

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



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

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**Bach. JULIO CESAR HUAYLLA PACCOSONCCO**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**PUNO – PERÚ**

**2018**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS

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

PRESENTADA POR:

Bach. JULIO CESAR HUAYLLA PACCOSONCCO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA



APROBADA POR:

PRESIDENTE:

Dr. FELIPE SANTIAGO AMACHI FERNÁNDEZ

PRIMER MIEMBRO:

Mg. Sc. ABIGAIL TERESA DE LA CRUZ PÉREZ

SEGUNDO MIEMBRO:

Mg. ELOY AMADOR CONDORI CHUCHI

DIRECTOR:

Dr. Sc. NATALIO LUQUE MAMANI

ASESOR:

Mg. Sc. DIANNETT BENITO LOPEZ

Área : Salud animal

Tema : Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina

Fecha de sustentación: 26/11/2018

## DEDICATORIA

Está dedicada con amor y cariño a mis queridos padres: Alejandro y Alberta por todo lo que representan y por su apoyo, consejos, comprensión, amor y ayuda incondicional en todo momento, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi profesión.

A mis queridas hermanas por el apoyo incondicional y cariño de toda la vida.

A mis queridas sobrinas y sobrino por el aliento y cariño que me brindaron durante mi formación profesional.

Julio cesar HUAYLLA PACCOSONCCO

## AGRADECIMIENTO

Al divino creador dios, quien guía cada pasó de mi vida.

Mi sincero reconocimiento y agradecimiento a la prestigiosa Universidad Nacional del Altiplano, por haberme permitido mi formación, en especial a la Gloriosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y cuerpo docente por sus conocimientos impartidos durante mi formación profesional y por la calidad de profesionales que forma.

Del mismo modo a mis apreciados amigos quienes me brindaron su amistad y por su total apoyo incondicional durante los años que pasamos juntos en nuestra formación profesional, por todas las vivencias y su amistad de toda la vida.

Julio cesar HUAYLLA PACCOSONCCO

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	7
<b>ÍNDICE DE ACRÓNIMOS</b> .....	8
<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	12
1.1.1. Objetivo general.....	12
1.1.2. Objetivos específicos.....	12
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	14
<b>2.1. LA DIARREA VIRAL BOVINA</b> .....	14
<b>2.2. CUENCA HIDROGRÁFICA</b> .....	16
<b>2.3. ANTECEDENTES</b> .....	17
2.3.1. A nivel mundial.....	17
2.3.2. A nivel de Perú.....	18
<b>2.4. ETIOLOGÍA</b> .....	20
2.4.1. Taxonomía y Estructura.....	20
2.4.2. Variabilidad.....	21
2.4.3. Organización del Genoma Viral.....	21
2.4.4. Clasificación.....	22
2.4.5. Genotipificación.....	23
<b>2.5. REPLICACIÓN VIRAL</b> .....	25
<b>2.6. EPIDEMIOLOGÍA</b> .....	27
2.6.1. Hospedador.....	28
2.6.2. Fuentes de la Infección.....	28
2.6.3. Modos de Transmisión.....	29
<b>2.7. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y PATOGENESIS</b> .....	35
2.7.1. Infección Subclínica.....	36
2.7.2. Infección Aguda.....	36
<b>2.8. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO</b> .....	43
2.8.1. Pruebas de diagnóstico.....	44
<b>2.9. ERRADICACIÓN</b> .....	48
<b>2.10. OTROS ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE PREVALENCIA DE LA DIARREA VIRAL BOVINA</b> .....	49
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	53

<b>3.1. LUGAR DE ESTUDIO .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....</b>	<b>54</b>
<b>3.3 METODOLOGIA.....</b>	<b>56</b>
<b>3.4. ANÁLISIS DE DATOS.....</b>	<b>60</b>
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>61</b>
<b>Seroprevalencia general al virus de la DVB en vacunos Brown Swiss del Distrito de VILQUE - PUNO. ....</b>	<b>61</b>
<b>4.1. Seroprevalencia del virus de la DVB en vacunos Brown Swiss del distrito de VILQUE – PUNO, Según sexo. ....</b>	<b>63</b>
<b>4.2. Seroprevalencia al virus de la DVB en vacunos Brown Swiss del distrito de VILQUE – PUNO, Según edad. ....</b>	<b>65</b>
<b>4.3. Seroprevalencia al virus de la DVB en vacunos Brown Swiss del distrito de Vilque – Puno, Estado reproductivo.....</b>	<b>66</b>
<b>4.4. Seroprevalencia del virus de la DVB en vacunos Brown Swiss del distrito de Vilque – Puno, Estado productivo .....</b>	<b>68</b>
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>71</b>
<b>VII. REFERENCIAS .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>81</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 01:</b> distribución de animales.....	53
<b>Tabla 02:</b> Seroprevalencia general al vDVB en vacunos de la raza Brown Swiss en el Distrito de VILQUE – PUNO.....	61
<b>Tabla 03:</b> <i>Seroprevalencia de anticuerpos al vDVB en vacunos de la raza Brown Swiss en el distrito de VILQUE – PUNO, según sexo (menores a 2 años)</i> .....	63
<b>Tabla 04:</b> <i>Seroprevalencia de anticuerpos del vDVB en vacas Brown Swiss en el distrito de VILQUE – PUNO, según edad.</i> ....	65
<b>Tabla 05:</b> <i>Seroprevalencia de anticuerpos al vDVB en vacas Brown Swiss en el distrito de VILQUE – PUNO, según estado reproductivo (preñadas secas y en producción).</i> .....	66
<b>Tabla 06:</b> <i>Seroprevalencia de anticuerpos al vDVB en vacas Brown Swiss del distrito de VILQUE – PUNO, según estado productivo (vacías secas y en producción).</i> ....	68

## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

- BVD** : Diarrea viral bovina
- vBVD** : Virus de la diarrea viral bovina
- ELISA**: Inmunoabsorción ligada a enzima
- VHB-1**: Virus herpes bovino tipo – 1
- BPI** : Balanopostitis pústular infecciosa
- VHB-5**: Virus herpes bovino tipo – 5
- CP** : Citopatogénicos
- NCP** : No citopatogénicos
- PI** : Persistentemente infectados
- N<sub>i</sub>** : Tamaño inicial de la muestra
- Z<sup>2</sup>** : Nivel de confianza 95 %
- P** : Proporción de la población objeto de estudio, prevalencia
- q** : Complemento (1-p)
- d<sup>2</sup>** : Precisión con la que se generaliza los resultados, margen de error (5%)
- n** : Tamaño de la muestra
- N** : Tamaño de la población
- IRPC** : Índice relativo x 100
- %IN** : Porcentaje de Inhibición
- DO** : Densidad óptica
- X<sup>2</sup><sub>c</sub>** : Valor de ji-cuadrado
- ∑** : Sumatoria
- θ<sub>i</sub>** : Frecuencia de valor observado
- e<sub>i</sub>** : Frecuencia de valor esperado
- P** : Prevalencia

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el distrito de Vilque situada en la zona noroeste de la región de Puno, la toma de muestras se efectuó el mes de noviembre del 2017 y en julio del 2018 análisis en laboratorio; con el objetivo de determinar la seroprevalencia del virus de Diarrea Viral Bovina (vDVB) en 90 vacunos de la raza Brown swiss, distribuidos según las siguientes variables: sexo (machos y hembras menores de 2 años), edad (< a 2 años y >a 2 años), estado reproductivo (preñadas secas y en producción), estado productivo (en producción y en seca). Se obtuvo muestras de sangre de la vena yugular utilizando aguja nº 20 x 1½ pulgadas, tubos vacutainer sin anticoagulante. El procedimiento de análisis fue mediante la prueba de ELISA indirecta, para la detección de anticuerpos contra el vDVB, utilizando el Kit IDEXX BVDV p80 Ab, en el laboratorio de Salud Animal de la F.M.V.Z. con sede en el C.E. - Chuquibambilla, UNA-PUNO, los datos fueron analizados a través de la prueba estadística de Chi-cuadrado. Los resultados para la seroprevalencia general del vDVB fue de 65.56% (59/90); según sexo en machos fue de 45.45% y en hembras 52.94%, los cuales no mostraron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ); según edad los animales menores de 2 años reflejaron 50.00% y en mayores de 2 años de 72.58% en los que si se observó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ); según estado reproductivo fue de 64.29% para las vacas preñadas en seca y 83.33% para las vacas preñadas en producción; y según estado productivo fue de 81.25% para vacas en lactación y 57.14% para las vacas en seca. En conclusión, los agentes de las enfermedades están presentes en la zona de estudio, por lo cual se tiene que implementar medidas de prevención y vigilancia permanente; ya que perjudicará a la óptima productividad de la actividad.

Palabras Clave: DVB, ELISA, Seroprevalencia, Vacunos, Vilque.

## ABSTRACT

The present research work was carried out in the district of Vilque located in the northwestern area of the Puno region, the sampling was carried out in November of the 2017 and in July of the 2018 analysis in the laboratory; with the objective of determining the seroprevalence of the Bovine Viral Diarrhea virus (vDVB) in 90 Brown swiss cattle, distributed according to the following variables: sex (males and females under 2 years), age (<2 years old and > to 2 years), reproductive status (pregnant and dried in production), productive state (in production and dry). Blood samples were obtained from the jugular vein using # 20 x 1½ inch needle, vacutainer tubes without anticoagulant. The analysis procedure was by means of the indirect ELISA test, for the detection of antibodies against vDVB, using the IDEXX BVDV p80 Ab Kit, in the Animal Health laboratory of F.M.V.Z. based at C.E. - Chuquibambilla, UNA-PUNO, the data were analyzed through the Chi-square statistical test. The results for the general seroprevalence of vDVB was 65.56% (59/90); according to sex in males it was 45.45% and in females 52.94%, which did not show significant differences ( $P \geq 0.05$ ); according to age, animals under 2 years of age reflected 50.00% and in older than 2 years, 72.58% showed significant differences ( $P < 0.05$ ); according to reproductive status it was 64.29% for pregnant cows in dry and 83.33% for pregnant cows in production; and according to the productive state, it was 81.25% for cows in lactation and 57.14% for dry cows. In conclusion, the agents of the diseases are present in the study area, which is why preventive measures and permanent surveillance have to be implemented; since it will harm the optimal productivity of the activity.

Keywords: BVD, ELISA, Seroprevalence, Cattle, Vilque

## I. INTRODUCCIÓN

La población nacional de vacunos alcanza a 5'156,044 animales, de ésta 904,069 son de la raza Brown Swiss; la Región Puno posee el 12% de la población total en el Perú, de los cuales un 90.8% son de la raza criolla y un 9.2% son de razas especializadas, y de estas el 95.6% Brown swiss, el 4.4% Holstein y otros (INEI, 2012). En el altiplano peruano, ubicado por encima de los 3,830 m.s.n.m., donde la actividad pecuaria es una de las principales actividades que realizan las familias rurales de la región de Puno, la crianza de vacunos es uno de los pilares de la economía regional, aprovechando la producción de leche y se encuentra en manos de pequeños, medianos y grandes productores MINAGRI (2015).

Las enfermedades respiratorias, entéricas y reproductivas constituyen las principales patologías que limitan los procesos productivos y reproductivos de los bovinos. Entre los agentes virales que tienen especial implicación en la ocurrencia de dichas patologías se encuentran el de la diarrea viral bovina y otras enfermedades infecciosas, que causan grandes pérdidas económicas en los hatos ganaderos Puneños. Por eso es importante reconocer los últimos avances científicos acerca de esta enfermedad, para poder hacer un diagnóstico y control más rápido y definitivo; y así, evitar que se sigan diseminando, y a su vez difundir más información que favorezca a los ganaderos y a las entidades interesadas en controlar y erradicar estas enfermedades en Puno y el Perú.

El impacto de la enfermedad producida por el virus de la diarrea viral bovina (vDVB) produce pérdidas productivas y gastos provenientes de tratamiento y prevención. Las pérdidas productivas dependen de la población, la magnitud de

la infección y el curso de las diferentes manifestaciones de la enfermedad, e incluyen disminución en la producción láctea, reducción en la tasa de concepción, trastornos reproductivos, infecciones fetales causales de aborto, defectos congénitos, retardo en el crecimiento y muerte en los animales al adquirir infección aguda. Sumado a esto, la infección fetal produciendo terneros persistentemente infectados (PI), los que son más pequeños, débiles y tienen una susceptibilidad a otras enfermedades y eventualmente pueden morir por la enfermedad de las mucosas (Houe, 2003).

