El genotipo II está compuesta por las nuevas cepas asociadas con una alta mortalidad, trombocitopenia y hemorragias en USA y Canadá; cepas aisladas de animales con infección persistente nacidas de vacas vacunadas y cepas aisladas de suero fetal como: NY-93, 890, AZSPLN, MS-1, SY-89 y V/FLL (Ridpath et al, 2000).

2.4. EPIDEMIOLOGIA.

Las primeras enfermedades producidas por pestivirus, fueron identificadas como enfermedad de las mucosas y diarrea viral bovina (DVB), ambas causadas por el VDVB; el cual también pueden causar enfermedad en otros rumiantes y en cerdos. El VDVB tiene una distribución mundial y es responsable de un síndrome que va desde muy benignos a severos, e incluyen la potenciación de otras infecciones, fallas reproductivas (Polak y Zmudzinski, 1999), defectos congénitos, animales PI, infecciones agudas, y una generalmente fatal enfermedad de las mucosas (Njaa et al, 2000; Paton, 1995; Baker, 1987).

2.4.1. Fuentes de la Infección.

Los animales PI, juegan un rol importante como la fuente principal de diseminación del VDVB, y por ende de la infección (Njaa et al, 2000; Polak y Zmudzinski, 1999). Los animales PI eliminan grandes cantidades de virus durante toda su vida a través de secreciones y excreciones tales como descarga nasal, saliva, semen, orina, heces, lágrimas y leche (Brock et al, 1991; Houe, 1995; Sandvik, 1999); siendo la prevalencia de los animales PI es de 0.5 - 2.0% (Polak y Zmudzinski, 1999; Houe, 1995).

Los animales con infección aguda, representan también una fuente importante de diseminación viral durante la infección, el virus es usualmente excretado a partir del día 4 al día 10; aunque el virus puede ser excretado durante un periodo mayor (Brownlie et al, 1991). Si bien, los animales con infección aguda también eliminan virus por secreciones y excreciones, la cantidad del virus es mucho menor en relación a los animales PI. (Houe, 1995; Kirkland et al, 1992).

El virus también ha sido aislado de otros rumiantes incluyendo ovinos, caprinos, y algunos de vida silvestre o en cautiverio; siendo estas especies, consideradas fuente potencial de transmisión del virus (Houe, 1995).

2.4.2. Métodos de Transmisión.

Los métodos de transmisión pueden ser vertical y horizontal; siendo la transmisión vertical la que se da de una generación a la siguiente, pudiéndose esta aplicarse para los animales PI. Sin embargo, en muchos casos, la transmisión vertical es precedida por una transmisión horizontal a la madre, y durante esta infección aguda de la madre atraviesa la placenta e infecta al feto (Houe, 1995).

2.4.3. Transmisión Vertical.

La transmisión vertical ocurre de una generación a otra. Se incluye la transmisión al feto a través del semen infectado de toros con infección aguda o persistentemente infectados (PI). Las hembras seronegativas pueden ser inseminadas con semen infectado pudiendo infectarse, sin embargo, la producción de fetos PI raramente ocurre por esta ruta; en caso de ocurrir la producción de una cría PI, entonces es una transmisión vertical, aunque como ya se menciona va precedida de una transmisión horizontal.

A pesar de la alta mortalidad entre los terneros PI (Houe,1993), algunos pueden llegar a adultos y reproducirse, entonces los terneros de madres PI son también PI, por lo tanto, se forman líneas familiares de animales PI y puede ocurrir en varias generaciones (Houe, 1991). Además, puede ocurrir transmisión vertical después de la transferencia de embriones, si la receptora es PI, si la hembra donante es PI. El VDVB está presente en niveles altos en el medio uterino, por ello antes se puede dar una transmisión horizontal de madre a madre a través de los procedimientos del lavado (Houe)

2.4.4. Transmisión Horizontal.

La transmisión horizontal puede ser directa o indirecta. La transmisión directa, ocurre por contacto entre animales susceptibles y animales persistentemente infectados (PI), siendo esta la vía más importante de transmisión de la infección; presumiblemente, la más eficiente es el contacto de nariz a nariz, existe además la posibilidad de transmisión por el aire siendo a poca distancia, aunque esto no está probado experimentalmente (Travén et al, 1991).

Al igual que en la transmisión vertical, la principal fuente de infección son los animales persistentemente infectados (PI), aunque también está probado la capacidad de transmitir el VDVB a partir de animales con infección aguda. El semen es una fuente importante de transmisión horizontal para las vacas, esto está asociado con la eliminación del virus a través de este medio.

2.5. EPIDEMIOLOGÍA DE LOS ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS O PORTADORES DEL VDVB.

Los pestivirus son considerados como uno de los agentes virales más exitosos de la naturaleza por su habilidad de difundirse, causar enfermedad y aún persistir dentro de una población sin ser descubierto (Sandvick, 1999). En este sentido el virus es mantenido en la naturaleza principalmente a través de animales persistentemente infectados, es decir, un animal que fue infectado en algún momento antes de los 120 - 125 días de su desarrollo fetal, cuando su sistema inmune no es capaz de reconocer al virus como invasor convirtiéndose en inmunotolerante al virus infectante y persistentemente infectados(PI) por toda su vida (Brownlie et al, 1998).

La inmunotolerancia es a la cepa viral específica, es decir, estos animales no desarrollan anticuerpos neutralizantes contra el VDVB presente en el animal, sin embargo, son inmunocompetentes a otras cepas diferentes del VDVB u otros

agentes infecciosos. En estos animales el virus persiste en todos los tejidos, especialmente en las células del sistema inmune y tejidos inmunológicamente privilegiados como el sistema nervioso central (Sandvick, 1999).

El animal PI es considerado el reservorio o portador más importante del VDVB ya que elimina continuamente grandes cantidades del virus en sus secreciones y excreciones y son incapaces de responder formando anticuerpos o inmunidad mediada por células, por ser animales inmunotolerantes y probablemente también por el continuo daño funcional de las células del sistema inmune. Los animales inmunocompetentes infectados agudamente, también eliminan el virus por varios días o semanas pero, la cantidad de virus que eliminan es menor y finalmente el virus puede ser removido eficientemente del animal por los anticuerpos neutralizantes con la subsiguiente recuperación del animal (Houe, 1999).

2.6. PREVALENCIA DE LA DIARREA VIRAL BOVINA.

Estudios realizados en diferentes países demuestran que la prevalencia del VDVB, se encuentra dentro del 40 - 90% (Niskanen et al, 1991; Houe, 1995; Kirkland, 1994). En el Perú, Contreras, 1999, determinó una prevalencia de 72.4% de la DVB, en un estudio realizado en el valle del Mantaro.

En un estudio de 1593 bovinos de un total de 133 hatos en Inglaterra y Gales, se mostró que el 62.5% de animales presentaron anticuerpos neutralizantes contra el VDVB, la prevalencia entre regiones varían entre 43% y 79%. Otros estudios de UK mostró 1.8% de animales virémicos de entre 3151 animales y a la prevalencia de un total de 18759 muestras fue 64.9%.(Houe et al, 1995).

En Dinamarca con muestreo al azar, de un total de 1332 muestras colectadas en dos camales, se obtuvo 78% de animales positivos a anticuerpos y 0.9% de los animales fueron positivos al virus de la DVB. Así mismo en un total de 2750

muestras en 19 hatos lecheros, se obtuvieron 37 (1.4%) de animales virémicos; 28 (1.1%) animales PI y 64% fueron anticuerpo positivos (Houe, 1991).

En Suecia evaluaron un total de 711 vaquillonas seleccionadas para inseminación artificial (IA), mostrando 1.7% animales virémicos; 1.3% animales PI y 41% de animales positivos a anticuerpos.

En los Estados Unidos de América se evaluaron 3157 animales de 66 hatos, aproximadamente el 50% de los hatos tenían historia de infección por VDVB, mostrando 1.7% de animales PI, y 89% de animales positivos a anticuerpos. (Houe, 1995)

2.7. PATOGÉNESIS.

La transmisión horizontal del virus es en forma directa, por inhalación de saliva infectada, descarga óculo nasal, vaginal, orina, heces. La transmisión, también puede ocurrir a través de semen de toros infectados en forma aguda o toros PI (Vanroose et al, 1998; Baker, 1995). La transmisión vertical ocurre en cualquier etapa de la gestación; además la transmisión también es posible vía agujas hipodérmicas (Baker, 1987; Bitsch y Ronsholt, 1995).

Las primeras poblaciones celulares que soportan la replicación viral son las células epiteliales de la cavidad bucal, tonsilas y del tracto digestivo, células linfoides, como consecuencia el animal puede presentar múltiples expresiones clínicas como:

2.7.1. Infección Subclínica.

El 70 a 90% del ganado adulto susceptible puede presentar la DVB subclínico. El periodo de incubación es de 5 a 7 días aproximadamente luego de lo cual se presenta una ligera fiebre y leucopenia, que usualmente no es notado por el

veterinario o ganadero siendo esto seguido por una producción de anticuerpos neutralizantes (Baker, 1987). En general es raro que el VDVB cause enfermedad en animales inmunocompetentes; sin embargo, debido a su rol inmunosupresor el VDVB puede potenciar o favorecer el desarrollo de infecciones secundarias, sobre todo aquellas de tipo respiratorio como el complejo respiratorio bovino (Obando, 1999).

2.7.2. Infección Aguda.

La infección aguda en animales seronegativos e inmunocompetentes, puede dar un rango muy amplio de signos clínicos, estando relacionados con factores como cepa del virus, edad del animal, inmunidad y estado fisiológico del animal y, la presencia de otros agentes patógenos. La mayoría de las infecciones agudas están causadas por el biotipo NCP, generalmente ocurre en animales entre 6 meses y 2 años de edad (Baker, 1995). El periodo de incubación es de 5 - 7 días; seguido de fiebre transitoria y viremia por encima de los 15 días.

Luego del ingreso del virus se replica en las células epiteliales de la mucosa oronasal y tonsilas, la progenie se disemina vía sanguínea y linfática, como virus libre o asociado a linfocitos y monocitos.

Además, clínicamente la enfermedad se caracteriza por: estomatitis erosiva aguda, gastroenteritis y diarrea, leve depresión, inapetencia, descarga oculonasal. Las infecciones agudas causan ovaritis y producen infertilidad temporal (Vanroose et al, 1998).

Los hatos susceptibles experimentan diarrea con alta morbilidad, pero con baja o nula mortalidad; la producción lechera también se ve afectada. Generalmente, los anticuerpos neutralizantes son detectados en suero 3 a 4 semanas post infección y persisten probablemente por años. (Baker, 1987; Brusckhe et al, 1996; Vanroose et al, 1998)

2.7.3. Enfermedad de las Mucosas.

La enfermedad de las mucosas, es usualmente de curso fatal y está asociado con superinfección del animal PI con el biotipo NCP, por el biotipo CP del VDVB (Brownlie et al, 1998; Bolin et al, 1990; Paton, 1995), teniendo como condición, que el biotipo superinfectante CP debe ser antigénicamente homólogo al biotipo NCP presente en el animal. (Vanroose et al, 1998; Paton 1995). Estos animales desarrollan profusa diarrea, una rápida pérdida de condición corporal, erosiones a nivel del tracto gastrointestinal, y muerte (Tautz et al, 1994; Bolin et al, 1995a).

2.7.4. Síndrome Hemorrágico.

En USA y CANADA, se han reportado como severos, en estos casos se observa diarrea con sangre, epistaxis, congestión en conjuntiva y mucosas, hemorragias petequiales y equimóticas en mucosas, los animales muestran pirexia, leucopenia, linfopenia y neutropenia. Este síndrome ha sido asociado con infecciones por cepas NCP del genotipo II (Ridpath et al, 2000).

2.7.5. Complejo Respiratorio.

La infección con VDVB en animales inmunocompetentes y seronegativos tiene poca importancia; pero si como un agente inmunosupresor. El VDVB potencia a otras infecciones virales y bacterianas como: Parainfluenza tipo 3, Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Coronavirus, Rotavirus, Pasteurella spp., Salmonella spp., Coccidia, etc; produciendo un cuadro de enfermedad respiratoria severa denominado complejo respiratorio bovino, que es uno de los problemas causantes de grandes pérdidas económicas en el mundo. (Fulton et al, 2000).

2.7.6. Infección Persistente.

La infección persistente con el VDVB en el ganado bovino resulta de infecciones en útero. (Fredriksen et al, 1999; Sandvik, 1999). Las hembras gestantes PI usualmente producen crías PI; teniendo estas las siguientes características: terneros anormales, nacimientos prematuros, retardo en el crecimiento, y dificultad para la lactación. (Bock et al, 1997).

Algunos mueren dentro de los primeros 6 meses de vida, tal vez por el debilitamiento de la respuesta inmune contra la enfermedad. Sin embargo, algunos muestran salud y crecimiento normal. Los animales PI resultan en una inmunotolerancia a los antígenos del virus de la DVB, resultando de esto evidencias de la interacción sinérgica del VDVB con otros agentes patógenos (Bock et al, 1997).

2.7.7. Infección Venérea.

Los toros infectados en forma aguda o PI, producen semen infectado con el VDVB, como consecuencia de la replicación del virus en la vesícula seminal y glándula prostática, el cual sirve como medio para la transmisión del virus a vacas susceptibles (Kirkland et al, 1997).

La calidad del semen infectado por el VDVB, es caracterizado por el decrecimiento de la motilidad, incremento del porcentaje de anomalías morfológicas de las células espermáticas. (Kirkland et al, 1994; Baker, 1987).

2.7.8. Virus de la Diarrea Viral Bovina en Terneros Recién Nacidos.

El VDVB, raramente causa enfermedad en animales menores de 6 meses de edad. Los terneros recién nacidos infectados con VDVB pueden padecer de severas enteritis que son ocasionalmente de curso fatal (Ames y Baker, 1990).

Experimentalmente se ha demostrado que en terneros que tomaron tarde el calostro, la infección que resulto fue una enfermedad clínica benigna con rápido restablecimiento.

2.7.9. Infecciones en Hembras Gestantes.

La infección transplacentaria con VDVB es muy frecuente, ya que el virus cruza la placenta con casi 100% de eficiencia. El resultado de la infección en el feto dependerá principalmente del periodo de gestación cuando ocurra la infección, y del biotipo de la cepa infectante. Los efectos pueden ser: muerte embrionaria fetal, aborto o momificación, malformación congénita, nacimientos de terneros débiles, nacimientos de terneros PI y nacimiento de terneros sanos (Baker, 1995; Hoening y Liess, 1995). Los terneros PI son el resultado de la infección del feto en un momento entre los 120 a 125 días de edad fetal con una cepa NCP. (Vanroose et al, 1998; Bock et al, 1997).

Los fetos bovinos son capaces de desarrollar una respuesta inmune contra el virus de la DVB a los 180 días de gestación; aunque, para algunos fetos ya es posible una respuesta con anticuerpos entre los 120 y 165 días de gestación. Dicha respuesta inmune en el feto se desarrolla luego de 20 a 30 días post infección. (Potgieter, 1995; Bruschke et al, 1996).

2.8. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS.

La respuesta inmune es dirigida contra todas las proteínas estructurales o no estructurales del virus (Donis et al, 1995). El VDVB induce ambos tipos de respuesta, tanto de células B como de células T (Larsson y Fossum, 1992).

Estudios realizados, indican un mayor rol de las células CD4+, pero no de las células CD8+, lo cual indica actividad restringida de las células T citotóxicas (Howard et al, 1992; Rhodes et al, 1999). Sin embargo un estudio realizado in

in vitro describe una respuesta virus específico de las células T CD4+ y CD8+ en animales seropositivos, lo que al parecer refuerza el concepto de que la respuesta antiviral de las células T comprenden células CD8+, capaces de actuar como efectoras contra células infectadas, y las células CD4+, que pueden proporcionar ayuda para la producción de anticuerpos neutralizantes capaces de limitar la diseminación del virus (Rhodes et al, 1999).

2.9. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico presuntivo de la DVB en un rebaño puede ser sospechado con base a la observación de animales con los síntomas clínicos descritos. Sin embargo, es necesario que se realice un diagnóstico definitivo, para lo cual deben realizarse exámenes de laboratorio a los animales enfermos.

2.9.1. ELISA Indirecto.

El test de ELISA es un método de diagnóstico muy versátil, y para la serología de DVB se ha vuelto muy popular por varias razones: es independiente de cultivos celulares, puede fácilmente ser aplicada como prueba screening y los resultados pueden ser leídos en pocas horas. La especificidad de este sistema es determinada por la elección del antígeno viral, que pueden ser partículas víricas purificadas, extractos de cultivos celulares inoculados con el virus, antígenos virales simples inmovilizados con anticuerpos monoclonales, ó proteínas virales recombinadas producidas en bacterias.

Las placas ELISA se preparan de la misma forma a la anterior. Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. Es el ensayo más popular, como lo es la inmunofluorescencia

indirecta, pues un mismo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permiten cuantificar una gran variedad de antígenos, por eso es un método más polivalente y barato, aunque se pierda algo de precisión por tener un eslabón más con respecto al método directo. La dilución de la solución que contiene el anticuerpo primario (por ejemplo: suero sanguíneo) es un factor muy importante a tener en cuenta para evitar la aparición de falsos negativos, ya que si la muestra está muy diluida no saldrá positiva si la titulación de anticuerpos es muy baja.

Es decir, aunque los anticuerpos están presentes, la prueba no da positivo porque la concentración de anticuerpos específicos contra el antígeno que está pegado en el fondo del pocillo no es suficiente como para dar una señal detectable.

Consta de las siguientes etapas:

- ✓ Fijación al soporte insoluble de antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
- ✓ Adición del suero problema, de tal forma que sus anticuerpos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- ✓ Adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- ✓ Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- ✓ Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

2.9.2. Pasos Generales de un ELISA.

- ✓ Tapizado del pocillo con el antígeno o anticuerpo.
- ✓ Adición de la muestra problema con la mezcla de antígenos o anticuerpos.
- ✓ Unión del antígeno o anticuerpo específico al anticuerpo o antígeno tapizado en el pocillo
- ✓ Lavado del pocillo para eliminar el exceso de antígeno o anticuerpo no unido
- ✓ Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima
- ✓ Unión del anticuerpo secundario al antígeno o anticuerpo
- ✓ Lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida
- ✓ Adición del sustrato
- ✓ Unión del sustrato a la enzima
- ✓ Desarrollo del color

2.9.3. Kit para la detección de anticuerpos frente al virus de la diarrea vírica bovina. (BVDV). IDEXX

El kit IDEXX BVDV Total Ab es un inmunoensayo enzimático indirecto necesario para detectar anticuerpos específicos de BVDV en muestras de suero y plasma. El ensayo consiste una técnica de ELISA indirecta donde se utilizan placas de micro titulación tapizadas con antígenos de BVDV.

Los anticuerpos frente al BVDV presentes a la muestra se unen al antígeno de la placa. El material no ligado se elimina mediante lavado. El complejo antígeno-anticuerpo se detecta mediante un conjugado peroxidasa de rábano, el resto de conjugado se elimina con el lavado de la placa y se añade una solución de sustrato/ cromógeno generando una coloración azul. Al añadir la solución de frenado se genera un color amarillo. La absorbancia se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda única de 450 nm [A (450)] o a una longitud de onda dual de 450nm y 650 nm [A (450/650)]. El cociente M/P de las

muestras se calcula usando la absorbancia [A (450)] o [(450/650)] de la muestra y un control positivo, corregidas en la absorbancia del control negativo.

El desarrollo de control indica la presencia de anticuerpos frente BVDV en la muestra (resultado positivo).

2.9.3.1. Reactivos.

Conserve todos los reactivos a 2-8 °C.

Reactivos.	Volumen
1. Placas tapizadas con antígeno BVDV.	5
2. Control positivo.	1.0 ml
3. Control negativo.	1.0ml
4. Diluyente de la muestra.	60ml
5. Diluyente de la muestra.	60ml
A Substrato TMB n.º12	60ml
B Solución de frenado n.º 13.	60ml
C Solución de lavado concentrado. (10x)	480ml.

Cuadro 1. Reactivos para la realización de la prueba de ELISA

2.9.3.2. Preparación de los reactivos.

2.9.3.2.1 Solución de lavado.

La solución de lavado concentrada (10x) debe alcanzar de 18-26°C y debe agitarse para asegurar la solución de posibles precipitados. La solución de lavado concentrada debe diluirse de 1 a 10 con agua destilada/ des ionizada antes de su uso (ejemplo 30 ml concentrado + 270 ml de agua por placa a analizar). Preparándose en condiciones estériles, la condición de lavado puede almacenarse durante una semana a 2-8°C.

2.9.3.2 Preparación de las muestras.

Pueden analizarse muestras frescas o congeladas de suero y plasma. Las muestras se deben centrifugarse durante 15 minutos a 2000 x g o deben mantenerse toda la noche a una temperatura de 2-8 ° C.

2.9.3.3. Protocolo de ensayo.

Todos los reactivos deben alcanzar a 18-26°C antes de usarse. Los reactivos deben mezclarse mediante un agitado o utilizando el vortex.

Muestras de suero o plasma.