Frente a esta problemática que afecta a los vacunos sobre todo en la producción lechera, se desconoce datos de seroprevalencia de DVB en la cuenca lechera del distrito de Vilque-Puno, por lo que este distrito sigue trabajando en el desarrollo de mejora de la ganadería lechera mediante la introducción de razas mejoradas al hato a través de la inseminación artificial con pajillas importadas sin registro y/o control sanitario, en este contexto fue necesario realizar esta investigación; teniendo como:

## **1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1.1.1. Objetivo general**

Determinar la seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en vacunos de la raza Brown Swiss en la cuenca lechera del distrito de Vilque

### **1.1.2. Objetivos específicos**

Determinar seroprevalencia del vDVB según sexo (machos < 2 años, hembras < 2 años).

Determinar seroprevalencia del vDVB según edad (menores a 2 años y mayores a 2 años).

Determinar seroprevalencia del vDVB según estado reproductivo (preñadas secas y en producción).

Determinar seroprevalencia del vDVB según estado productivo (secas y en producción).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. LA DIARREA VIRAL BOVINA

El virus de la diarrea viral bovina (vDVB) es un importante patógeno del bovino con una amplia distribución mundial (Hilbe *et al.*, 2007). El agente causal del complejo diarrea viral bovina (vDVB) y enfermedad de las mucosas (EM), es responsable de la ocurrencia de diferentes cuadros clínicos, de variable intensidad y gravedad. El carácter inmunodepresor del virus predispone al animal a otras enfermedades causadas por agentes comensales y/o patógenos (Peterhans *et al.*, 2003; Hilbe *et al.*, 2007).

La Diarrea Vírica Bovina (DVB), es una enfermedad de etiología vírica que afecta a los bovinos de todas las edades y que puede cursar con sintomatología muy variable dependiendo principalmente de las características de la cepa. Esta enfermedad se ha asociado a cuadros digestivos, con diarreas y erosiones en cavidad oral, trastornos reproductivos (abortos, alteraciones congénitas e infertilidad) y signos respiratorios (Hilbe *et al.*, 2007).

El virus de la vDVB es un Pestivirus que originalmente fue clasificado en la familia de los Togaviridae, pero que debido a sus características moleculares se reclasificó dentro de la familia Flaviviridae. Es un virus de genoma ARN, pequeño con una envoltura lipoproteica que está estrechamente emparentado con el virus de la Enfermedad de Border de los ovinos y en un menor grado con el virus de la Peste Porcina Clásica. El vDVB puede infectar también de manera subclínica ovinos, caprinos, cerdos y otros rumiantes. Este virus también es un contaminante común de materiales biológicos, en

especial líneas de cultivos celulares y sueros que se utilizan como promotores de crecimiento celular. Es llamativa la heterogenicidad genómica que se observan en los aislamientos de campo (Duffell y Harkness, 1985).

Dado que la variabilidad de las cepas de BVD-V que se observan en diferentes regiones del mundo afecta los valores de protección otorgados por las vacunas, es importante realizar estudios genómicos permanentes de las cepas aisladas en el país. Las cepas del Genotipo II aisladas en diferentes brotes son NCP. Las vacunas que se encuentran actualmente disponibles en el comercio de todos los países contienen el genotipo 1, las cuales tienen una protección cruzada contra el genotipo II. Sin embargo, esta protección no alcanza para prevenir las infecciones transplacentarias, lo cual indicaría la necesidad de incluir el genotipo II en las vacunas (Baker *et al.*, 1990).

Especial importancia adquiere esta virosis cuando la infección ocurre en la etapa reproductiva, ya que puede interferir con la concepción y la infección transplacental dependiendo de la edad de la gestación y de las características biológicas de la cepa viral, puede producir muerte embrionaria o fetal, aborto, momificación, malformaciones congénitas, mortalidad perinatal, retraso en el desarrollo, respuesta inmune protectora o reconocimiento del virus como propio sin capacidad de responder inmunológicamente a él y en este caso, si el animal sobrevive, queda con una infección persistente comportándose en vida extrauterina como portador inmunotolerante al virus y expuesto a cursar la EM que es siempre de curso fatal (Baker *et al.*, 1990).

## 2.2. CUENCA HIDROGRÁFICA

Se conoce como cuenca hidrográfica al área drenada por un río. En la cuenca es posible efectuar un balance del ciclo hidrológico, cuantificando con mayor precisión el agua disponible. El movimiento del agua en la cuenca conecta e integra sus partes, en su arreglo jerárquico como cuencas, subcuencas y micro cuencas. Sus recursos naturales y habitantes poseen condiciones físicas, biológicas, económicas, sociales y culturales que les confieren características particulares a cada una. Existen tres grandes agrupaciones de cuencas hidrográficas en el Perú, llamadas con propiedad vertientes:

La vertiente del Pacífico tiene una longitud de 3.079,5 km y que cubre el 21,7% del territorio peruano. Está constituida por 53 ríos que fluyen de noreste a suroeste. Las cuencas de estos ríos se nutren de las precipitaciones estacionales que caen en los flancos occidentales de los Andes. En esta vertiente se encuentran las cuencas con mayor demanda de agua del país, siendo el uso agrícola el predominante (Dourojeanni, 1994).

La vertiente del Atlántico, que aporta la totalidad de sus aguas al río Amazonas. Las cuencas principales en su parte norte son las del Ucayali, Marañón y Huallaga. Los ríos de esta vertiente se originan también sobre los 4.000 msnm y están alimentados por las fuertes precipitaciones que ocurren durante el verano y producen caudales de comportamiento irregular con crecidas notables entre octubre y marzo, con un periodo de vaciante el resto del año que se pronuncia en forma notoria generalmente en julio y agosto. Se estima que un 90% de estos provienen de los Andes (MINAGRI, 1988).

La vertiente del lago Titicaca está formada por doce ríos principales de drenaje radial y es compartida por Perú y Bolivia. El origen de todos los ríos está entre los 4.000 y 6.000 m.s.n.m., salvo el del río Desaguadero, que drena el lago hacia territorio boliviano. Las precipitaciones en la zona son marcadamente estacionales, originando típicos escurrimientos Irregulares y torrentosos que concentran de diciembre a abril entre el 60 y el 80% de las descargas anuales. Los cauces son sinuosos en sus partes altas y radiales en su zona baja (MINAGRI, 1988).

## 2.3. ANTECEDENTES

### 2.3.1. A nivel mundial

La diarrea viral bovina (DVB) se presentó por primera vez en el año 1946 en Estados Unidos, el agente causal de esta enfermedad fue aislado (Olafson *et al.*, 1946 y Lee y Gillespie, 1957) y se denominó vDVB.

La enfermedad tiene una distribución mundial, como lo demuestran los distintos estudios de seroprevalencia realizados. (Guarino *et al.*, 2008), siendo generalmente más baja en países o en áreas con menos desarrollo que en zonas con sistemas de producción bovina más avanzados. En Europa, las tasas de seroprevalencia pueden superar el 64 por ciento en países como Reino Unido o Dinamarca. (Houe y Meyling, 1991), detectándose diferencias marcadas en función de los sistemas productivos. También se ha podido observar, en países escandinavos, que las explotaciones situadas en la zona sur con mayor densidad de población bovina presentan una mayor prevalencia de infección que las zonas norteñas que se caracterizan por una menor densidad de población (Loken *et al.*, 1991). En España, los estudios

realizados a lo largo de los años, muestran un aumento progresivo de la seroprevalencia (Vega, 1998).

En 1940 fue descrita en Saskatchewan, Canadá, una enfermedad en bovinos caracterizada por una severa diarrea, depresión, anorexia, leucopenia y ulceración de las mucosas de la cavidad bucal que fue llamada «enfermedad X» por la dificultad en la identificación del agente causal y fallas en el intento de reproducirla experimentalmente. (Childs, 1946). Un síndrome de similares características clínicas e histopatológicas fue descrito posteriormente en New York, EEUU. (Olafson *et al.*, 1946) y se le denominó diarrea viral bovina (DVB).

En 1950 se presentaron casos más severos en Iowa, EEUU, caracterizados por descarga nasal mucopurulenta, hemorragias y erosiones en el tracto intestinal con mínima infiltración de células inflamatorias; sin embargo, los animales inoculados con sangre y machacados de tejidos de animales solo presentaban fiebre ligera y fue denominada enfermedad de las mucosas (EM) (Ramsey y Chivers, 1953).

### **2.3.2. A nivel de Perú**

La industria lechera del país está concentrada, principalmente, en las cuencas de Arequipa, Lima y Cajamarca. (MINAG, 1996). La cuenca lechera de Arequipa es la principal del país, cuenta con una población aproximada de 50,000 vacas en producción y contribuye con el 22% de la producción lechera nacional (Andresen, 2001).

La industria lechera en el país afronta serios limitantes en su desarrollo. Algunos de estos factores son las enfermedades infecciosas como la neosporosis y diarrea viral bovina (DVB), causados por el parásito *Neospora caninum* y el virus de la DVB (VDVB), respectivamente (Olivera, 2001).

Los resultados de los estudios que se vienen efectuando sobre la DVB, indican que el virus está ampliamente difundido en las principales cuencas lecheras del país (Contreras *et al.*, 2000).

Estudios serológicos realizados en bovinos de las principales cuencas lecheras del Perú muestran que el VDVB está ampliamente difundido, y con prevalencias superiores al 50% (Ståhl *et al.*, 2008).

Más del 98% de los hatos muestreados presentaron evidencia de infección viral, confirmándose la amplia distribución del VDVB en la población bovina productora de leche de la Irrigación Majes (Huamán *et al.*, 2007)

En Lima el virus estuvo distribuido en la población bovina en las tres zonas del valle de Lima, hubo cinco hatos con ausencia de animales serorreactores (Aguilar y col, 2006)

La presencia de anticuerpos contra el VDVB es más de 47 % de los animales muestreados sin historia de vacunación en la provincia de Melgar indica exposición de los animales al virus de campo; así mismo, los resultados indicaron que el virus se encuentra en el ganado bovino de todos los distritos de la provincia. La seroprevalencia viral fue mayor en animales de más de dos años lo que podría indicar la persistencia de

los anticuerpos en el animal o posibilidades de reinfecciones por el VDVB (Quispe *et al.* 2008).

## 2.4. ETIOLOGÍA

### 2.4.1. Taxonomía y Estructura

El vDVB pertenece al género Pestivirus de la familia Flaviviridae (Heinz *et al.*, 2000). Se hizo necesaria la reclasificación de estos virus dentro de la familia Flaviviridae (Horzinek, 1991). La familia Flaviviridae (del latín flavus, amarillo) actualmente está constituida por tres géneros: los Flavivirus, los Pestivirus (del latín pestis, plaga), y los Hepacitovirus (del griego hepar, hepatus, hígado) (Heinz *et al.*, 2000).

Son virus envueltos, esféricos y miden 40 a 60 nm de diámetro. Se componen de una cadena simple de ARN compactado por una cápside proteica, rodeada por una membrana fosfolipídica con tres glicoproteínas ancladas a ella (Nettleton *et al.*, 1995), Constituida por una nucleocapside icosaedrica entre 25 – 37 nm de diámetro, protegida por una capsida proteica rodeada por una membrana fosfolipidica (Lertora., 2003), con tres glicoproteínas ancladas a ella: Erns, E1 y E2 Entre las proteínas más importantes que conforman la estructura de la partícula tenemos: Npro/p20: Es la primera proteína no estructural traducida del ORF y cumple la función de autoproteasa, generado del extremo N terminal de la proteína C/p14 Esta proteína no es requerida para la replicación del ARN viral y C/p14: Es la segunda proteína generada y es la más abundante (Goyal y Ridpath, 2005).