- ✓ Tome las placas tapizadas y marque la posición de las muestras en una hoja de trabajo.
- ✓ Añada 100 µl de Diluyente de la muestra en cada pocillo. Una pipeta multicanal (8 a 12 canales) puede emplearse en este paso.
- ✓ Añada 25 µl de control negativo en los pocillos apropiados.
- ✓ Añada 25 µl de control positivo en los pocillos apropiados.
- ✓ Añada 25 µl de las muestras en los pocillos restantes. Use una punta de pipeta diferente para cada muestra. Continúe en el paso 6 de la selección protocolo de ensayo.
- ✓ Añada 100 µl de las muestras de leche sin diluir (tomadas por debajo de la capa de grasa) en los pocillos restantes. Continúe en el paso 6 de la selección protocolo del ensayo.

Procedimiento común para las muestras de suero y plasma.

- ✓ Mezcle el contenido de los pocillos golpeando levemente la placa o use un agitador de placas de micro titulación.
- ✓ Incube durante 90 minutos (+- 5 minutos) a 18-26°C o toda la noche (12-18 horas) a 2-8° C (en un refrigerador). En cualquier opción de incubación, las

placas deben ser firmemente selladas para evitar evaporizaciones o incubadas en una cámara húmeda.

- ✓ aspire los contenidos líquidos de los recipientes en un reservorio apropiado.
- ✓ Lave cada pocillo con aproximadamente 300 µl de solución e lavado 5 veces. aspire los contenidos líquidos de todos los pocillos después de cada lavado. Tras la aspiración final, elimine el fluido de lavado residual de cada placa golpeándola firmemente sobre material absorbente. Evite que las placas se sequen en los lavados y antes de añadir el reactivo siguiente.
- ✓ Disperse 100 µl de conjugado en cada pocillo.
- ✓ Incube durante 30 minutos (+- 2 minutos) a 18-26 °C.
- ✓ Repita los pasos 8 y 9.
- ✓ Dispense 100 µl del substrato TMB n° 12 en cada pocillo.
- ✓ Incube 10 minutos (+- minuto) a 18-26 °C en oscuridad. Comience a cronometrar después de llenar el primer pocillo.
- ✓ Disperse 100 µl de la solución de frenado n°3 en cada pocillo para frenar la reacción. Añada la solución de frenado en el mismo orden en que la solución de substrato fue añadida en el paso 13.
- ✓ calibre el espectrofotómetro con aire.
- ✓ mida y anote la absorbancia de las muestras y controles a 450 nm o usando una longitud de onda dual de 450 nm y 650 nm.
- ✓ Calcule los resultados.

2.10. Resultados.

Para que el ensayo sea válido, la diferencia (M-N) entre la media de control positivo (CPx) y la media del control negativo (CNx) debe ser mayor o igual a 0.150 de densidad óptica (DO). Además la media del control del negativo (CNx) debe ser menor o igual a 0.250 DO. Para los ensayos no válidos, debe sospecharse de la técnica y el ensayo debe repetirse siguiendo una revisión meticulosa del producto.

La presencia o ausencia de anticuerpos BVDV en la muestra se determina mediante el cociente M/P de cada muestra.

IDEXX tiene a disposición instrumentos y sistemas de software para el cálculo de valores medios y porcentajes, y la elaboración de resúmenes de datos.

2.11. Cálculos.

2.11.1. Cálculo de la media del control negativo.

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A 450 + CN2 A 450}{2}$$

2.11.2. Cálculo de la media del control positivo.

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A 450 + CP2 A 450}{2}$$

2.11.3. Cálculo del resultado de la muestra analizada.

$$M/P = \frac{\text{muestra A450} - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$$

Ejemplo:

$$CN\bar{x} = \frac{0.140 + 0.120}{2} = 0.130$$

$$CP\bar{x} = \frac{1.380 + 1.400}{2} = 1.390$$

$$\frac{M}{P} = \frac{1.075 - 0.130}{1.390 - 0.130} = 0.750.$$

2.11.4. Interpretación de los resultados.

Suero, plasma o muestras individuales de leche.

- ✓ Las muestras con valores de M/P menores de 0.20 son consideradas como negativas en anticuerpos frente a BVDV.

- ✓ Las muestras con valores de M/P mayores de 0.20 pero menores a 0.30 son consideradas como dudosas. El animal deberá analizarse de nuevo en pocas semanas.
- ✓ Las muestras cuyos valores de M/P de mayores o iguales a 0.30 son consideradas positivas en anticuerpos frente a BVDV

2.12. 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 Gonzanamá, para lo cual se determinó porcentajes apoyándose en cuadros y figuras para una mejor comprensión.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

Para el presente trabajo de investigación, se emplearon los siguientes materiales.

3.1.1. Materiales de Laboratorio.

- ✓ Lector Elisa
- ✓ Lavador de Elisa
- ✓ Incubador de Elisa.
- ✓ Centrífuga
- ✓ Pipeta automática multicanal de volumen ajustable
- ✓ Puntas de plástico desechables.
- ✓ Microtubos
- ✓ Vasos de precipitación de distintos volúmenes.
- ✓ Papel absorbente
- ✓ Probetas graduadas
- ✓ Timer
- ✓ Vacutainer

3.1.2. Materiales de Campo.

- ✓ Bovinos.
- ✓ Botas.
- ✓ Vestimenta.
- ✓ Desinfectante.
- ✓ Brete.

- ✓ Guantes desechables.
- ✓ Cuaderno de apuntes

3.1.3. Muestras Biológicas.

- ✓ Sangre bovina.
- ✓ Kit para DVB

3.1.4. Materiales de Oficina.

- ✓ Computador.
- ✓ Impresora.
- ✓ Cámara de fotos.
- ✓ Libreta de apuntes.
- ✓ Fichas de recopilación de información.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Ubicación y Delimitación del Área de Estudio.

El presente trabajo de investigación se realizó en las fincas ganaderas del Cantón Gonzanamá. El mismo que se encuentra ubicado a 81 Km del cantón Loja, cuenta con una extensión de 712 Km²; limita al norte con Catamayo; Al sur con el catón Quilanga; al este con el cantón Catamayo y Loja; al oeste con el cantón Paltas y Calvas. Tiene una temperatura promedio de 18C⁰ y una altitud de 1980 m.s.n.m. Las parroquias que lo conforman son las siguientes: Gonzanamá, Nambacola, Changaimina, Sacapalca, Purunuma.



Figura 2. Representación gráfica de la zona de estudio

3.2.2. Duración del Ensayo.

La presente investigación en lo que se refiere al trabajo de campo se realizó en las ganaderías del cantón Gonzanamá, el mismo que tuvo una duración de 8 meses. A partir del 18 de Diciembre del 2014 hasta el 5 de Marzo del 2015.

3.2.3. Método de Muestreo.

Se recolectaron muestras en animales en diferentes estados reproductivos en las ganaderías del cantón.

3.2.4. Tamaño de la Muestra.

Se lo realizó mediante la fórmula para calcular proporción de una enfermedad; tomando en cuenta que la población para dicho estudio la cual fue 11151 bovinos según datos estadísticos de Agrocalidad en el 2012.

$$n = \frac{P \times Q \times N}{(N-1) \frac{E^2}{K^2}} + PQ$$

N = Tamaño de la muestra

P = Probabilidad que se cumpla (0,05)

Q = Probabilidad que no se cumpla (0,05)

E² = Constante (0,05 – 0,11)

K²= Constante (2)

N= Número de animales

$$n = \frac{0,25 (11151)}{(11151-1) \frac{(0,08)^2}{(2)^2}} + 0,25$$

$$n = \frac{2787,7}{(11151)(0,0016)} + 0,25$$

$$n = \frac{2787,7}{17,84} + 0,25$$

$$n = 157$$

De la población total de bovinos del cantón Gonzanamá se tomaron 157 muestras de las cinco parroquias del cantón y sus respectivos barrios, las que se identificaron de acuerdo a su ubicación geográfica.

Cuadro 2. Número de muestras a recolectar de cada sector.

Parroquia	Población Bovina Fracción De Muestreo	Nº De Muestras
Gonzanamá	3439/71	48
Nambacola	2460/71	35
Purunuma	2375/71	33
Changaimina	2404/71	34
Zacapalca	473/71	7
TOTAL		157

3.2.5. Recolección de Muestras de Sangre.

3.2.6. En el Campo.

3.2.6.1. Toma de la muestra.

Se tomaron las muestras de sangre de la vena coccígea (6-8 ml) luego de una previa desinfección del lugar de extracción.

3.2.6.2. Transporte de la muestra.

Cada muestra debidamente identificada se procedió a su transporte al laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad Nacional de Loja en una pequeña nevera a una temperatura de 4°C.

3.2.7. En el Laboratorio.

3.2.7.1. Manejo de la muestra.

Las muestras se centrifugaron a 2000 gravedades. durante 10 minutos para separar las células del plasma logrando obtención de suero.

3.2.7.2. Extracción del suero.

Una vez que se centrifugó la muestra se procedió a separar el suero del coágulo, el mismo que se extrae con suavidad de las paredes del tubo. El suero se aspiró fácilmente con pipeta y se colocó en los criovales. Los criovales utilizados fueron de una capacidad de 1.5 CC.

3.2.8. Corrido de la Prueba

Para realizar el corrido de la prueba se procedió a realizar lo siguiente.

3.2.8.1. Preparación de los reactivos.

3.2.8.1.1. Preparación de la solución de lavado.

La solución de lavado concentrada (10 μ X) se procede a la descongelación y se mantiene a temperatura ambiente hasta que alcance 18 a 26 °C y luego se agita

para asegurar la disolución de posibles precipitados. Se procede a diluir en una concentración de 1 a 10 con agua destilada antes de utilizar.

3.2.8.1.2. Preparación de la muestra.

Se retira las muestras de suero que se encuentran en congelación y se procede a descongelar a temperatura ambiente durante 4 horas.

3.2.8.1.3. Protocolos del ensayo.

Todos los reactivos y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente de 18 a 26°C antes de comenzar la prueba y se procedió agitarse con el vortex y se utilizó una punta de pipeta para cada muestra.

- ✓ Se coge las placas tapizadas y se marca la posición de las muestras en una de trabajo.
- ✓ Se añade 100µl de diluyente de muestra en cada pocillo. Una pipeta multicanal (12 canales)
- ✓ Se añadió 25 µl de control Negativo en los pocillos apropiados.
- ✓ Se añadió 25 µl de control Positivo en los pocillos apropiados.
- ✓ Se añade 25 µl de las muestras en los pocillos restantes. Se utiliza una punta de pipeta para cada muestra.
- ✓ Se mezcla el contenido de los pocillos para lo cual se utilizó el agitador de placas de micro titulación.
- ✓ Se incuba durante 90 minutos a una temperatura de 24°C. Durante el proceso de incubación se procedió a cubrir las placas con papel aluminio para evitar evaporaciones.
- ✓ Se aspira el contenido de líquidos de los pocillos mediante el lavador de placas.
- ✓ Se lava cada pocillo con 300 µl de solución de lavado durante 5 veces. Se aspira el contenido de los pocillos después de cada lavado. Tras al

aspiración final se procede a eliminar los residuos de líquidos golpeando la placa firmemente sobre material absorbente.

- ✓ Se añade 100 µl de conjugado en cada pocillo.
- ✓ Se incubó durante 30 minutos a 24°C
- ✓ Se repite el paso 8 y 9.
- ✓ Se añade 100 µl de sustrato TMB nº 12 en cada pocillo.
- ✓ Se incubó a 10 minutos a 24°C en oscuridad.
- ✓ Se añade 100 µl de solución de frenado nº3 en cada pocillo para frenar la reacción
- ✓ Se calibra el espectrofotómetro.
- ✓ Se mide y se anota la absorbancia de las muestras.

3.2.9. Registro de Datos.

El registro de datos se lo realizó mediante registro de campo, aquí se tomó los registros de las zonas a investigar.

Pisos altitudinales los cuales se los ha dividido en cuatro grupo: 1400 a 1750 msnm, 1751 a 2100 msnm, 2101 a 2450 msnm, 2451 a 2800 msnm

Razas en las que se tomaron registro de bovinos tipo Holstein, Brownsuis, Mestizos, Brahaman.

En el sistema de manejo se tomara en cuenta el sistema intensivo, extensivo

La bioseguridad; y el tipo de reproducción que fue por Inseminación Artificial o monta natural

3.3. VARIABLES.

- ✓ Prevalencia de acuerdo a la Zona.
- ✓ Prevalencia de acuerdo a los Pisos Altitudinales.
- ✓ Prevalencia de acuerdo al número de Partos.
- ✓ Prevalencia de acuerdo a la Raza.

- ✓ Prevalencia de acuerdo al Sistema de Manejo.
- ✓ Prevalencia de acuerdo a la aplicación de normas de Bioseguridad.
- ✓ Prevalencia de acuerdo a los métodos de Reproducción.
- ✓ Se analizaron la relación entre los signos clínicos de la DVB.

4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos mediante la prueba de ELISA con el cual se realizó el estudio sobre la prevalencia de diarrea viral bovina (DVB) en las ganaderías del Cantón Gonzanamá de acuerdo a cada variable de estudio se presenta en el siguiente orden.

4.1. PREVALENCIA DE DIAREA VIRAL BOVINA (DVB) EN LAS GANADERIAS DEL CANTON GONZANAMÁ

Para determinar la prevalencia total se consideró la población total con la que se realizó la investigación tomando en cuenta los casos positivos y negativos y se presenta en el siguiente cuadro.

Cuadro 3. Prevalencia de diarrea viral bovina (DVB) en las ganaderías del Cantón Gonzanamá.

Nº de Animales	%	Negativos		Positivos	
		Nº	%	Nº	%
157	100	121	77.1	36	22.9

El cuadro 3 nos indica el número total de animales en estudio, dando un total de 121 animales negativos y 36 animales positivos a la enfermedad, con un porcentaje del 22.9% de prevalencia de diarrea viral bovina (DVB).

En la gráfica siguiente se muestra el número total de casos positivos y negativos con su respectivo porcentaje.

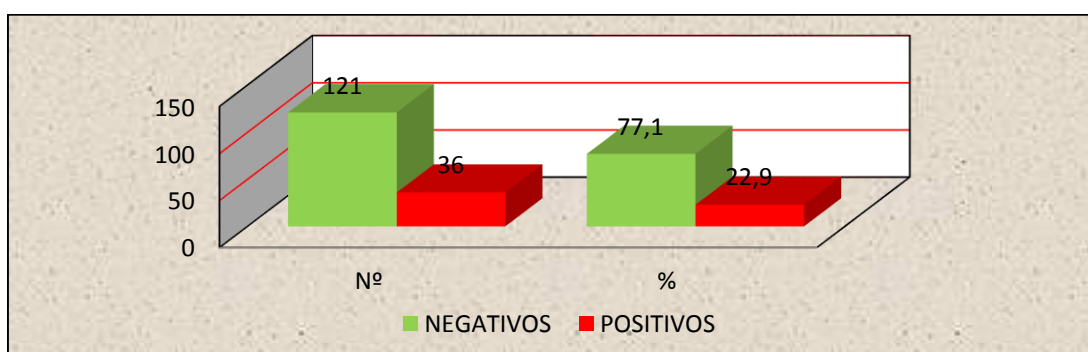


Figura 3. Prevalencia de diarrea viral bovina en las ganaderías del Cantón Gonzanamá.

4.2. PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA DE ACUERDO LA ZONA.

Se consideró las parroquias del cantón Gonzanamá, las cuales representamos en el siguiente cuadro en el que consta el número de muestras recolectadas, número de muestras positivas y muestras negativas con sus respectivos porcentajes.

Cuadro 4. Prevalencia de diarrea viral bovina de Acuerdo la Zona.

Parroquia.	Nº	%	Negativos		Positivos	
			N	%	Nº	%
Changaimina	34	21.5	28	17.8	6	3.8
Gonzanamá	48	30.6	31	19.7	17	10.8
Nambacola	35	22.4	26	16.6	9	5.7
Purunuma	33	21.	29	18.5	4	2.6
Sacapalca	7	4.5	7	4.5	0	0
TOTAL	157	100	121	77.1	36	22.9

El cuadro 4 se presenta la distribución de los casos positivos y negativos de las parroquias del Cantón Gonzanamá, obteniendo como resultado 36 casos positivos; en la parroquia de Gonzanamá presenta el porcentaje más alto con una prevalencia del 10.8%, seguida de la parroquia de Nambacola con el 5.7 %; la parroquia Changaimina con el 3.8 %; la parroquia de Purunuma 2.6%; y en la parroquia Sacapalca no se encontró ningún caso positivo.

En la gráfica siguiente nos muestra el número de casos positivos por parroquias con su respectivo porcentaje.

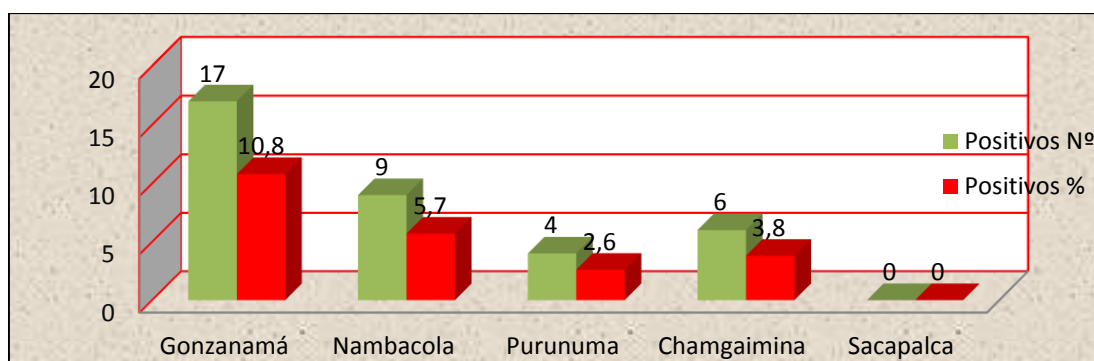


Figura 4. Prevalencia de diarrea viral bovina (DVB) de acuerdo la Zona.

4.3. PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA DE ACUERDO A LOS PISOS ALTITUDINALES

Se consideró los pisos altitudinales de acuerdo a las zonas de estudio, agrupándolos de la siguiente forma de 1400 a 1750, 1751 a 2100, 2101 a 2450, 2451 a 2800 m.s.n.m.

Cuadro 5. Prevalencia de diarrea viral bovina acuerdo a los Pisos Altitudinales.

Pisos Altitudinales	Nº de animales	%	Negativas		Positivos	
			Nº	%	Nº	%
1400 a 1750 m.s.n.m	21	13.4	19	12.1	2	1.3
1751 a 2100 m.s.n.m	72	45.8	51	32.5	21	13.4
2101 a 2450 m.s.n.m	41	26.1	32	20.4	9	5.7
2451 a 2800 m.s.n.m	23	14.6	19	12.1	4	2.5
TOTAL	157	100	121	77.1	36	22.9

En el cuadro 5 nos indica la prevalencia de acuerdo a los pisos altitudinales; en donde el mayor porcentaje de positividad se registra de 1751 a 2100 m.s.n.m. con el 13.4%; de 2101 a 2450 presentó el 5.7 %; de 2451 a 2800 el 2.5% de positividad, y de 1400 a 1750 m.s.n.m. donde presentó el 1,3% de casos positivos.

En la siguiente gráfica se muestra los resultados de acuerdo a los pisos altitudinales con los respectivos casos positivos y sus porcentajes.

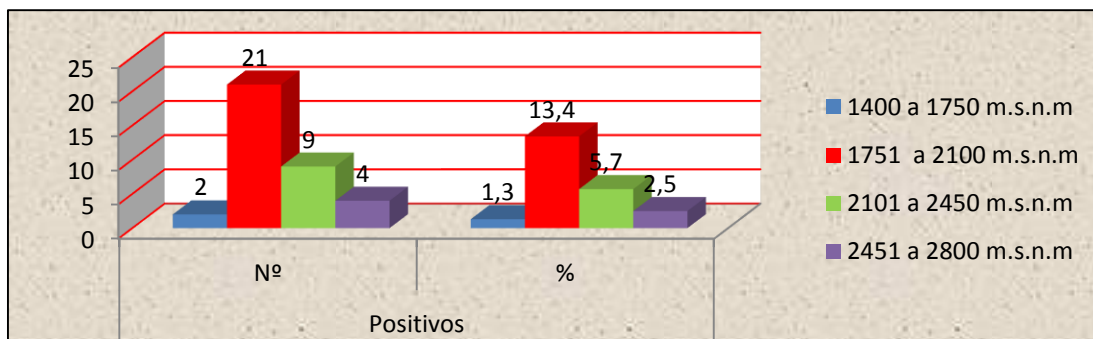


Figura 5. Prevalencia de diarrea viral bovina acuerdo a los Pisos Altitudinales

4.4. PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA DE ACUERDO AL NÚMERO DE PARTOS.

Se consideró el número de partos para lo cual se agrupó de la siguiente forma: de 1 a 2 partos, de 3 a 4 partos y de 4 a 6 partos.

En el siguiente cuadro se muestra en número de casos positivos y negativos con sus respectivos porcentajes. Para obtener dichos resultados no se tomó en consideración los bovinos machos.

Cuadro 6. Prevalencia de diarrea viral bovina (VDVB) acuerdo al número de partos.