### 2.4.2. Variabilidad

La principal característica de este virus ARN es su variabilidad genética y antigénica. Los virus ARN se caracterizan por su plasticidad; 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 de su hospedador. El cruce de especies crea otra oportunidad para la diversidad antigénica o envoltura (Lértora, 2003). El vDVB usa esta estrategia para sobrevivir, originando cepas mutantes que escapan a la respuesta inmunológica del hospedador (Donis, 1995)

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 (Bolin y Ridpath, 1992) 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 (Patón et al., 1994 y Lamberth *et al.*, 2007).

### 2.4.3. Organización del Genoma Viral

El vDVB posee un genoma lineal compuesto de ARN de hebra simple de polaridad positiva de una longitud aproximada de 12,3 kb y no presenta ARNm subgenómicos. El extremo 5' carece de estructura "cap", mientras

que el extremo 3' no se encuentra poliadenilado y termina con un corto tracto poli C. El ORF codifica una sola gran poliproteína de cerca de 4.000 kDa, la que será dividida, posterior a la traducción, en proteínas individuales mediante la acción de proteasas virales y celulares (Ridpath, 2005).

La región UTR del extremo 5' es importante para la iniciación de la traducción del ORF; es una región altamente conservada y contiene el sitio de Entrada Interno al Ribosoma (IRES) que promueve la iniciación de la traducción de la poli proteína viral. El IRES es un complejo de elementos utilizado por la célula eucariota, como un mecanismo alternativo para el inicio de la traducción de proteínas reclutando la maquinaria de traducción celular al codón de iniciación (AUG) en el ARNm como respuesta a un agudo estrés celular (Martínez *et al.*, 2001).

#### 2.4.4. Clasificación

La clasificación del vDVB es difícil, debido a su variabilidad genética y antigénica y a su estrecha relación con otros miembros del género pestivirus. Los hospedadores en que eran aislados los pestivirus fueron las bases iniciales para su subdivisión. Sin embargo, este criterio de clasificación es poco fiable debido a que los pestivirus cruzan fácilmente la barrera de especie (Lertora, 2003).

Según sus efectos en los cultivos celulares y por el reordenamiento genómico del gen no estructural, los Pestivirus se dividen en biotipos citopáticos (CP) y no citopáticos (NCP). Los virus CP ocasionan vacuolización del citoplasma mediante un mecanismo apoptótico y

muerte celular, además se caracteriza por la expresión separada de las proteínas NS2 y NS3 (Donis et al., 2003), los virus NCP no ocasionan cambios o lesiones visibles en el cultivo celular es decir que no causa ningún efecto en la monocapa celular que infecta y donde se multiplica adecuadamente, es decir que la célula infectada parece normal, pero no indica carencia de virulencia o patogenicidad en su huésped usual (bovino); Este biotipo es el más común en la naturaleza y se expresa NS2-3 como proteína fusionada (Bolin et al., 2004). Esto no implica que los biotipos NCP sean no patogénicos. El biotipo CP se aísla únicamente de animales con enfermedad de las mucosas (EM) y se origina por mutación a partir del biotipo NCP ya sea por depleción de fragmentos del genoma viral, inserción del fragmento de ARN celular y reordenamiento del ARN viral. Los virus NCP presentan afinidad por células linfocitarias mientras que los virus CP infectados de manera predominante las células epiteliales (Bolin *et al.*, 1992 y Bolin *et al.*, 2004).

#### 2.4.5. Genotipificación

Los biotipos se refieren a diferencias fenotípicas, mientras que los genotipos indican las diferencias en el genoma. Al virus de DVB se lo divide en genotipos 1 y 2. En un inicio los genotipos fueron reconocidos como especies distintas ya que la clasificación se realizaba en función a la similitud en la secuencia de la región 5 UTR, actualmente se basa en las diferencias que presentan en distintas partes del genoma (Ridpath *et al.*, 2006).

El virus DVB tipo 1 es responsable de procesos leves con sintomatología inaparente, caracterizados por ligero aumento de la temperatura corporal y la presencia de lesiones moderadas restringidas al aparato digestivo y a órganos del sistema Linfoide; en vacas gestantes este genotipo puede inducir abortos y patologías reproductivas, al virus DVB tipo 2 se lo asocia con enfermedades agudas severas caracterizadas por presentar un cuadro hemorrágico agudo, conocido como síndrome hemorrágico, que es fatal para los animales. No se ha establecido una diferencia en la virulencia y en los mecanismos patogénicos de ambas especies (Walz *et al.*, 2001).

Genéticamente se han tipificado a los aislados del virus DVB tipo 1 y 2 en subgrupos o subgenotipos, dando lugar a 11 subgenotipos para el virus DVB tipo 1 (1a, 1b, 1c, 1e, 1f, 1g, 1h, 1i, 1j, 1k,) y 2 para el virus DVB 2 (1a, 1b,) (Pedrera *et al.*, 2007).

Según el efecto sobre los cultivos celulares se ha tipificado dos tipos del Virus, citopático (CP) y no citopático (NCP). El biotipo NCP es responsable de la infección 90% de los bovinos, así como también es uno de los causantes de las alteraciones reproductivas, y pertenece al grupo de virus que actúan en el complejo respiratorio bovino (Bracamonte *et al.*, 2006).

Los virus NCP no ocasionan cambios visibles en el cultivo celular y la célula infectada se observa normal. El biotipo CP es el que se encuentra mayormente en el ambiente, este puede originar infección persistente, este biotipo se origina por mutación del NCP por depleción de

fragmentos del genoma viral, inserción de Fragmentos de ARN celular o duplicación y reordenamiento del ARN viral y es aislado en animales con enfermedad mucosa. Los virus NCP infectan células linfocitarias, los tienen predilección por células epiteliales (Dubovi, 1986).

El biotipo CP es aislado únicamente en animales con enfermedades de las mucosas, provocan efectos citopático sobre cultivos de células epiteliales bovinas, lo que se traduce en vacuolización citoplasmática y muerte celular. El biotipo NCP ante los cultivos celulares muestra que se replica, pero no presenta cambios morfológicos evidentes. Actualmente se ha surgido la existencia de un tercer biotipo linfocitopático que no causa muerte celular en cultivos de células epiteliales, pero si en cultivos de células linfoides (Ridpath *et al.*, 2006).

El biotipo NCP es el único con capacidad de atravesar la placenta e infectar al feto, pudiendo dar lugar al nacimiento de animales persistentemente infectados, los cuales juegan un papel crucial en la epidemiología de la enfermedad. El biotipo CP en cambio, es incapaz de establecer infecciones persistentes. Sin embargo, cuando infecta a individuos que han sufrido una infección intrauterina previa por una cepa NCP antigénicamente homóloga, puede dar lugar al desarrollo de una forma fatal de la DVB conocida como enfermedad de las mucosas (Pedrera *et al.*, 2007).

## 2.5. REPLICACIÓN VIRAL

La unión y entrada de los pestivirus a la célula involucra la interacción con un receptor, la internalización y la fusión de membranas, Los receptores de

la célula para pestivirus no han sido completamente caracterizados, pero mediante el empleo de anticuerpos monoclonales se identifica a una proteína de superficie celular de 50 kDa y a otras de 60 y 93 kDa (Lindenbach *et al.*, 2007).

Las glicoproteínas E2 y E<sub>ns</sub> pueden ligarse independientemente a la superficie celular, interactuando con distintos componentes de la membrana celular. La glicoproteína E2 es la proteína mayoritariamente presente en el virión y es la principal responsable de la unión al receptor celular y del tropismo del virus en cultivos celulares, por lo menos para los pestivirus de rumiantes; Además es la proteína más inmunodominante existente en el virión de los pestivirus, induciendo altos niveles de anticuerpos neutralizantes (Donis y Dubovi, 1987; Ridpath, 1991).

Luego de la unión, el vDVB ingresa a la célula vía endocitosis ubicándose en un compartimiento endocítico prelisosomal en donde un pH bajo induce la fusión de la envoltura del virión con la membrana celular, llevando a que la nucleocápside se libere hacia el citoplasma, lugar en que ocurre la traducción y duplicación del ARN genómico. La traducción del ARN es independiente del Cap y está mediado por una secuencia nucleotídica conocida como IRES (del inglés, Internal Ribosome Entry Site) que está ubicada en el extremo 5' UTR del genoma y permite comenzar la traducción del ARN uniéndose a la subunidad ribosomal 40S generando la producción de una poliproteína que posteriormente es fraccionada en proteínas no estructurales y estructurales, iniciándose este proceso por la proteína no estructural (Krey *et al.*, 2005 y Lecot *et al.*, 2005).

Las proteínas de la cápside son liberadas de la membrana del retículo endoplásmico e interactúan con ARN genómicos seguido por el reconocimiento de dominios citoplasmáticos de proteínas de la envoltura. Los viriones dispuestos en vesículas se movilizan a través del citoplasma a la superficie, donde las vesículas se fusionan con la membrana plasmática liberando las partículas en el medio extracelular alrededor de las 8 horas post infección (Lindenbach *et al.*, 2007).

## 2.6. EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de la infección de 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).

Según Parra (1994), la distribución de los anticuerpos en los distintos grupos etarios en hatos con animales PI y sin animales PI, determina que existan 5 fases en el ciclo de infección.

- Fase A: hatos con infección aguda sin animales PI solo un pequeño porcentaje del hato será seropositivo.
- Fase B: hatos infectados con animales PI menores de 3-4 meses de edad, la mayor de los animales está bajo una infección aguda, a una velocidad variable dependiente del sistema de producción (Leche, Carne o doble propósito).

- Fase C: Hatos infectados con animales PI mayores de 3-4 meses de edad, usualmente más del 90% del hato es seropositivo.
- Fase D: Hatos previamente infectados donde los animales PI han sido removidos recientemente, los animales jóvenes serán seronegativos cuando pierdan sus anticuerpos calostrales a los 6-8 meses de edad, mientras que los animales adultos permanecen seropositivos.
- Fase E: Hatos previamente infectados, donde los animales PI han sido removidos hace varios años, todos los animales jóvenes serán seronegativos (excepto algunos terneros con anticuerpos calostrales) Eventualmente el Hato se volverá seronegativo.

#### **2.6.1. Hospedador**

Los Pestivirus infectan naturalmente sólo a los ungulados del Orden Artiodáctila. Los Pestivirus rumiantes infectan a porcinos, bovinos, ovinos, caprinos, alpacas, llamas, camellos, búfalos de agua y rumiantes silvestres. Siendo su huésped preferido los bovinos. Estas consideraciones deben tomarse en cuenta a la hora de implementar un programa de control (Valera, 2007).

#### **2.6.2. Fuentes de la Infección**

La principal fuente de infección son los bovinos persistentemente infectados (PI), estos animales son los que se infectan antes de los cuatro meses de gestación (120-125 días) con un biotipo NCP, su sistema inmune no es capaz de reconocer al virus como invasor y se convierte en inmunotolerante al virus en cantidades altas y continuamente durante toda su vida el virus, mediante secreción nasal,

saliva, materia fecal, orina, lagrimas, semen y leche; por otra parte los animales con infección aguda también son una fuente importante de eliminación del virus aunque en menor cantidad y por cortos periodos de tiempo (Houe, 2003).

### **2.6.3. Modos de Transmisión**

La transmisión puede ser vertical u horizontal, por contacto directo o indirecto. Siendo la transmisión vertical la que se da de una generación a la siguiente, pudiendo ésta 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, 2003).

#### **2.6.3.1. Transmisión vertical**

La infección transplacentaria ocurre en hembras susceptibles infectadas durante la preñez. 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 (Obando y Rodríguez, 2005). La transmisión vertical también ocurre luego de la transferencia embrionaria si el recipiente es PI, o la vaca donante

es PI y no se realiza el correcto lavado del embrión (Alvarez *et al.*, 2002).

Si el feto es infectado por biotipos NCP antes de adquirir competencia inmunológica (antes del día 125 de gestación, aproximadamente) desarrollará una infección persistente. Pese a la eleva tasa de mortalidad de los animales PI en su primer año de vida (más de 50%), muchos alcanzan la madurez sexual y se reproducen. Hembras PI siempre dan terneros PI. La transmisión vertical también ocurre luego de la transferencia embrionaria si el recipiente es PI, o la vaca donante es PI y no se realiza el correcto lavado del embrión (Houe, 1999).

A pesar de la alta mortalidad entre los terneros PI , 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, 2003).

#### **2.6.3.2. Transmisión horizontal**

El contacto directo con animales PI, especialmente contacto nariz a nariz, es el modo más eficiente de transmisión en condiciones naturales. El contacto directo con animales que cursan una infección aguda también puede transmitir el virus (Houe, 2003).

Se ha demostrado experimentalmente la transmisión por vía aérea (inhalación) a corta distancia entre bovinos persistentemente infectados a bovinos centinelas. Aunque la transmisión aerógena no es la principal ruta de transmisión, puede tener consecuencias

graves cuando cepas de alta virulencia afectan a poblaciones susceptibles y con alta densidad animal (Álvarez *et al.*, 2002 y Lértora, 2002).

El semen crudo o criopreservado de toros PI o con infección aguda es una importante vía de transmisión horizontal. Para evitar el uso de estos animales, en los centros de inseminación se debe recurrir al aislamiento viral y a un período de cuarentena que supere la fase aguda de la infección (Lertora, 2002).

Sin embargo, un toro con infección aguda puede escapar al aislamiento viral en sangre, superar el período de cuarentena y seguir siendo una amenaza. El virus puede eliminarse en semen por un corto período más allá del último día de viremia y se han detectado toros fuertemente seropositivos no virémicos que eliminan persistentemente el virus por semen. Esta última situación se presenta cuando la infección ocurre en la pubertad, durante la formación de la barrera inmunológica hematotesticular, permitiendo al virus replicarse dentro del testículo y evadir la respuesta inmune (Lertora, 2002).

También es posible la transmisión por transferencia embrionaria. La mayoría de las células del tracto reproductivo de la hembra son permisibles al virus; además, los cultivos celulares y el suero fetal bovino utilizados en transferencia embrionaria pueden estar contaminados. Los embriones producidos *in vivo*, con zona pelúcida intacta, recolectados de vacas naturales o artificialmente

infectadas, no actuarían como vectores para la transmisión de la enfermedad si se cumple con los procedimientos de lavado o lavado y tratamiento con tripsina recomendados por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (Fray *et al.*, 2000).

Sin embargo, la presencia de una zona pelúcida intacta y los procedimientos de lavado, no garantizan que los embriones estén libres del virus, ya que pueden desarrollarse de oocitos infectados. Se ha demostrado que los oocitos soportan la replicación del vDVB, pudiendo ingresar al oocito en forma directa o a través de las células del cumulus, las cuales son susceptibles al virus y están en estrecho contacto con el oocito por medio de procesos citoplasmáticos (Fray *et al.*, 2000).

Pese a que no se ha demostrado si estos oocitos infectados son capaces de desarrollarse hasta la ovulación, no debe descartarse el potencial de las células germinales para transmitir al vDVB. Los embriones producidos *in vitro* son una fuente potencial de introducción del vDVB. La zona pelúcida de embriones producidos *in vitro* presenta alteraciones estructurales y bioquímicas permitiendo al virus penetrar hasta aproximadamente 50% de su espesor, de manera que los procedimientos de lavado y tratamiento con tripsina no eliminan el virus. Sin embargo, no se ha determinado si la cantidad de virus asociado a estos embriones podría constituir una dosis infectiva para recipientes susceptibles vía intrauterina (Fray *et al.*, 2000 y Lertora, 2003).

Experimentalmente se han demostrado varias vías de transmisión indirecta como el uso de agujas, mocheta, palpación rectal y la acción de insectos hematófagos, minutos después de haber estado en contacto con animales PI. Sin embargo, su importancia práctica aún no está clarificada, ya que es un virus que se inactiva fácilmente. Es rápidamente inactivado por el calor, desecación, luz ultravioleta, detergentes, solventes orgánicos y pH que exceda el rango de 5,7 a 9,3 70. Otro modo importante de transmisión es el uso de vacunas a virus vivo modificado o vacunas contaminadas (Houe, 2003).

#### **2.6.3.3. Transmisión entre rebaños**

La principal forma de introducir el virus a un rebaño susceptible es a través de la adquisición de bovinos PI o hembras que transportan fetos PI. Otras vías de introducción son: el uso de vacunas vivas, semen contaminado, cohabitación con ovinos, transferencia embrionaria y el contacto con bovinos con infección aguda (Houe, 1999 y Lértora, 2003).

#### **2.6.3.4. Transmisión dentro del rebaño**

La transmisión dentro del rebaño depende de la forma de introducción del virus al mismo. Cuando un animal PI es introducido a un rebaño, la transmisión a animales susceptibles ocurre rápidamente a la mayoría de los animales del rebaño. Por el

contrario, cuando la infección se inicia por un bovino con infección aguda o por alguna otra vía que inicie una infección aguda, la transmisión es de corta duración y solo incluye un pequeño porcentaje del rebaño antes que la transmisión cese. El sistema de producción y la virulencia de la cepa también participan en la tasa de transmisión. La diseminación es más eficiente en sistemas de producción que permiten un estrecho contacto entre animales y con cepas virulentas (Lértora, 2003 y Houe, 1999).

#### **2.6.4. Animales Persistentemente Infectados (PI)**

Los animales PI constituyen un grupo importante para la perpetuación de las enfermedades en las poblaciones animales, por lo que son conocidos como los únicos reservorios naturales del virus. El ternero PI es portador del virus mientras vive y es incapaz de montar una adecuada respuesta inmune contra el virus presente en su organismo, estos animales son los reservorios y los principales diseminadores del virus en el hato y pueden desarrollar la enfermedad de las mucosas de curso fetal (Bolin, 1992).

Una vez han desaparecido los anticuerpos maternos, el PI puede eliminar el virus durante toda su vida. Se asume que la vida útil de los PI, es reducida por diversos aspectos, además de la probabilidad de manifestar EM la cual tiene consecuencias letales (Bolin, 1992 y Rivera, 2001).

Los PI son más susceptibles a otras enfermedades comunes a los terneros, como diarrea y neumonías; estos animales permanecen

en las fincas, pues los propietarios no relacionan la situación con el vDVB y mediante cuidados alternativos, tratan de nivelar el grupo de animales jóvenes favoreciendo la supervivencia de los PI, aunque pocos terneros PI puedan hacerlo. Son animales aparentemente normales, en ocasiones tienen ganancias de peso y desarrollo menor cuando se comparan con los otros animales del grupo. En casos donde el hato sea libre de la enfermedad, o los niveles de inmunidad sean bajos, se pueden presentar brotes de DVB con alta mortalidad (Parra, 1994).

Las vacas PI siempre paren terneros PI, sin embargo, algunas vacas seropositivas pueden producir terneros persistentemente infectados si sus anticuerpos circulantes no tienen reacción cruzada con el virus al cual son expuestas. Los terneros PI son susceptibles a numerosas enfermedades por el feto inmunosupresor del virus. Algunas veces, sin embargo, pueden ser aparentemente normales y saludables (Brownlie *et al.*, 2000).

## 2.7. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y PATOGENESIS

El vDVB es responsable de originar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones como resultado de la interacción de factores tales como: cepa y biotipo viral, edad y estado inmune del hospedador, respuesta inmune inducida, factores estresantes y otros patógenos concurrentes (Bielefeldt, 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

La mayoría de las infecciones son subclínicas o de carácter moderado, con fiebre, descarga oculonasal, leucopenia transitoria, elevada morbilidad y baja mortalidad. Se desarrollan anticuerpos neutralizantes 14 a 28 días postinfección y consecuentemente la protección contra reinfecciones por cepas homólogas del virus es de por vida. 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, 2005 y Baker, 1987).

### 2.7.2. Infección Aguda

Es una infección posnatal aguda de severidad variable, en bovinos 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 (Lértora, 2002 y Baker, 1987).

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 oro nasal 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).

En 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 (David *et al.*, 1994 y Vanroose *et al.*, 1998).

### **2.7.3. Enfermedad de las Mucosas**

Es de baja morbilidad y alta mortalidad. La EM resulta de la infección de un ternero persistentemente infectado con una cepa CP la que probablemente ha evolucionado o mutado de la cepa NCP. La enfermedad se caracteriza por una grave patología digestiva con úlceras y erosiones por todo el tracto digestivo, severa leucopenia, diarrea profusa lesiones en la piel y espacios interdigitales. En la EM se pueden aislar ambas cepas CP y NCP (Obando y Rodríguez, 2005).

### **2.7.4. Síndrome Hemorrágico**

Virus del genotipo 2 del vDVB se asocian a una condición fatal denominada síndrome hemorrágico. Se caracteriza por mucosas anémicas con hemorragias petequiales y equimóticas, hipertermia, hemorragia en múltiples sistemas orgánicos, diarrea sanguinolenta,

epistaxis, sangrado constante en los sitios de inyección, anemia, leucopenia, trombocitopenia y muerte (Bolin *et al.*, 1992).

Esta signología se atribuye a trombocitopenia y alteración de la función plaquetaria. Se ha demostrado una disminución de la respuesta de las plaquetas a la agregación y, aunque se desconoce el mecanismo de estas alteraciones, es probable que el virus actúe por uno o más de estos mecanismos: 1) se ha detectado antígeno viral en los megacariocitos, lo que podría resultar en una menor producción de plaquetas y en un incremento en el porcentaje de plaquetas envejecidas (los trombocitos viejos son menos sensibles a los estímulos de agregación); 2) el virus se aísla de trombocitos y una interacción virus-plaqueta directa puede afectar la respuesta plaquetaria a la agregación; 3) aumento en la producción de sustancias inhibitoras de la agregación plaquetaria; bovinos infectados con el vDVB presentan altas concentraciones de prostaglandina E y óxido nítrico (Baker, 1987).

Hay una fuerte correlación entre la fase trombocitopénica y la viremia; además, la recuperación del recuento plaquetario está estrechamente relacionada con la aparición de anticuerpos neutralizantes. Esto sugiere que este síndrome es el resultado de una alteración y consumo de los trombocitos periféricos, más que una alteración en su producción (Hamers, 2000).

En USA y CANADÁ, se han reportado como severos, en estos casos se observa diarrea con sangre, epistaxis, congestión en conjuntiva y

mucosas, hemorragias petequiales y equimóticas en mucosas, los animales muestran pirexia, leucopenia, linfopenia y neutropenia. Este síndrome ha sido asociado con infecciones por cepas NCP del genotipo II (Ridpath *et al.*, 2010).

#### **2.7.5. Complejo Respiratorio**

El vDVB origina inmunodepresión sistémica y pulmonar, aumentando la patogenicidad de los restantes agentes respiratorios, según (Baker 1990), ciertos virus de la DVB actúan como agentes primarios de neumonías (Baule, 2000)

#### **2.7.6. Infección Venérea**

El semen del toro infectado durante la etapa fetal o de toros con infección aguda, contienen el vDVB, esto como consecuencia de la replicación del virus en la vesícula seminal y glándula prostática, este semen infectado posee espermatozoides de baja motilidad y con anomalías morfológicas, además es el medio ideal para transmitir el virus a vacas susceptibles (Kirkland *et al.*, 1994 y Bracamonte *et al.*, 2006).