Nº DE PARTOS	Nº de animales	%	Negativos		Positivos	
			N	%	Nº	%
1 a 2	33	21.01	19	14.6	9	5.7
3 a 4	86	54.8	69	43.9	22	14
5 a 6	26	16.6	23	12.1	3	1.9
TOTAL	145	92.4	111	70.6	34	21.6

En el cuadro 6 nos indica la prevalencia de acuerdo al número de partos, en donde en mayor porcentaje de casos positivos se presentó en vacas de 3 a 4 partos con el 14 %; las vacas con 1 a 2 partos presentaron el 5.7 % y el menor porcentaje se presentó en vacas de 5 a 6 partos con el 1.9 % de positividad.

En la siguiente grafica nos indica el número de casos positivos con su respectivo porcentaje.

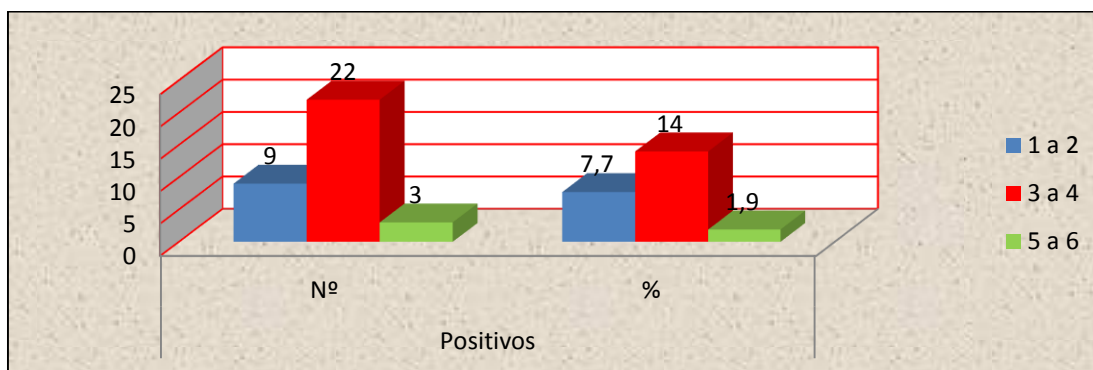


Figura 6. Prevalencia de diarrea viral bovina acuerdo al número de partos.

4.5. PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA ACUERDO A LA RAZA

Se registraron los bovinos Holstein, Browsuis, Brahaman y los Mestizos.

En el siguiente cuadro se muestra los casos negativos y positivos con su respectivo porcentaje.

Cuadro 7. Prevalencia de diarrea viral bovina (VDVB) acuerdo a la Raza

BOVINOS	Nº de animales	%	Negativos		Positivos	
			Nº	%	Nº	%
BROWSUIS	19	12.1	16	10.2	3	1.9
HOLSTEIN	45	28.7	38	24.2	7	4.5
BRAHAMAN	12	7.6	12	7.6	0	0
MESTIZOS	81	51.6	55	35.1	26	16.5
TOTAL	157	100	121	77.1	36	22.9

El cuadro 7 nos indica la prevalencia de acuerdo a la raza, obteniendo los siguientes resultados.

Los bovinos mestizos presentaron el porcentaje más alto 16.5 % de positividad; seguido de la raza Holstein con el 4.5%, la raza Browsuis presentó el 1.9 %, y en la raza Brahaman no se registró ningún caso positivo.

En la siguiente gráfica nos muestra los casos positivos y negativos de acuerdo a la Raza con su respectivo porcentaje.

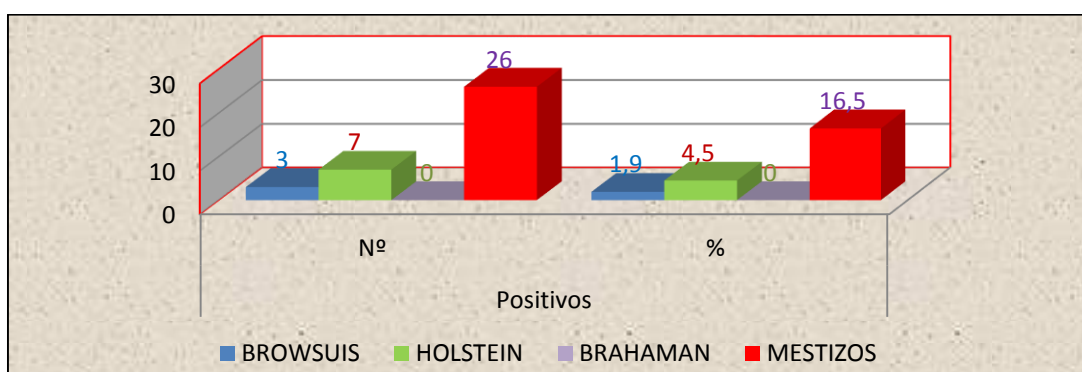


Figura 7. Prevalencia de diarrea viral bovina (DVB) acuerdo a la Raza.

4.6. PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA ACUERDO AL SISTEMA DE MANEJO.

El sistema de manejo que se lleva a cabo en cada ganadería en que se realizó dicho estudio se describe como extensivo e intensivo y lo detallamos en el siguiente cuadro.

Cuadro 8. Prevalencia de diarrea viral bovina (VDVB) acuerdo al Sistema de Manejo.

SISTEMA DE MANEJO	Nº DE MUESTRAS	%	Negativos		Positivos	
			Nº	%	Nº	%
EXTENSIVO	157	100	121	77.1	36	22.9
INTENSIVO	0	0	0	0	0	0
TOTAL	157	100	121	77.1	36	22.9

El cuadro 8 indica la prevalencia de acuerdo al sistema de manejo que se practica en el cantón Gonzanamá, en el que predomina el sistema extensivo con 22,9 % de casos positivos.

En la siguiente gráfica nos indica el número de casos positivos con su respectivo porcentaje.

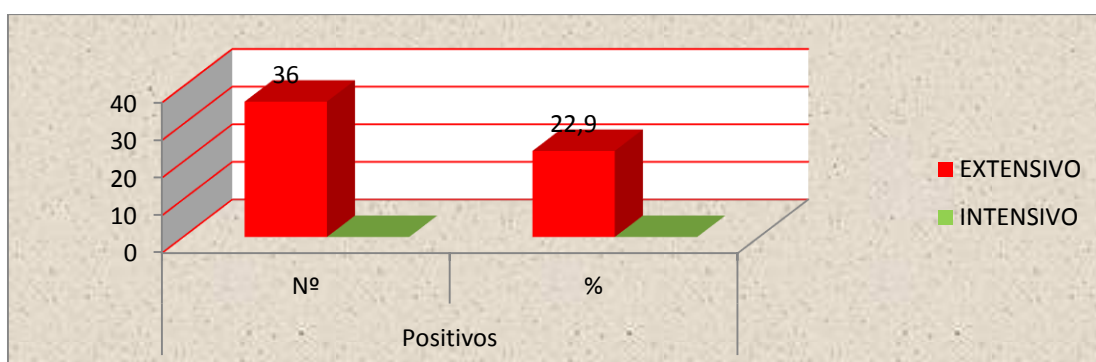


Figura 8. Prevalencia de diarrea viral bovina (DVB) acuerdo al Sistema de Manejo.

4.7. PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA DE ACUERDO A LA BIOSEGURIDAD.

Para determinar la prevalencia en las ganaderías se consideró aquellas que aplican normas de bioseguridad, las que no aplican y las que aplican ciertas normas. A continuación se detalla en el siguiente cuadro.

Cuadro 9. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo a la Bioseguridad.

BIOSEGURIDAD	Nº	%	Negativos		Positivos	
			Nº	%	Nº	%
SI	12	7.6	9	5.7	1	0.6
NO	125	79.6	95	60.6	33	21
EN PARTE	20	12.3	17	10.8	2	1.3
TOTAL	157	100	121	77.1	36	22.9

El cuadro 9 indica la prevalencia de acuerdo a la aplicación de normas de bioseguridad, en el cual nos muestra que la mayoría de ganaderos no aplican un

sistema de bioseguridad, el mismo que presenta la mayor cantidad de casos positivos con el 21%. En los hatos ganaderos que practican ciertas normas de bioseguridad se presentaron 2 casos positivos con una prevalencia del 1.3 %. En los hatos ganaderos que practican sistemas de bioseguridad se presentaron 1 casos positivos, con una prevalencia del 0,6%.

La grafica siguiente nos indica el número de casos positivos y negativos con su respectivo porcentaje.

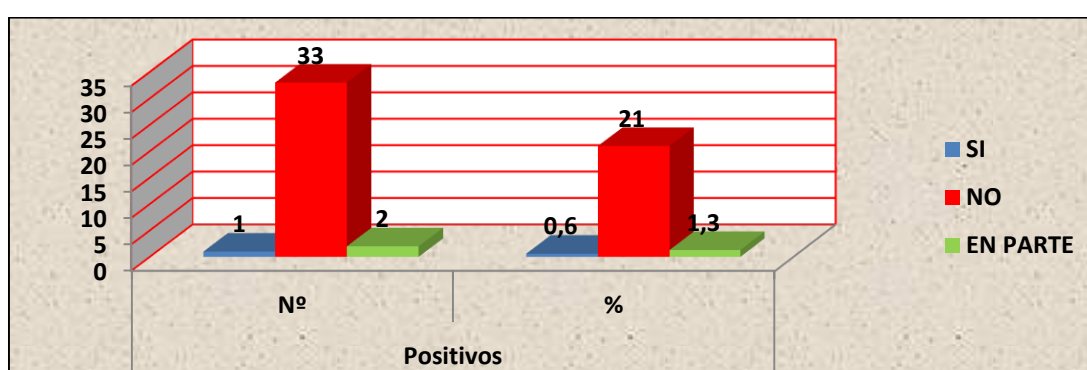


Figura 9. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo a la Bioseguridad.

4.8. PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA DE ACUERDO AL SEXO.

Se consideró a los bovinos hembras y machos. En el siguiente cuadro consta el número de muestras recolectadas, número de muestras positivas y muestras negativas con sus respectivos porcentajes.

Cuadro 10. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo al sexo.

Sexo	Nº	%	Negativos		Positivos	
			Nº	%	Nº	%
Hembras	145	92.3	111	70.7	34	21.6
Machos	12	7.6	10	6.4	2	1.3
TOTAL	157	100	121	77.1	36	22.9

El cuadro 10 muestra la prevalencia de acuerdo al sexo. El mayor porcentaje de casos positivos se presenta en las hembras con una prevalencia del 21%; y con un 1.3% en los machos.

En la siguiente representación gráfica se muestran de los casos positivos y negativos con su respectivo porcentaje.