#### **2.7.7. Infección en Hembras Gestantes**

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

a. Etapa embrionaria (0–45 días)

Las infecciones de hembras susceptibles próximas al momento del apareamiento ocasionan muerte embrionaria y repeticiones de servicio hasta que desarrollen respuesta inmune. Se desconoce cómo los biotipos NCP afectan al embrión. El virus no tiene efecto sobre el crecimiento y desarrollo de los embriones hasta el día 8–9, momento en que pierden la zona pelúcida y se vuelven susceptibles. El resultado de la infección puede ser citolítico o no. Ambos terminan en muerte embrionaria, aunque la infección no citolítica también puede causar daño cromosómico, resultando en el desarrollo de malformaciones. Por otra parte, la replicación del virus en células oviductales puede alterar sus funciones biológicas, como la secreción de factores embriotrópicos que soportan el desarrollo embrionario (McGowan *et al.*, 1993).

b. Día 45 a 125 de gestación

Este período comienza al finalizar la etapa embrionaria y culmina cuando el feto adquiere competencia inmunológica al vDVB. El momento exacto en que el feto adquiere competencia inmunológica al virus no es claro; se han detectado anticuerpos neutralizantes contra el virus en fetos infectados entre los días 100 y 135 de gestación. La infección con biotipos NCP antes que el feto adquiera competencia inmunológica, resulta en el nacimiento de animales persistentemente infectados e inmunotolerantes. Durante este período también se produce muerte fetal con momificación o aborto

meses después y un pequeño porcentaje de teratogénesis (Dubovi, 1994).

c. Día 125 a 175 de gestación

Este período representa el comienzo de la inmunocompetencia fetal y del estado de organogénesis, momento en el cual se presenta un gran porcentaje de alteraciones del desarrollo. También se pueden producir abortos, pero éstos son más frecuentes en las etapas tempranas de gestación. Se pueden observar distintos tipos y grados de malformaciones tales como hipoplasia cerebelar, microcefalia, hipomielogénesis, hidranencefalia, hidrocefalia, atrofia o hipoplasia de timo, cataratas, microftalmia, degeneración de retina, hipoplasia y neuritis del nervio óptico, alopecias, hipotricosis, hipoplasia pulmonar, braquignatismo, artrogriposis, retraso general del crecimiento y deformidades esqueléticas (Moennig *et al.*, 1995).

Posibles explicaciones de estas malformaciones serían el daño celular directo por el virus o la destrucción de las células infectadas por el sistema inmune fetal. Este hallazgo sugiere que el virus altera el metabolismo hormonal fetal originando trastornos del desarrollo esquelético (Moennig *et al.*, 1995)

d. De 175 días de gestación en adelante

En esta etapa el feto se encuentra en un período de crecimiento general y es inmunológicamente competente. Las infecciones en este período resultan en el nacimiento de terneros seropositivos

normales o débiles; mientras que los abortos son ocasionales (Moennig *et al.*, 1995).

### **2.7.8. Terneros persistentemente Recién Nacidos**

Los Fetos infectados con cepas NCP entre los días 42 y 125 pueden sobrevivir, portar el virus y diseminarlo de por vida, siendo los principales reservorios del VDVB. Estos animales son inmunotolerantes a la cepa NCP infectante, aunque pueden responder con producción de anticuerpos contra cepas heterólogas o cepas vacunales. Las infecciones que ocurren en el último trimestre de la gestación dan lugar a terneros con anticuerpos específicos, pero sin virus. El término “infectados congénitamente” se refiere a estos animales con anticuerpos al nacer, pero sin virus detectable (Fulton *et al.*, 2003).

### **2.7.9. Infección Persistente**

Un animal persistente infectado (PI) es aquel en que es posible aislar el virus de la sangre o tejido en dos ocasiones sucesivas con un intervalo no menor a dos semanas. Estos animales son virémicos durante toda su vida y no producen anticuerpos contra la cepa que les origino inmunotolerancia. La infección persistente debe ser considerada en todo ternero pequeño al nacimiento, con escaso desarrollo y ganancia de peso, débil y con cuadro recurrente de enfermedad respiratoria y digestiva (Raymond *et al.*, 2002).

Los animales PI resultan de la infección fetal con DVB durante el primer trimestre de gestación, dado que el sistema inmune fetal

infectado con DVB antes del día 125 de preñez, no reconoce el vDVB como agente infeccioso o extraño, además la mayor expansión de órganos linfoides fetales y sus poblaciones leucocitarias ocurre en el tercer trimestre de gestación (Raymond *et al.*, 2002).

Solo el biotipo NCP del vDVB ha sido reportado capaz de establecer una infección persistente en el feto, también se propuso que la capacidad del virus NCP y CP para establecer la infección persistente está relacionada con diferencias en la habilidad de inducir interferón, (IFN). Aunque se cree que la multiplicación considerable del virus genera diversidad, no se han detectado cambios genéticos en aislados en diferentes momentos del mismo animal (Raymond *et al.*, 2002).

## 2.8. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico, es realizado con la finalidad de detectar los bovinos persistentemente infectados, que son quienes diseminan la enfermedad. La idea que la DVB podría ser erradicada de la población bovina comercial descansa en los progresos que se han realizado durante los últimos años para detectar con seguridad la infección el vDVB en el ganado (Dubovi, 2013).

La biología molecular ha aportado el desarrollo de los anticuerpos monoclonales y la implementación de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa. Tres acciones son importantes para intentar el control: identificación y eliminación de animales persistentemente

infectados, aumentar la respuesta inmune post vacunación e implementación de medidas de bioseguridad (Duvobi, 2013).

### 2.8.1. Pruebas de diagnóstico

#### 2.8.1.1. Aislamiento viral

El Aislamiento viral para el vDVB se utiliza una línea celular de riñón fetal bovina (MDBK). Es importante esta tecnología porque además puede detectar otros virus presentes en la muestra, incluso revelar la presencia de virus DVB como contaminante del suero fetal bovino utilizando anticuerpos monoclonales (Duvobi, 1996).

#### 2.8.1.2. Inmunohistoquímica

La IHQ se realiza, rutinariamente, en tejido fijado en formalina y embebido en parafina; aventajando a otras técnicas en términos de conveniencia en la remisión de las muestras, posibilita el estudio retrospectivo de muestras enviadas para examen histopatológico y permite una precisa asociación entre el antígeno viral con tipos celulares y lesiones histológicas (Givens *et al.*, 2007).

#### 2.8.1.3. ELISA (Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)

La prueba de ELISA utiliza anticuerpos monoclonales o policlonales para “capturar” antígenos del vDVB en muestras de sangre. Comparado con el aislamiento viral, es un método rápido y económico, por lo tanto, es el método de preferencia para la detección a gran escala de animales PI. Los sistemas ELISA basados en anticuerpos policlonales dirigidos contra varias proteínas y glicoproteínas de cepas antigénicamente diferentes, son capaces de

detectar una amplia variedad de vDVB. Este sistema, comparado con el aislamiento viral, ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad (97,9% y 99,7% respectivamente) y es comparable a los sistemas ELISA que utilizan un pool de anticuerpos monoclonales. Por otra parte, los sistemas ELISA basados en un anticuerpo monoclonal epítipo específico son cuestionables, debido a que su estrecho rango de especificidad puede fallar en detectar algunas cepas del vDVB (Graham *et al.*, 1998).

#### a) ELISA Directo

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble (“tapizado”) de antígenos específicos.

Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.

- Adición de anticuerpos marcados (“conjugados”) con una enzima; si los anticuerpos reaccionan con los antígenos, el complejo quedará solubilizado. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un sustrato 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.

#### b) ELISA Indirecto

- 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.
- c) Sueroneutralización. En esta prueba los anticuerpos del suero neutralizan a un virus y cuando se inucula en cultivos celulares, animales u otros sistemas biológico indicador, no se multiplica. Se considera como prueba “estándar de oro” pues los anticuerpos neutralizantes son los más específicos contra un virus (Samuel, 2005).
- d) Inmunofluorescencia directa en tejido. Consiste esta técnica en la puesta en evidencia de antígenos virales en corte histológico de los órganos sospechosos mediante la tinción con un conjugado policlonal (contra todas las proteínas del virus, no permite la diferenciación entre

los pestivirus) o monoclonal (frente a la proteína gp 55, permite la diferenciación entre los diferentes pestivirus) marcado con fluorescencia o peroxidasa. La ventaja de esta técnica es su gran rapidez (dos a tres horas) y el inconveniente es que no se puede realizar en gran número de muestras. Su utilización está recomendada para diagnósticos rápidos en zonas ya infectadas o con altas sospechas de estar infectadas o cuando el número de muestras no sean muy elevadas (Samuel, 2005).

#### e) ELISA competitivo

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición en concentración conocida de una mezcla de antígenos del anticuerpo utilizado en el paso anterior, marcados con una enzima y antígenos desconocidos objeto de estudio. Paralelamente, añadir únicamente antígenos del anticuerpo usado en el paso anterior, marcados con una enzima. Lavar para eliminar los antígenos 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 de ambas pruebas y comparar los resultados. Si las lecturas de ambas pruebas son análogas, el antígeno a estudio no tienen nada que ver con los

anticuerpos empleados para tapizar el soporte. Si hay diferencia en las lecturas de ambos pocillos, el antígeno objeto de estudio, está relacionado serológicamente con el anticuerpo empleado para tapizar el soporte y la diferencia de densidad óptica, es proporcional a la concentración del antígeno problema en la muestra (Soluciones de ELISA Protocolo y Técnica, 2007).

#### **2.8.1.4. Pruebas de detección de ácidos nucleicos**

La utilidad de la amplificación de ácidos nucleicos ha sido facilitada por el rápido progreso en la secuenciación de ácidos nucleicos. La comercialización de la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa y su alta sensibilidad permite trabajar con “pooles” de muestras de rebaños para detectar animales infectados en forma aguda, animales persistentemente infectados y animales inmunizados con vacunas preparadas con virus vivo modificado. Cabe señalar que estas técnicas no están disponibles rutinariamente por su alto costo.

### **2.9. ERRADICACIÓN**

La erradicación de la DVB a nivel del rebaño es posible realizarlo mediante la mejora sustancial de salud y productividad. Las estrategias de erradicación dependen de la seroprevalencia, densidad poblacional y prácticas de manejo (Lertora, 2003).

Sin vacunación. En regiones donde la seroprevalencia y la densidad poblacional es baja y no se emplean vacunas, la erradicación se basa en: 1) identificación de los rebaños con infección activa; 2) eliminación de animales

PI del rebaño; 3) medidas de bioseguridad o mantener rebaños cerrados para evitar la infección de rebaños libres (Bistich y Ronsholt, 1995).

Con vacunación: en poblaciones bovinas con alta prevalencia de la enfermedad, donde no es posible mantener un rebaño cerrado o con estrictas medidas de bioseguridad, las estrategias de control deben de incluir: 1) identificación de rebaños con infección activa; 2) eliminación de animales PI y 3) programa de vacunación en vacas y vaquillas. La vacunación por sí sola no elimina el virus del rebaño y su finalidad es proveer protección contra infecciones transplacentarias que den origen a terneros PI (Brownlie *et al.*, 2000).

## **2.10. OTROS ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE PREVALENCIA DE LA DIARREA VIRAL BOVINA**

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 varía entre 43 % y 79 % de bovinos seropositivos (Houe *et al.*, 1995).

Por otra parte, se determinó la prevalencia del virus de la diarrea viral bovina en muestras de leche de bovinos de las tres provincias ubicadas en el valle del Mantaro, Junín. Con este propósito se colectaron muestras de leche (228) y sangre (n= 65) de vacas en producción de 18 hatos lecheros para la detección de anticuerpos contra el vDVB mediante una prueba de Elisa indirecta y virus neutralización. El 72.4% (165/228) de los animales muestreados presentaron anticuerpos contra el virus en leche. La prevalencia del vDVB fue mayor en los animales de la provincia de

Concepción (86.3%), seguido por Jauja (83.3%) y Huancayo (41.3%). El virus de la DVB fue detectado en todos los hatos muestreados confirmándose la amplia difusión del virus en la población bovina del valle del Mantaro (Contreras et al., 2000) y en el Valle de Lima determinaron la prevalencia de vBVD en animales productores de leche, bajo crianza intensiva fue de 56.0% en 12 hatos según el reporte de (Aguilar *et al.*, 2006)

Estudios realizados en Arequipa por LABVETSUR a animales clínicamente sanos demuestran que el 65% de las vacas son positivas al vDVB. La infección del vDVB puede afectar a sistemas como: sistema respiratorio, sistema digestivo, sistema cardiaco, sistema renal, y sistema reproductivo en este último, produce infertilidad, abortos y defectos neonatales (Manrique y Terán, 2002) y para la provincia de Arequipa mostro una prevalencia de 80.2% según el reporte (Jayashi *et al.*, 2005).

En la cuenca lechera del distrito de Moquegua en el año 2014 reporto la seroprevalencia de la diarrea viral bovina fue de 29.63%, (24/81), reflejando la existencia de la difusión y transmisión del virus en la cuenca. Según edad en animales menores a dos años (9.68%) fue menor comparado a los mayores de dos años (42%) ( $p \leq 0.01$ ), en machos (25%) y hembras (29.87%) mostro similaridad ( $P \geq 0.05$ ). La seropositividad al vDVB no está asociado al sexo de los bovinos. En estado reproductivo en vacas gestantes (33.33%) y en vacas vacías (45.54%) no mostro diferencias ( $P \geq 0.05$ ) (Suni, 2014).