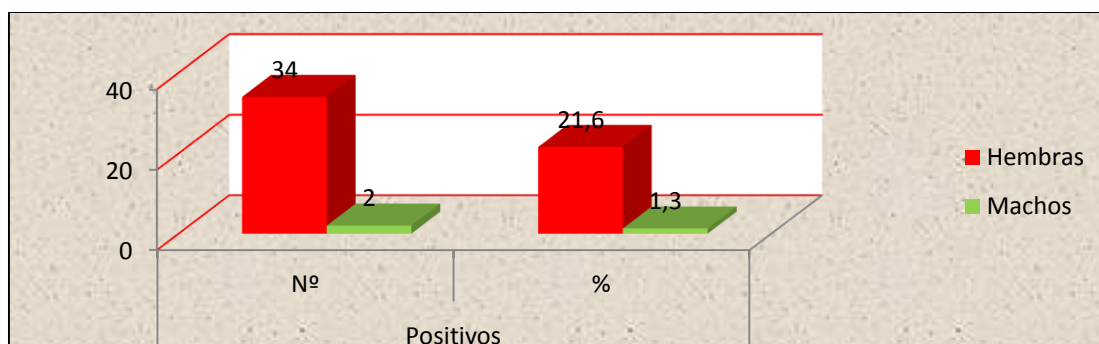


Figura 10. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo al sexo.

4.9. PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA DE ACUERDO A LOS MÉTODOS DE REPRODUCCIÓN.

Los métodos de reproducción aplicados en las ganaderías del cantón Gonzanamá, se representan en el siguiente cuadro con sus respectivos casos positivos y negativos.

Cuadro 11. Prevalencia de diarrea viral bovina de acuerdo a los métodos de reproducción

Métodos de reproducción	Nº	%	Negativos		Positivos	
			Nº	%	Nº	%
Monta natural	155	98.7	119	75.8	36	22.9
Inseminación artificial	2	1.3	2	1.3	0	0
TOTAL	157	100	121	77.1	36	22.9

En el cuadro 11 nos muestra los casos positivos y negativos de acuerdo al método de reproducción. En sistema de monta natural presenta una prevalencia del 22.9%; y en la inseminación artificial no se presentaron casos positivos con una prevalencia del 0%.

En la siguiente representación gráfica se muestran de los casos positivos y negativos con su respectivo porcentaje.

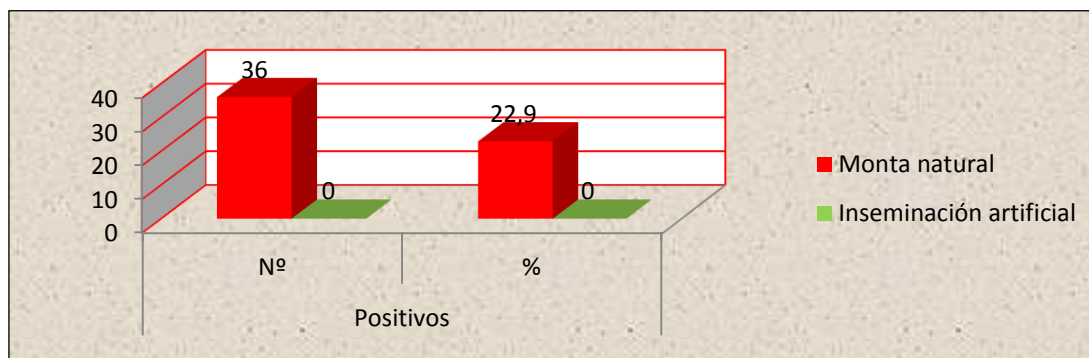


Figura 11. Prevalencia de diarrea viral bovina (DVB) de acuerdo a los métodos de reproducción.

4.10. PREVALENCIA DE DIARREA VIRAL BOVINA DE ACUERDO A LOS SIGNOS CLÍNICOS.

Para determinar la prevalencia de la diarrea viral bovina de acuerdo a los signos clínicos se tomó en cuenta los principales signos que cursa la enfermedad como: úlceras, secreción seromucosa, salivación, depresión, anorexia, tos, polipnea. En el siguiente cuadro los detallamos con sus respectivos valores y porcentajes.

Cuadro 12. Prevalencia de diarrea viral bovina (VDVB) de acuerdo a los signos clínicos

SIGNOS CLINICOS	Nº	%	Negativos		Positivos	
			Nº	%	Nº	%
Úlceras	25,0	15,9	22,0	14,0	3,0	1,9
Secreción seromucosas	6,0	3,8	6,0	3,8	0,0	0,0
Salivación	18,0	11,5	16,0	10,2	2,0	1,3
Depresión	12,0	7,6	11,0	7,0	1,0	0,6
Anorexia	14,0	8,9	11,0	7,0	3,0	1,9
Tos	19,0	12,1	17,0	10,8	2,0	1,3
Polipnea	9,0	5,7	9,0	5,7	0,0	0,0
Ninguno	54,0	34,4	26,0	18,3	25,0	15,1
Total	157,0	100	121,0	77,1	36,0	22,9

En el cuadro 12 indica que los animales que no presentaba ninguna sintomatología presento los valores más altos de positividad al virus de la diarrea viral bovina con el 15.9% seguido de los bovinos que presentaban úlceras con el 1.9% el resto de sintomatología se obtuvo un porcentaje menor al 1.3% de positividad.

En la siguiente representación gráfica se muestra los casos positivos con su respectivo porcentaje

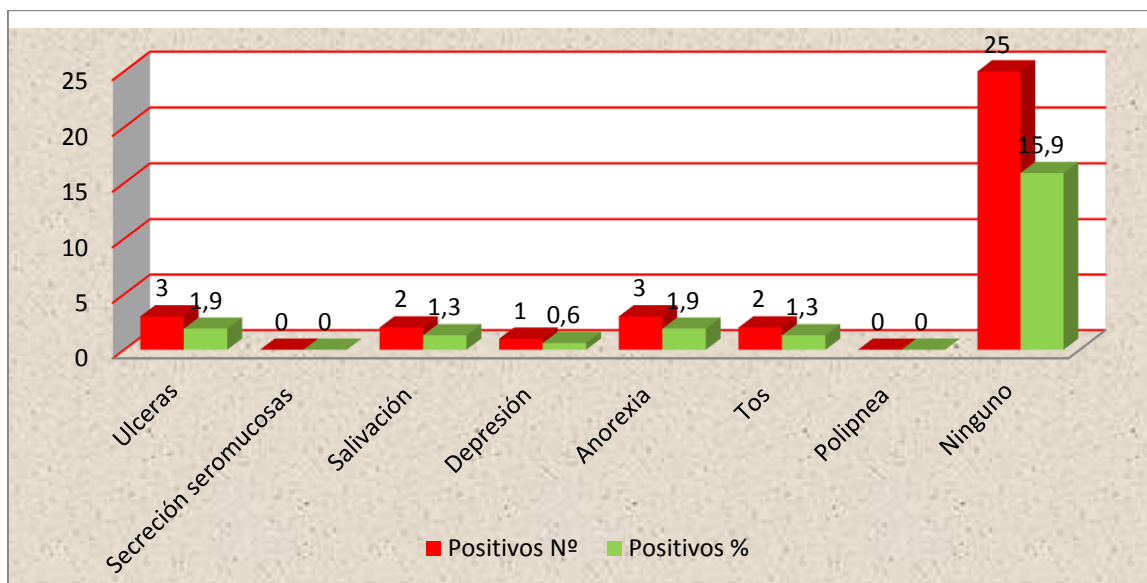


Figura 12. Prevalencia de diarrea viral bovina (DVB) de acuerdo a los signos clínicos

5. DISCUSIÓN

Los estudios realizados en esta investigación en el cantón Gonzanamá existe una seroprevalencia total de DVB del 22.9% en los hatos ganaderos, siendo la parroquia de Gonzanamá la que presentó el valor más alto de porcentaje del 10.8% seguida de la parroquia Nambacola con el 5.7%, estos resultados difieren en gran proporción por los realizados en la provincia de Loja por investigadores de UTPL (Jara Diego, Saa Luis, Fierro Natacha 2008) donde la prevalencia fue del 16,07%.

Sánchez (2014) reporta en su estudio realizado en las ganaderías del cantón Loja, señala que el mayor número de casos se encontró en las ganaderías situadas sobre los 1750 m.s.n.m, con el 37.93% de prevalencia; así mismo según la Revista El Agro(2013) indica que las ganaderías ubicadas sobre los 2000 m.s.n.m. tienen cierta tendencia a presentar esta enfermedad; datos que concuerdan con nuestro estudio, donde se obtuvo la prevalencia más alta con el 13,4% en las ganaderías ubicadas de 1751 a 2100 m.s.n.m.

Rivera et, al (2001) en su estudio destaca que los animales jóvenes son más susceptibles a contagiarse por el virus, así mismo investigaciones realizadas por Sánchez (2014) encontró que los animales jóvenes con el 10.34 % son más susceptibles a adquirir la enfermedad. En la presente investigación se determinó que en vacas de 3 a 4 partos presentaron una prevalencia del 14%, en comparación con las vacas de mayor número de partos que tienen menor tendencia al contagio por el virus.

Las granjas que no contaban con normas de bioseguridad presentaron mayor porcentaje de positividad de Diarrea Viral Bovina con el 21%, con ello se establece que en las ganaderías que practican normas de bioseguridad los índices de prevalencia son menor con el 0.6 % pero en ya que en caso de cuarentena podrían pasar animales portadores asintomáticos del virus como lo mencionan los estudios realizados por Njaa et, al (2000) y Polak y Zmudzinki (1999), ya que el animal podría pasar por desapercibido y llegando a contagiar al resto de animales del hato.

Aguilar (2006) determinó que los bovinos más susceptibles adquirir esta enfermedad son aquellos que se manejan de una forma extensiva; así mismo Sánchez (2014) obtuvo el 24,24 % de prevalencia en animales criados de forma extensiva. En el presente estudio se obtuvo el 22.9 % de casos positivo.

Grahn T, Fahning ML, Zenjanis R (1984) en sus estudios realizados mencionan que el mayor porcentaje de incidencia se presenta en el método por monta natural. Sánchez (2014) obtuvo una prevalencia del 93.10 % de casos positivos en bovinos que se utiliza la monta natural como método reproductivo. En nuestro trabajo se obtuvo 22.9 % de prevalencia lo cual concordamos con dichos estudios antes mencionados donde la mayoría de casos positivos se presentan en ganaderías que utilizan la monta natural.

El mayor porcentaje de los bovinos que resultaron positivos al virus de la diarrea viral bovina no presentaron sintomatología alguna, esto se debe a que en la mayoría de los casos la enfermedad se presenta de una forma subclínica donde los síntomas son imperceptibles; por lo que se concuerda con los estudios realizados por Baker donde menciona que el 70 a 90% del ganado adulto puede presentar la enfermedad de una forma subclínica.