En la provincia de melgar en el año 2006 la seroprevalencia general del virus de la diarrea viral bovina fue de 47% (176/377). Los vacunos mayores de dos años presentaron la mayor prevalencia (53,6%), respecto a los menores de dos años (36,6%), y según sexo, los bovinos hembras presentaron la mayor prevalencia (48.9%) respecto a los machos (29.5%) (Quispe, 2008).

En la comunidad de huancollusco distrito de Taraco Puno en el año 2014 la seroprevalencia al virus de la diarrea viral bovina, del cual se obtuvo que 35 animales resultaron ser positivos al vDVB, que representa 40.23% (Machaca, 2014)

En el fundo Cauranhuyo del Distrito de HUACULLANI de la Provincia de CHUCUITO en el año 2016. Donde se obtuvo una seroprevalencia general al virus de la diarrea viral bovina de 23.91%, para la variable edad se obtuvo el 12.50% para los animales jóvenes y el 27.94% para los animales adultos; referente a la condición de gestación, se obtuvo el 21.74% para los animales gestantes y el 24.64% para los no gestantes (vacías) sin que muestren diferencia significativa ( $P \geq 0.05$ ) (Ramos, 2016).

En la estación experimental ILLPA INIA PUNO en el año 2006 se ha evidenciado la presencia de anticuerpos del virus de la diarrea viral bovina en vacunos, siendo la seroprevalencia total del virus de 25.35+/- 0.05%. Respecto al sexo, en machos fue de: 14.29% y de 30% en hembras, respectivamente existiendo diferencia estadística ( $P \leq 0.01$ ), determinando así la presencia vDVB entre machos y hembras, y según edad en los

animales adultos fue de: 33.33% y en animales jóvenes de 18.42 %. No existió una diferencia estadística entre edades ( $P>0.05$ ) (Quiñones, 2006).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El presente estudio de investigación se realizó con muestras de sangre de vacunos procedentes de la cuenca lechera del Distrito de Vilque ubicado aproximadamente a 30 Km de la ciudad de Puno, a una altura de 3.860 m.s.n.m. y en las coordenadas 15°45'58"S 70°15'40"O (SENAMHI 2012).

Los análisis de muestras se realizaron en el laboratorio de salud animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia con sede en el CIP CHUQUIBAMBILLA de la Universidad Nacional del Altiplano, ubicado en la Provincia de Melgar, situado a una altitud de 3970 m.s.n.m.

##### a) De los animales

Los animales para el estudio fueron 90 vacunos de la raza Brown Swiss y la toma de muestras fue en forma aleatoria simple, los cuales fueron agrupados por sexo, (machos y hembras menores a 2 años), edad (< a 2 años y > a 2 años), estado reproductivo (preñada y no preñada) y estado productivo (secas y en producción). Distribuidos de la siguiente manera:

**Tabla 01:** distribución de animales.

Sexo	Hembra	Macho	Hembra Mayor (>) a 2 años			
Edad	Menor (< a 2 años	Menor (< a 2 años	(>) a 2 años	(>) a 2 años	(>) a 2 años	(>) a 2 años
Estado Reproductivo	Vacía	Reproductor y/o engorde	vacía sin producción	Vacía en producción	Preñad sin producción	Preñada en producción
N° Animales	<b>17</b>	<b>11</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>18</b>
Sub total	<b>28</b>		<b>62</b>			
Total	<b>90</b>					

### 3.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

#### 3.2.1. Materiales para la toma de muestras sanguíneas

- Agujas vacutainer N° 20G. x 1½ pulgadas.
- Frascos colectores de Plasma sanguíneo (viales criogénicos) x 2mL
- Tubos vacutainer de 10ml.
- Algodón.
- Alcohol yodado al 3%
- Lapiceros de tinta indeleble.
- Pipetas automáticas o manuales.
- Guantes de exploración.

#### 3.2.2. Materiales para el envío de muestras

- Cajas térmicas (tecnopor).
- Geles.
- Plástico y papel.

#### 3.2.3. Otros Materiales

- Jabón carbólico.
- Cámara fotográfica.
- Medios audiovisuales.
- Sogas.
- Mocheta.
- Formatos.

#### 3.2.4. Materiales para la prueba de ELISA.

#### 3.2.4.1. Reactivos.

- 1.- Placa tapizado con antígeno de Diarrea Viral Bovina.
  - 2.- Control negativo (Negative control ELISA (bovine) x 1MI)
  - 3.- Control positivo (positive control ELISA (bovine) x 1MI)
  - 4.- Conjugado.
  - 5.- Diluyente de la muestra.
- A Substrato TMB n.º 12.
- B Solución de frenado n.º 3
- C Solución de lavado concentrada (10X).

#### 3.2.5. Equipos

- Estufa incubadora a 37°C
- Balanza analítica
- Refrigeradora convencional
- Congeladora a -20°C
- Potenciómetro.
- Cronómetro de tiempo.
- Lector de ELISA
- Vortex
- Micro pipeta canal simple 20 a 200 µl.
- Micro pipeta canal simple 100 a 1000 µl.

- Micro pipetas multicanal 50 a 300 ul.

### 3.3 METODOLOGIA

#### 3.3.1. Tamaño de muestra

Se determinó mediante el método de muestreo al azar simple, tomando como referencia para el cálculo una prevalencia de 0.38% (Cabellos, 20014) con un nivel de confianza de 95 % y un error de precisión de 10%, mediante la siguiente fórmula (Miranda, 1987).

$$n = \frac{z^2(p)(q)}{d^2}$$

n = Número de animales (muestra)

Z<sup>2</sup> = Valor de Z al 95 % de confiabilidad

p = Proporción de la población objeto de estudio, prevaecía

q = Complemento = 1 - p

d<sup>2</sup> = Grado de precisión del muestreo al 95%

n = (1.96)<sup>2</sup> (0.38x0.62) / (0.1)<sup>2</sup> = 90 vacas

#### 3.3.2. Toma de muestra de plasma sanguíneo

Las muestras de sangre fueron colectadas a nivel de la vena yugular directamente al vacuteiner sin anticoagulante entre 5 a 7 ml, previa desinfección del lugar de extracción con alcohol yodado, Luego se procedió a rotular las muestras sanguíneas para su conservación, los

tubos son colocados en posición inclinada a temperatura ambiente durante veinte minutos, estas se transportaron al laboratorio y por lo que fue centrifugado, posteriormente los sueros sanguíneos se aislaron en viales que fueron debidamente etiquetadas y se mantuvieron en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , posteriormente las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Salud Animal de la F.M.V.Z. con sede en C.E. Chuquibambilla, UNA-PUNO. Durante el muestreo se registró los datos del productor y del animal (edad, sexo, estado reproductivo y productivo).

### **3.3.3. Detección, de anticuerpos específicos contra la proteína p80 del vDVB, mediante ELISA de bloqueo**

#### **a. Preparación de reactivos.**

Se equilibra los reactivos a temperatura ambiente antes de comenzar el procedimiento del ensayo. Solución de Lavado (10x) (vial N° 0): para reconstituirla se añade 1 volumen de Solución de Lavado (10x) a 9 volúmenes de agua destilada o desionizada. La solución diluida puede ser almacenada hasta 3 días a temperatura ambiente ( $+20^{\circ}\text{C}$  -  $+25^{\circ}\text{C}$ ).

#### **b. Preparación de las muestras.**

Tanto los Controles Positivo y Negativo Suero (viales N° 5 y N° 6) como las muestras de suero individual deben diluirse 1/10 en Solución Diluyente de Sueros (vial N° 1).

#### **c. Desarrollo del ensayo.**

- Se deja a que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente y se asegura que estén bien mezclados realizando una inversión suave del frasco.

- Se preparó una hoja de datos para identificar los pocillos individuales para cada muestra y control. Los Controles positivo y negativo se analizaron por duplicado.
- a) Se despega la cubierta adhesiva de plástico y se procedió a añadir:  
Suero: Del cual se dispensa 100µL tanto de los controles Positivo, Negativo y los Sueros de las muestras diluidas 1/10 en Solución diluyente de Sueros (vial N° 1) a los pocillos apropiados de la placa.
- b) Se cubre la placa con una cubierta adhesiva y se deja incubar:  
  
Protocolo corto: 60 minutos a + 36 °C - + 38 °C.
- c) Se retira el adhesivo y se realiza 4 lavados a cada pocillo con 300µL de Solución de Lavado diluida. Al final, se invierte la placa y golpea firmemente sobre papel absorbente.
- d) Se añade 100µL de solución de Conjugado (vial N° 2) a cada pocillo.
- e) Se cubre la placa con una cubierta adhesiva y se deja incubar por 60 minutos a +36 °C - +38 °C. 936
- f) Se retira el adhesivo y se realiza 4 lavados a cada pocillo con 300µL de solución de lavado diluida. Al final se invierte la placa y golpea firmemente sobre papel absorbente.
- g) Se dispensa en cada pocillo 100µL de Solución de Sustrato (vial N° 3). Se agitar suavemente la placa durante 2 segundos.
- h) Se sella la placa con una tapa adhesiva y se deja incubar a temperatura ambiente (+20 °C - +25°C) en la oscuridad durante 10 minutos.
- i) Se quita la tapa adhesiva y se dispensa en cada pocillo 100µL de Solución de Paro (vial N° 4). Se agita golpeando ligeramente el flanco de la microplaca.

j) Se limpiar la superficie inferior de la placa con un papel absorbente.

Se realiza la lectura de la placa utilizando el lector de ELISA equipado con un filtro de 450nm. Y finalmente se registra los resultados.

d. Validación del ensayo.

El test es válido si la Densidad Óptica 450 (DO) 450 media del Control Negativo es >0,65 y el control Positivo presenta un %IN >60%. 954

e. Interpretación del ensayo.

Para la interpretación de los resultados es preciso transformar las DO 450 en Porcentajes de Inhibición (%IN) utilizando la siguiente formula (en ella se utiliza la media de DO 450 obtenida en las 2 réplicas del control negativo):

$$\%IN = \left( \frac{\text{Media DO450 control Negativo} - \text{DO450 Muestra}}{\text{Media DO450 Control Negativo}} \right) \times 100$$

f. Interpretación de resultados de suero para vDVB.

VALOR %IN	ESTADO INMUNE FRENTE A vBVD
Inferior a 40	<b>POSITIVO</b>
Mayor o igual a 40 e inferior a 50	<b>DUDOSO</b>
Superior o igual a 50	<b>NEGATIVA</b>

### 3.4. ANÁLISIS DE DATOS

#### a. Estimación de la seroprevalencia

La seroprevalencia del virus de la Diarrea Viral Bovina, se determinó mediante la siguiente fórmula (thursfield, 1990).

$$\% \text{ Prevalencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Muestras Positivas}}{\text{N}^\circ \text{ Total de Muestreo}} \times 100$$

#### b. Método estadístico

Los datos cualitativos fueron procesados y analizados mediante la prueba de Chi Cuadrada considerando las variables como sexo, edad, estado productivo y estado reproductivo de los vacunos; mediante el software IBM SPSS Statistics 22., para lo cual se utilizaron la siguiente fórmula:

$$X_c^2 = \frac{\sum(O_i - E_j)^2}{E_j}$$

Dónde:

$X_c^2$  = Ji - Cuadrado calculado.

$O_i$  = Valores observados de la diarrea viral bovina

$E_j$  = Valores esperados de la diarrea viral bovina.

$\Sigma$  = Sumatoria = Valor calculado de ji-cuadrado.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Seroprevalencia general al virus de la DVB en vacunos Brown Swiss del  
Distrito de VILQUE - PUNO**

**Tabla 02:** Seroprevalencia general al vDVB en vacunos de la raza Brown Swiss en el Distrito de VILQUE – PUNO.

ESPECIE	N° DE ANIMALES EVALUADOS	N° DE ANIMALES SEROPOSITIVOS	SEROPREVALENCIA %
Vacuno	90	59	65.56

**Fuente:** julio huaylla.

En la Tabla 02, muestra los valores para la seroprevalencia general a los anticuerpos al virus de la Diarrea Viral Bovina en vacunos Brown Swiss del Distrito de VILQUE-PUNO, efectuado mediante la prueba de ELISA, del cual se obtuvo que 59 animales resultaron ser positivos al vDVB, que representa una seroprevalencia de 65.56%, datos obtenidos del total de 90 animales muestreados.

Haciendo una comparación de estudios sobre las seroprevalencias para el vDVB, este virus es considerado endémico en muchos países, como Houe (1995), la prevalencia entre regiones pueden alcanzar niveles entre 43% y 79% de bovinos seropositivos, Rivera (2008) en los países vecinos como: Argentina, Brasil, Chile y Colombia se reportan prevalencias con variaciones entre regiones, pero con tasas superiores al 70%, a diferencia que en el distrito de Vilque – Puno se encontró la seroprevalencia de 65.56%, dato inferior a los reportes de otros países, probablemente se deba al sitio de crianza y sistemas

de producción que es intensivo en los países vecinos, por eso la mayor proliferación del vDVB.

Cabe destacar que en el Perú se tienen datos de seroprevalencia, para vacunos del valle del Mantaro-Junín de 72.4% de seroprevalencia reportados por Contreras *et al*, (2000), y para la provincia de Arequipa mostro una prevalencia de 80.2% según el reporte de Jayashi *et al.*, (2005), que estos reportes son superiores a los encontrados en el distrito de Vilque – Puno, eso se debe a condiciones climáticas y sistema de crianza; y estudios realizados en Arequipa por LABVETSUR a animales clínicamente sanos demuestran que el 65% de las vacas son positivas al vDVB según el reporte de Manrique y Terán, (2002), que son similares a los encontrados en el distrito de Vilque – Puno. Estas similitudes probablemente se pueden atribuir a que en la zona de estudio existe la adquisición de ganado bovino, especialmente de la zona de Arequipa sin control sanitario, además en la zona de estudio no existen sistemas de bioseguridad, ni se realiza vacunación contra el vDVB; y para la cuenca lechera del Distrito de Moquegua en el año 2014 la seroprevalencia fue 29.63% según el reporte de Suni, (2014) que es inferior a lo encontrado en el presente estudio en el distrito de Vilque.

Referente a las seroprevalencias para la región Puno se tiene; 47% para vacunos en la provincia de Melgar según el reporte de Quispe, (2008), para la comunidad de Huancollusco Distrito de Taraco mostro una prevalencia de 40.23% según el reporte de Machaca, (2014), En el fundo Cauranhuyo del Distrito de Huacullani – CHUCUITO de 23.91% Ramos, (2016) y en la estación experimental ILLPA INIA PUNO de 25.35% Quiñones, (2006), que estos

resultados son inferiores a los encontrados en el presente estudio en el distrito de Vilque, esto se debe a la falta de control, la existencia de animales portadores del vDVB y el tránsito sin restricción del ganado vacuno que justifica la diseminación e incremento del virus en la región y el país.

#### 4.1. Seroprevalencia del virus de la DVB en vacunos Brown Swiss del distrito de VILQUE – PUNO, Según sexo

**Tabla 03:** Seroprevalencia de anticuerpos al vDVB en vacunos de la raza Brown Swiss en el distrito de VILQUE – PUNO, según sexo (menores a 2 años).

VARIABLE DE ESTUDIO	N° ANIMALES EVALUADOS	ANTICUERPOS CONTRA vDVB	
		N° ANIMALES SEROPOSITIVOS	SEROPREVALENCIA %
<b>Macho</b>	11	5	45.45
<b>Hembras</b>	17	9	52.94

Fuente: julio huaylla.

( $P \geq 0.05$ ) no significativo.

En la Tabla 03, se observa la seroprevalencia del virus de la Diarrea Viral Bovina en vacunos Brown Swiss del Distrito de VILQUE-PUNO, por sexo; donde los machos reflejaron 45.45% y en hembras 52.94%; valores sometidos a la prueba estadística de Chi -cuadrado los cuales no mostraron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ). Lo cual nos indica que este agente patógeno constituye una de las causas más importantes de las fallas reproductivas y se observa una leve superioridad en hembras porque están en constante contacto con sus madres en el hato a comparación de los machos que están aislados del establo.

Haciendo una comparación de estudios sobre las seroprevalencias para el vDVB, en el Distrito de Moquegua en el año 2014 la seroprevalencia de (25%) machos y (29.87%) hembras según el reporte de Suni, (2014), en la provincia de Melgar en el año 2006 la seroprevalencia en bovinos hembras presentaron la mayor prevalencia (48.9%) respecto a los machos (29.5%) según el reporte de Quispe, (2008) y en la estación experimental ILLPA INIA PUNO en machos fue de (14.29%) y de (30%) en hembras según el reporte de Quiñones, (2006), que estos valores son inferiores a los encontrados en el presente estudio en el Distrito de VILQUE, lo cual nos indica que este agente patógeno constituye una de las causas más importantes de las fallas reproductivas y se observa el incremento año tras año. Además, estas diferencias pueden deberse a que en la zona estudiada, existe una tendencia de preferencia a usar la monta natural en muchos sectores del distrito de Vilque, a diferencia que existe una creciente tendencia a usar inseminación artificial con registro sanitario para la reproducción del ganado bovino lechero y esto debido a los continuos proyectos pecuarios ejecutados por las municipalidades distritales de Moquegua, Melgar y en la estación experimental ILLPA INIA.

#### 4.2. Seroprevalencia al virus de la DVB en vacunos Brown Swiss del distrito de VILQUE – PUNO, Según edad

**Tabla 04:** Seroprevalencia de anticuerpos del vDVB en vacas Brown Swiss en el distrito de VILQUE – PUNO, según edad.

VARIABLE DE ESTUDIO	N° ANIMALES EVALUADOS	ANTICUERPOS CONTRA vDVB	
		N° ANIMALES SEROPOSITIVOS	SEROPREVALENCIA %
Menores a 2 años	28	14	50.00
Mayores a 2 años	62	45	72.58

Fuente: julio huaylla

( $P \leq 0.05$ ) significativo

En la Tabla 04, se observa la seroprevalencia al virus de la Diarrea Viral Bovina en vacunos Brown Swiss del Distrito de Vilque-PUNO, por edad; donde los menores a 2 años reflejaron 50% y mayores a 2 años 72.58%; los cuales mostraron diferencias significativas, lo cual nos indica que esta diferencia existe debido a que los animales mayores a 2 años están mayor tiempo de su vida expuestos a la infección pestiviral, ya que han sido constantemente manipuladas durante el manejo productivo y reproductivo en el hato a comparación de los menores de 2 años.

Haciendo una comparación de estudios sobre las seroprevalencias para el vDVB, en el Distrito de Moquegua en el año 2014 la seroprevalencia en animales menores a dos años (9.68%) fue menor comparado a los mayores de dos años (42%) según el reporte de Suni, (2014), en la provincia de Melgar en el año 2006 la seroprevalencia al vDVB en bovinos mayores de dos años presentaron la mayor prevalencia (53,6%), respecto a los menores de dos

años (36,6%) según el reporte de Quispe, (2008), en el fundo Cauranhuyo del Distrito de Huacullani para los animales jóvenes fue de (12.50%) y el (27.94%) para los animales adultos según el reporte de Ramos, (2016) y en la estación experimental ILLPA INIA PUNO en los animales adultos fue de (33.33%) y en animales jóvenes de (18.42%) según el reporte de Quiñones, (2006), que estos reportes son inferiores a los encontrados en el presente estudio del distrito de Vilque, lo cual nos indica que esta diferencia en hatos estudiados es bajo la seroprevalencia debido a varios factores probables como su eliminación temprana de animales enfermos del hato y un manejo responsable de reproductores, mientras que en muchos sectores del distrito de VILQUE la adquisición de reproductores y pajillas sin descartar del vDVB.

#### 4.3. Seroprevalencia al virus de la DVB en vacunos Brown Swiss del distrito de Vilque – Puno, Estado reproductivo

**Tabla 05:** Seroprevalencia de anticuerpos al vDVB en vacas Brown Swiss en el distrito de VILQUE – PUNO, según estado reproductivo (preñadas secas y en producción).

VARIABLE DE ESTUDIO	N° ANIMALES EVALUADOS	ANTICUERPOS CONTRA vDVB	
		N° ANIMALES SEROPOSITIVOS	SEROPREVALENCIA %
Preñadas secas	14	9	64.29
Preñadas en producción	18	15	83.33

Fuente: julio huaylla

( $P \geq 0.05$ ) no significativo.

En la Tabla 05, se evidencia la seroprevalencia del virus de la Diarrea Viral Bovina en vacunos Brown Swiss del Distrito de Vilque-Puno, según estado

reproductivo; en el cual se determinó 64.29% para las vacas preñadas en seca y 83.33% para las vacas preñadas en producción; los cuales no mostraron diferencias significativas. Esta semejanza se deba posiblemente a que tienen el mismo sistema de manejo sometido por los criadores en un hato ganadero por lo que ambos tienen el mismo factor de riesgo de contraer la infección.

Haciendo una comparación de estudios sobre las seroprevalencias para el vDVB, en el Distrito de Moquegua en el año 2014 la seroprevalencia en animales en estado reproductivo en vacas gestantes (33.33%) según el reporte de Suni, (2014) y en el fundo Cauranhuyo del Distrito de HUACULLANI para los animales en condición de gestación, se obtuvo el (21.74%) según el reporte de Ramos, (2016), que estos valores son inferiores a los encontrados en el presente estudio en el distrito de Vilque. Este último se deba posiblemente a que en Moquegua cuentan con programas de vacunación, debido a que se dedican a la crianza de vacunos de leche en forma comercial y un mejor control de reproductores, mientras que en muchos sectores del distrito de Vilque la posible adquisición de toros reproductores sin control sanitario y positivos al vDVB.

#### 4.4. Seroprevalencia del virus de la DVB en vacunos Brown Swiss del distrito de Vilque – Puno, Estado productivo

**Tabla 06:** Seroprevalencia de anticuerpos al vDVB en vacas Brown Swiss del distrito de VILQUE – PUNO, según estado productivo (vacías secas y en producción).

VARIABLE DE ESTUDIO	N° ANIMALES EVALUADOS	ANTICUERPOS CONTRA VDVB	
		N° ANIMALES SEROPOSITIVOS	SEROPREVALENCIA %
Vacías en Producción	16	13	81.25
Vacías Secas	14	8	57.14

Fuente: julio huaylla

( $P \geq 0.05$ ) no significativo.

En la Tabla 06, se evidencia la seroprevalencia del virus de la Diarrea Viral Bovina en vacunos Brown Swiss del distrito de Vilque-Puno, según estado productivo; en el cual se determinó 81.25% para vacas vacías en lactación y 57.14% para vacas vacías en seca; los cuales no mostraron diferencias significativas. Esta semejanza se deba posiblemente a que tienen el mismo manejo en un hato ganadero por lo que ambos tienen el mismo factor de riesgo de contraer la enfermedad, y una leve inferioridad porcentual en vacas vacías secas esto se deba posiblemente a la eliminación de vacas con infecciones persistentes del hato por que causan gastos en el tratamiento.

Haciendo una comparación de estudios sobre las seroprevalencias para el vDVB, en el Distrito de Moquegua en el año 2014 reporto la seroprevalencia en animales en estado productivo en vacas vacías (45.54%) según el reporte de Suni, (2014), en el fundo Cauranhuyo del Distrito de Huacullani, se obtuvo

el (24.64%) para los no gestantes (vacías) según el reporte de Ramos, (2016), en el Valle de LIMA determinaron la prevalencia del vDVB en animales productores de leche, bajo crianza intensiva fue de (56%) en 12 hatos según el reporte de Aguilar, Renzo, Alfredo, Rivera y Hermelinda, (2006) que estos valores son inferiores a los encontrados en el presente estudio en el Distrito de Vilque. este último se deba posiblemente a que en Lima cuentan con programas de vacunación, debido a que se dedican a la crianza de vacunos de leche en forma comercial y a la eliminación de vacas con problemas reproductivos que causan gastos económicos extras, lo que en el distrito de VILQUE aún falta la implementación de programas de vacunación y tienen una crianza extensiva o semiextensiva en donde no existe el cuidado adecuado de los mismos, con un pequeño capital de explotación, normalmente con áreas reducidas de recursos forrajeros y siguen manteniendo a vacas con problemas reproductivos por su producción de leche en el hato.