6. CONCLUSIONES

Luego de haber realizado un análisis de los resultados podemos llegar a las siguientes conclusiones.

- ✓ Que en las ganaderías del cantón Gonzanamá la prevalencia de Diarrea Viral Bovina es alta con el 22.9%
- ✓ La mayor cantidad de casos positivos se presentaron en la parroquia de Gonzanamá con el 10.8%, seguido de la parroquia Nambacola con un 5.7%.
- ✓ Que mayor cantidad de casos positivos se registró entre 1751 a 2100 m.s.n.m. con una prevalencia del 13.4 %, y en menor cantidad de casos se registró a los 1400 a 1750 m.s.n.m. con una prevalencia del 1.3%.
- ✓ Las vacas de 3 a 4 partos presentaron la prevalencia más alta con el 14%, así mismo la prevalencia más baja se registró en vacas de 1 a 2 partos con 1.9 %.
- ✓ Que los bovinos mestizos presentaron el porcentaje más alto de positividad con el 16.5%, seguida de los a raza Holstein con el 4.5% y la raza Brownsuis con el 1.9%, así mismo en la raza Brahaman no se encontró ningún caso positivo.
- ✓ El sistema extensivo presentó la totalidad de casos positivos con el 22.9%, con respecto al el sistema intensivo que no presento ningún caso positivo.
- ✓ En las ganaderías que no se practica normas bioseguridad se presentó una prevalencia de 21%.

- ✓ Las bovinos hembras son más susceptibles al virus de la Diarrea Viral Bovina con un 21.6% de prevalencia y los machos con el 1.3%.

- ✓ Los hatos ganaderos en los que se practica la monta natural presentó una prevalencia del 22.9%, mientras que en los hatos que manejan sistemas de reproducción mediante la inseminación artificial no se registraron datos positivos.

- ✓ El 15.9 % de los animales positivos al virus de diarrea viral bovina no presentaron sintomatología aparente.

7. RECOMENDACIONES.

- ✓ Marcar y separar los bovinos sospechosos y descartar si son positivos o no con una prueba diagnóstica, si lo son eliminarlos por ser persistentemente infectados (PI).
- ✓ Evitar la difusión del virus a través del movimiento de animales, especialmente durante la época de empadre y en las ferias
- ✓ Realizar diagnósticos periódicos de la enfermedad.
- ✓ Evitar el ingreso de animales infectados (PI) o hembras seropositivas gestantes con riesgo de portar fetos PI.
- ✓ Realizar calendarios de vacunación en las zonas que se presentaron los casos positivos.
- ✓ Al momento de adquirir dosis seminales para la IA en las vacas hacerlo en casas comerciales donde garanticen que el toro reproductor haya pasado por rigurosos análisis de laboratorio con el fin de evitar el contagio de esta enfermedad por medio de esta vía.
- ✓ Utilizar la inseminación artificial como un método más eficaz de evitar el contagio de esta enfermedad por transmisión sexual
- ✓ Realizar más estudios de esta enfermedad en la provincia, con el propósito dar a conocer a los ganaderos en qué condiciones sanitarias se encuentran sus hatos ganaderos

8. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ AGUILAR R, BENITO A, RIVERA H. 2006. Seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en ganado lechero de crianza intensiva del valle de Lima. *RevInvVet Perú* 17(2):148–153.
- ✓ ALVAREZ, S.; H. RIVERA; D. PEZO; W. GARCÍA. 2002. Detección de anticuerpos contra pestivirus en rumiantes de una comunidad campesina de la provincia de Canchis, Cusco. *Rev. Inv. Vet, Perú* 13: 46-51
- ✓ AMES, T. Y J. BAKER. 1990. Management practices and vaccination program that help control BVD virus infection. In: *Symposium on BVD. Vet Med Oct*: 15-24.
- ✓ BAKER, J. 1987. Bovine Viral Diarrhea Virus: A Review. *JAVMA* 190 (11): 1449-1458.
- ✓ BAKER, J. 1995. The Clinical Manifestation of Bovine Viral Diarrhea infection. In *BVD virus. Vet Clin North Am Food Anim Practice* 11(3): 425-445.
- ✓ BECHER, P., G. MEYERS., A. SHANNON, H. THIEL. 1996. Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. *J Virol* 70, 2992 - 2998.
- ✓ BECHER, P., M. ORLICH, A. SHANNON, G. HORNER, M. KÖNIG AND H-J. THIEL. 1997. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.* 78(6): 1357–1366.
- ✓ BIELANSKI, A., K. LOEWEN, M. DEL CAMPO., M. SIRARD., J. WILLADSEN. 1993. Isolation of bovine herpesvirus - 1 (BHV-1) and bovine viral diarrhea virus (BVDV) in association with the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 40: 531-545.

- ✓ BITSCH, V. Y L. RONSHOLT. 1995. Control of bovine viral diarrhoea virus infection without vaccines. *Vet Clin North Am Food Animal Practice* 11(3):627-640.
- ✓ BOCK, R.E., B.J. RODWELL, Y M. MCGOWAN. 1997. Detection of calves persistently infected with bovine pestivirus in a sample of dairy calves in South-Eastern Queensland. *Aust Vet J* 75(9):656-659.
- ✓ BOLIN, S. 1990. The current understanding about pathogenesis and clinical forms of BVD. *Simposium on bovine viral diarrhoea. Vet Med* October: 2-8.
- ✓ BOLIN, S.R. Y J. RIDPATH. 1990. Range of neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Am J Vet Res* 51: 703-707.
- ✓ BOLIN, S.R., J. RIDPATH., J. BLACK. 1994. Survey of cell line in the American Tissue Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. *J Virol Methods* 48: 211.
- ✓ BOLIN, S.R. 1995A. The pathogenesis of Mucosal disease. In: *Bovine viral diarrhoea virus. Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 11(3):489-500.
- ✓ BOLIN, S.R. 1995B. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. *Vet Clin North Am Food Animal Practice* 11(3):615-625.
- ✓ BOLIN, S.R. Y J.F. RIDPATH. 1996. Glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus expressed in insect cells provides calves protected from systemic infection and disease. *Arch Virol* 141(8):1463-1477.
- ✓ BROCK, K.V., D. REDMAN, M. VICKERS., AND N. IRVINE. 1991. Quantification of bovine viral diarrhoea virus in Embryo Transfer Flush Fluids collected from a persistently infected heifer. *J Vet Diagn Invest* 3: 99-100.
- ✓ BROCK, K.V. 1995. Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet Clin. North. Am Food Anim Practice* 11: 549-561.
- ✓ BROWNLIE, J. 1991. The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch Virol* 3:79-96.

- ✓ BROWNLIE, J., D.A. BOOTH, M.E. STEVENS Y M.E. COLLINS. 1997. Expresion of non-cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in oocytes and follicles of persistently infected cattle. *Vet Record* 141:335-337.
- ✓ BROWNLIE, J., LB. HOOPER, I. THOMPSON Y M.E. COLLINS. 1998. Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) the bovine pestivirus. *Clin and Diag Virol* 10:141-150.
- ✓ BRUSCHKE, C.J.M., P. VAN RIJIN, R. MOORMAN AND J. VAN OIRSCHOT. 1996. Antigenically diferente pestivirus strains induce congenital infection in sheep: a model for bovine virus diarrhoea virus cacciine sfficacy studies. *Vet Microbiol* 50:33-43.
- ✓ CONTRERAS, H. 1999. Prevalencia del VDVB en bovinos del valle del Mantaro. Tesis bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima, 43p
- ✓ BRUSCHKE. 1997. Glycoprotein E of pestivirus induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J Virol* 71: 6692-6696.
- ✓ FULTON, R.W.,C.W. PURDY, A.W. CONFER, J.T. 2000 Bovine viral Dirrhea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interaction with pasteurella ssp., parainfluenza 3 virus, and bovina respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res* 64:151-159.
- ✓ HOUE, H. 1995. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol* 64:89-107
Kirkland, P.D., S. Mackintosh and Moyle, 1994. The outcome of widespread use of saemen from a bull persistently infected with pestivirus. *Vet Rec* 135: 527-529.
- ✓ HOUE H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64: 89–107.
- ✓ Houe H, 1995. Epidemiology of bovine Virus Diarrhea. *Vet Clin North Am Food Animal Practice* 11(3):521-16.
- ✓ KUMMERER, B. G. MEYER. VILCECK. S. 2000. Correlation between point mutation in NS2 and viability and citoapathogenicity of bovine viral biarroea

- virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. *J Virol* 74:390-400.
- ✓ KOBRAK, A Y E.L. WEBER. 1997. Bovine diarrhea virus: an update. *Rev Argent Microbiol* 29(1):47-61.
 - ✓ KIRKLAND, P.D. Factors influencing the development of persistent infection of cattle with pestiviruses. *Proc. Symp. Pestiviruses Eur Soc Vet Virol* 2:117-121.
 - ✓ LARSSON B. AND C.FOSSUM. 1992. Bovine virus diarrhoea virus induces in vitro a proliferative response of peripheral blood mononuclear cell from cattle immunized by infection. *Vet Microbiol* 31:317-325.
 - ✓ NEILL, M RIDPATH J.F. 2000 Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 bvdv from North America *Vet Microbiol* 77: 145-155.
 - ✓ NETTLETON P AND ENTRICAN G. "Ruminant Pestiviruses: Review". *Br. Vet. J.*, vol. 151: 615-642 (1995).
 - ✓ MURPHY , F., FAUQUET; H. BISHOP; S. GHABRIALK; G. MARTELLI; M. MAYO; M. SUMMERS 1995. *Flaviviridae, Virus taxonomy*. Springer, New York, pp 415-427.
 - ✓ OBANDO RC, HIDALGO, M, MERZA M, MONTOYA A, KLINGEBORN B, MORENO-LÓPEZ J. 1999. Seroprevalence to bovine viral diarrhoea virus and other viruses 278.
 - ✓ OLAFSON P, MACCALLUM AD, FOX A. 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet* 36: 205-213.
 - ✓ PATON. 1995. Pestivirus Diversity. *J. Comp. Path.* 112: 215–236.
 - ✓ PELLERIN. C. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strain associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203:260-200.
 - ✓ PATON. 1995. Pestivirus Diversity. *J. Comp. Path.* 112: 215–236.

- ✓ POTGIETER. 1995. Immunology of bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am: Food Animal Practice* 11: 501-519.
- ✓ POLAK, M.P Y J.F. Z MUDZINSKI. 1999. Prevalence of bovine viral diarrhea virus infection in bulls in artificial insemination centers in Poland. *Vet microbial* 64:253-257.
- ✓ RAMSEY FK, CHIVERS WH. 1953. Mucosal disease of cattle. *North Am Vet* 34: 629-634.
- ✓ REVISTA EL AGRO. 2013. Diarrea vírica: Una enfermedad expandida en granjas ecuatorianas.

Extraído desde: <http://www.revistaelagro.com/2013/08/13/diarrea-virica-una-enfermedad-expandida-en-granjas-ecuatorianas/> Acceso: 2013-03-24
- ✓ RIDPATH, J.F., J.D. NEILL, M. FREY Y J.G. Landgraf. 2001. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 bvdv from North America. *Vet Microbiol.* 77:145-155
- ✓ RHODES S., J.M. COCKSEGE; R.A. COLLINS Y W.L. MORRISON 1999. Differential cytokine responses of CD4 AND CD8 T cell in response to bovine viral diarrhea virus in cattle. *J Gen Virol* 80:1673-1679.
- ✓ SANCHEZ 2014. Determinacion de Diarrea Viral Bovina en Las Ganaderias del Cantón Loja Por medio del método de ELISA indirecto.
- ✓ SAN JUAN 1999. Etiopatogenia de la diarrea vírica bovina: aspectos de interés. En E Yus y M.I San Juan Eds. *Diarrea virica Bovina*. Consejo General de Médicos Veterinarios de España 24:9-24.
- ✓ SANDVIK, T. 1999. Laboratory diagnostic investigation for bovine viral diarrhoea virus infection in cattle. *Vet Microbiol.* 64:123-134.
- ✓ TAUTZ N. THIEL; DUBOBI; G. MEYERS. 1994. Pathogenesis of mucosal disease a cytophagenic pestivirus generated by a internal deletion. *J. Virol* 68:3289.

- ✓ TRAVÉN N. 1991. Primary bovine viral diarrhoea virus infections in calves following direct contact with a persistently viraemic calf. *J Vet Med* 38:435-462.
- ✓ VANROOSE G. A DE KRUIF. 1998. Replication of Cytopathic and Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus in Zona- Free and Zona- Intact In vitro – Produced Bovine Embryos and The Effect on Embryo Quality. *Biology of Reproduction* 58: 857-866.

9. ANEXOS

Anexo 9.1.

TABLA DE RESULTADOS			
Cálculos	Calculo de la media de control negativo	Calculo de la media de control positivo	Calculo del resultado de la muestra analizada
MUESTRAS	$CNX=CN1 A450+CN2 A450/2$	$CPX=CP1 A450+CP2 A450/2$	$M/P=Muestra A 450-CNX/CPX-CNX$
1	0,169	0,959	-0,047
2	0,169	0,959	0,523
3	0,169	0,959	-0,053
4	0,169	0,959	-0,058
5	0,169	0,959	0,835
6	0,169	0,959	-0,030
7	0,169	0,959	0,103
8	0,169	0,959	-0,072
9	0,169	0,959	0,065
10	0,169	0,959	-0,036
11	0,169	0,959	0,008
12	0,169	0,959	0,880
13	0,169	0,959	0,098
14	0,169	0,959	-0,003
15	0,169	0,959	0,103
16	0,169	0,959	-0,061
17	0,169	0,959	-0,037
19	0,169	0,959	-0,050
20	0,169	0,959	0,192
21	0,169	0,959	0,025
22	0,169	0,959	0,672
23	0,169	0,959	-0,055
24	0,169	0,959	1,385
25	0,169	0,959	0,531
26	0,169	0,959	-0,009
27	0,169	0,959	1,497
28	0,169	0,959	0,051
29	0,169	0,959	0,072
30	0,169	0,959	1,484
31	0,169	0,959	-0,046
32	0,169	0,959	0,139
33	0,169	0,959	-0,037
34	0,169	0,959	-0,058
35	0,169	0,959	-0,003
36	0,169	0,959	0,169
37	0,169	0,959	0,001
38	0,169	0,959	0,856
39	0,169	0,959	0,035
40	0,169	0,959	0,013

41	0,169	0,959	-0,004
42	0,169	0,959	0,087
43	0,169	0,959	0,089
44	0,169	0,959	-0,031
45	0,169	0,959	-0,044
46	0,169	0,959	0,711
47	0,169	0,959	0,156
48	0,169	0,959	0,038
49	0,169	0,959	0,856
50	0,169	0,959	-0,058
51	0,169	0,959	-0,059
52	0,169	0,959	-0,011
53	0,169	0,959	0,951
54	0,169	0,959	0,089
55	0,169	0,959	-0,026
56	0,169	0,959	-0,015
57	0,169	0,959	0,008
58	0,169	0,959	1,145
59	0,169	0,959	0,893
60	0,169	0,959	0,032
61	0,169	0,959	0,031
62	0,169	0,959	0,125
63	0,169	0,959	-0,001
64	0,169	0,959	0,023
65	0,169	0,959	-0,007
66	0,169	0,959	-0,051
67	0,169	0,959	0,020
68	0,169	0,959	1,142
69	0,169	0,959	-0,031
70	0,169	0,959	0,173
71	0,169	0,959	0,661
72	0,169	0,959	0,179
73	0,169	0,959	0,054
74	0,169	0,959	1,004
75	0,169	0,959	-0,011
76	0,169	0,959	0,751
77	0,169	0,959	-0,042
78	0,169	0,959	-0,001
79	0,169	0,959	-0,013
80	0,169	0,959	-0,084
81	0,169	0,959	0,208
82	0,169	0,959	0,088
83	0,169	0,959	0,987
84	0,169	0,959	0,082
85	0,169	0,959	0,773
86	0,169	0,959	-0,039
87	0,169	0,959	-0,044
88	0,169	0,959	-0,039
89	0,169	0,959	-0,001

90	0,169	0,959	1,096
91	0,169	0,959	0,180
92	0,169	0,959	0,744
CALCULOS	Calculo de la media de control negativo	Calculo de la media de control positivo	Calculo del resultado de la muestra analizada
MUESTRA	$CNX = CN1 A450 + CN2 A450 / 2$	$CPX = CP1 A450 + CP2 A450 / 2$	$M/P = Muestra A 450 - CNX / CPX - CNX$
93	0,170	1,152	-0,015
94	0,170	1,152	-0,045
95	0,170	1,152	-0,036
96	0,170	1,152	-0,013
97	0,170	1,152	-0,049
98	0,170	1,152	1,224
99	0,170	1,152	-0,029
100	0,170	1,152	0,053
101	0,170	1,152	0,821
102	0,170	1,152	0,003
103	0,170	1,152	0,017
104	0,170	1,152	-0,002
105	0,170	1,152	0,923
106	0,170	1,152	0,064
107	0,170	1,152	0,411
108	0,170	1,152	0,056
109	0,170	1,152	-0,049
110	0,170	1,152	0,897
111	0,170	1,152	-0,002
112	0,170	1,152	-0,021
113	0,170	1,152	-0,021
114	0,170	1,152	-0,007
115	0,170	1,152	-0,014
116	0,170	1,152	0,749
117	0,170	1,152	-0,010
118	0,170	1,152	0,112
119	0,170	1,152	0,537
120	0,170	1,152	-0,028
121	0,170	1,152	0,082
122	0,170	1,152	0,756
123	0,170	1,152	0,446
124	0,170	1,152	0,757
125	0,170	1,152	0,528

126	0,170	1,152	-0,014
127	0,170	1,152	0,562
128	0,170	1,152	-0,002
129	0,170	1,152	-0,022
130	0,170	1,152	-0,041
131	0,170	1,152	0,287
132	0,170	1,152	-0,035
133	0,170	1,152	0,022
134	0,170	1,152	0,218
135	0,170	1,152	0,002
136	0,170	1,152	0,011
137	0,170	1,152	-0,030
138	0,170	1,152	0,087
139	0,170	1,152	0,006
140	0,170	1,152	0,211
141	0,170	1,152	-0,022
142	0,170	1,152	0,004
143	0,170	1,152	0,714
144	0,170	1,152	-0,075
145	0,170	1,152	-0,037
146	0,170	1,152	-0,046
147	0,170	1,152	0,349
148	0,170	1,152	0,296
149	0,170	1,152	0,178
150	0,170	1,152	0,790
151	0,170	1,152	0,212
152	0,170	1,152	-0,014
153	0,170	1,152	-0,052
154	0,170	1,152	0,014
155	0,170	1,152	0,004
156	0,170	1,152	0,026
157	0,170	1,152	-0,160

Anexo 9.2.

Figura 1. Manejo de la muestra de sangre



Figura 2. Separación del suero del plasma sanguíneo.



Figura 3. Materiales y equipos para el análisis



Figura 4. Reactivos para la prueba de ELISA



Figura 5. Colocación del conjugado en los pocillos

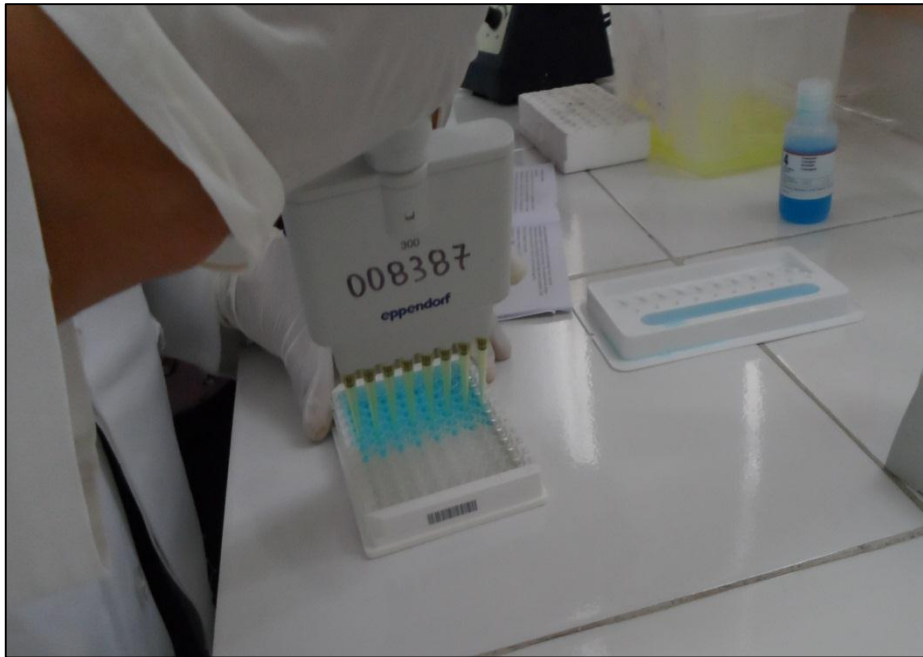


Figura 6. Incubación de la placa



Figura 7. Lavado de la placa.



Figura 8. Colocación de la solución de frenado.