## V. CONCLUSIONES

La seroprevalencia del virus de la Diarrea Viral Bovina en vacunos Brown Swiss del Distrito de Vilque-Puno, según sexo; en machos fue de 45.45% y en hembras 52.94%, los cuales no mostraron diferencias significativas.

La seroprevalencia del virus de la Diarrea Viral Bovina en vacunos Brown Swiss del Distrito de Vilque-Puno, según edad; en donde los menores de 2 años reflejaron 50% y en mayores de 2 años es de 72.58%, Los cuales mostraron diferencias significativas.

La seroprevalencia del virus de la Diarrea Viral Bovina en vacunos Brown Swiss del Distrito de Vilque-Puno, según estado reproductivo; fue de 64.29% para las vacas preñadas en seca y 83.33% para las vacas preñadas en producción, los cuales no mostraron diferencias significativas.

La seroprevalencia del virus de la Diarrea Viral Bovina en vacunos Brown Swiss del Distrito de Vilque-Puno, según estado productivo; fue de 81.25% para vacas en lactación y 57.14% para las vacas en seca, los cuales no mostraron diferencias significativas.

## VI. RECOMENDACIONES

Se debe realizar más estudios sobre el virus de la DVB utilizando técnicas de laboratorio que permitan detectar al virus en situ.

Se recomienda intervención sanitaria por parte de los organismos encargados de velar por la salud animal, sobre los focos infecciosos en el Distrito de VILQUE y la Región Puno.

Promover capacitaciones periódicas por el SENASA y por el CMVP para los ganaderos de los sectores afectados, para que conozcan sobre el serio problema que causa a los hatos bovinos.

Realizar un calendario de vacunación para prevenir y combatir esta enfermedad conjuntamente con los ganaderos.

## VII. REFERENCIAS

- Álvarez, 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* pág. 46-51.
- Alvarez S.; H. Rivera; D. Peso (2000). Detección de anticuerpos contra pestivirus en rumiantes de una comunidad campesina de la provincia de canchis-cusco. *Rev. Inv. Vet peru*, 13(1), 46-51.
- Aguilar, S.; B. Renzo; Y. Alfredo; G. Rivera & Hermelinda. (Dic 2006). Seroprevalencia del virus de la Diarrea Viral Bovina en el ganado lechero de crianza intensiva del valle de lima. *Rev. Investig. Vet Perú*, Vol17, No.2, P. 148-153. issn 1609-9117.
- Aguilar R.; A. Benito y H. Rivera (2006). Seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en ganado lechero de crianza intensiva del valle de Lima. *RevInvVet Perú* 17(2): pág. 148–153.
- Baker, J.C. (1990). Clinical aspects of bovine virus diarrhoea, virus infection, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9: pág. 25-41.
- Baker, J.C. (1987). Bovine viral diarrhoea virus: A review, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190: 1449-1458.
- Betancur H.; LM. Gogorza Y FG. Martinez (2007) Serepidemiología de la Diarrea Viral ovina en Monteria (Córdoba Colombia)
- Bitsch V y L. Ronsholt (1995). Control of bovine viral diarrhoea virus without vaccines. *Food anim. Pract.* 11: 627-640.
- Bielefeldt Ohmann H. (1995). The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection. *Food Anim. Pract.* 11: pág.447–476.
- Bolin, S.R., J.F. Ridpath. (1992). Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves, *Am. J. Vet. Res.* 53: pág. 2157-2163.

- Bolin, S R., D. L. Grooms. (2004). Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. *Vet. Clin. Food. Anim.* Pág. 51-68.
- Bracamonte, M., Obando, C. Y Plaza, (2006). Diarrea viral bovina. Como afecta a los animales. INIA. Divulga. Centro Nacional de Investigación de investigaciones Ag opecuarias. pág. 1-22.
- Brownlie, J., I. Thompson, A. Curwen. (2000). Bovine virus diarrhoea virus strategic decision for diagnosis and control. *In Practice* vol. 22, pág. 176-187.
- Childs T. (1946). X disease in cattle. *Can J Comp Med* 10: pág. 316319.
- Contreras, G.; K. SAHL; C. Arana & H. Rivera, (2000). Anticuerpos contra el virus de la Diarrea Viral Bovina en muestras de leche de bovinos del valle del Mantaro (Jauja, Concepcion y Huancayo). *Rev. Inv. Peru* Vol 11:1.
- David GP Y Crawshaw TR, Gunning RF, Hibberd RC, Lloyd GM, Marsh PR. (1994). Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with DVB virus infection. *Vet. Rec.* 134: 468-472.
- Donis RO. (1995). Molecular biology of bivariate viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Food Anim. Pract.* 11:393-423.
- Donis Liang, D.; I. Sainz; I. Ansari; L. GIL; V. Vassilev; R. (2003). The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. *J Gen Virol.* 84: pág. 1269–1274.
- Donis, R.; E. Dubovi (1987). Glycoproteins of bovine viral diarrhoea virus in infected bovine cells. *Journal of General Virology.* 68: pág. 1607-1616.
- Dourojeanni, Alex. (1994). “políticas públicas para el desarrollo sustentable: la gestión integrada de cuencas”
- Dubovi E. J. (2013). Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals* 41: pág. 8 – 13.

- Dubovi. E (1986). Fatal BVD virus-induced disease: role of persistently infected animals. *The Bovine Procedure*, pág. 18
- Dubovi EJ. (1994). Impact of bovine viral diarrhoea virus on reproductive performance in cattle. *Food Anim. Pract.* 10: pág. 503–514.
- Dubovi EJ. (1996). Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet. Med.* 91: pág. 867–872
- Fray MD; DJ. Paton; S. Alenius (2000). The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: pág. 62-615.
- Fulton, R.; J. Ridpath; A. Confer; J. Saliki; L. Burge; M. Payton (2003). Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals.* 31: pág. 89–95.
- Goyal SM; JF. Ridpath (2005). *Bovine Viral Diarrhoea Virus. Diagnosis, Management, and Control.* Blackwell Publishing – USA, pág. 260.
- Givens M Daniel; R. Harland; V. Brock Kenny (2007) Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus can persist in testicular tissue after vaccination of peripubertal bulls but prevents subsequent infection. *Vaccine* 25. Pág. 867-876.
- Graham DA; IE. McLaren; A. German (1998). Evaluation of the suitability of a commercial bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA for diagnostic testing. *Vet. J.* 157: pág. 149–15.
- Guarino H, A. Núñez, M.V. Repiso, A. GIL AND D.A. Dargatz. (2008). Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev Vet Med*, 15; 85 (1-2):34-40.
- Hamers C; B. Couvreur; P. Dehan; C. Letellier; P. Lewalle; P. Pastoret; P. Kerkhofs (2000). Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea virus strains isolated from hemorrhagic syndromes. *Vet. J.* 160: pág. 250–258.

- Heinz, F.; M. Collet; R. Purcell; E. Gould; C. Howard; M. Houghton, R. Moormann; C. RICE; H. Thiel (2000). Family Flaviviridae. In: Van Regenmortel, M.; Fauquet, C.; Bishop, D.; Carstens, E.; Estes, M.; Lemon, S.; Maniloff, J.; Mayo, M.; McGeoch, D.; Pringle, C.; Wickner, R. (Eds). Virus Taxonomy; classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London, England. Academic Press. Pág. 859–879.
- Hilbe M., H. Stalder, E. Peterhans, M. Haessig, M. Nussbaumer, C. EGLI, Schelp, K. Zlinszky AND F. Ehrensperger (2007). Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. J Vet Diagn. Invest. 19:28-34.
- Huamán JC.; H. Rivera; R. Araínga; C. Gavidia; A. Manchego (2007). Diarrea viral bovina y animales portadores del virus en hatos productores de leche de la irrigación de Majes, Arequipa. Rev Inv Vet, Perú 18: 141-149.
- Houe H. (1995). Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. Food Anim. Pract. 11: pág. 521–547.
- Houe H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. Vet. Microbiol. 64: 89–107.
- Houe, H. (2003). Economic impact of BVDV infection in dairies. Edit. Biologicals 31, pág. 137-143.
- INEI. (2012). IV CENAGRO. 2013. Resultados finales Del IV Censo Nacional Agropecuario. INEI Lima Peru ([www.inei.gov.pe](http://www.inei.gov.pe)).
- Jayashi C.; C. Gavidia; M. Araínga; A Manchego Y H. Rivera (2005). Dinámica de seroconversion en hembras bovinas post eliminación de animales portadores del virus de la DVB. Rev. Inv. Vet. Perú. 16(1): 56-64.
- Krey, T.; H. Thiel; T. Rumenapf (2005). Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry. J Virol. 79: pág. 4191–4200.

- Lértora W.J. (2002) Inmunohistoquímicas en biopsias de piel y bulbos pilosos para el diagnóstico de bovinos persistentemente infectados con el virus diarrea viral bovina. Tesis de Maestría. Universidad Austral de Chile. Valdivia Chile. Pág. 61-90.
- Lambeth Lukes; J. Moore Robert; S. Muralitharan Morley; J. Doran Timothy (2007). Suppression of bovine viral diarrhoea virus replication by small interfering RNA and short hairpin RNA mediated RNA interference Veterinary Microbiology 119: pág. 132134.
- Lavanda Jorge, (2015). Tesis Prevalencia de Diarrea Viral Bovina en Vacas Lecheras de las Ganaderías del Cantón Loja.
- Lértora W.J. (2003). Diarrea viral Bovina: Actualización. Cátedra de Patología General y Sistemática, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE Argentina. 1: pág. 42-51.
- Lecot, S.; S. Belouzard; J. Dubuisson; Y. Rouille (2005). Bovine viral diarrhoea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. J Virol. 79: pág. 10826–10829.
- Lindenbach, B.; Thiel, H.; Rice, C. (2007). Flaviviridae: The Virus and their Replication. In: Knipe, D.; Howley.; P. Fields Virology. 5<sup>th</sup> Edition. Philadelphia, USA. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins (Ed). Pág. 1101-1152
- Løken T, J. Krogsrud AND I.L. Larsen. (1991). Pestivirus infections in Norway. Serological investigations in cattle, sheep and pigs. ActaVeterinary Scand 32(1): 27-34.
- Manrique, J. Y M. Teran, (2002). Aborto viral Rev. Med. De la prod. Año 1, N°1 Julio Labvetsur – Arequipa.
- Martínez-Salas E.; R. Ramos; E. Lafunete; S. López De Quinto (2001). Functional interactions in internal translation directed by viral and cellular IRES elements. J Gen Virol 82: pág. 973-984.

- MINAGRI, (2015). Ministerio de Agricultura. OIA
- [MINAG-OIA] Ministerio de Agricultura, Oficina de Información Agraria-Puno. (2003). Archivos de producción Pecuaria. Puno: MINAG. 15 p.
- Ministerio de Agricultura (1988). Reglamento de organización y funciones del programa nacional del manejo de cuencas y conservación de suelos. Lima, Perú.
- Miranda C. (1987). Epidemiología aplicada a la administración de salud. Lima – Perú.
- Moennig V.; B. Liess (1995). Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Food Anim. Pract.* 11: pág. 477–487.
- Mcgowan MR; PD. Kirkland; BJ Rodwell; DR Kerr; CL. Carroll (1993). A field investigation of the effects of bovine viral diarrhoea virus around the time of insemination on the reproductive performance of cattle. *Theriogenology* 39: pág. 443–449.
- Nettleton PF.; G. Entrican (1995). Ruminant Pestiviruses. *Br. Vet. J.* 151: pág. 615–642.
- Olafson P.; AD. Maccallum; A. Fox (1946). An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet* 36: pág. 205-213.
- Obando CA; JM. Rodríguez (2005). Diarrea Viral Bovina. Manual de Ganadería de Doble Propósito. pág. 317-322.
- Olivera L. (2001). Sanidad del ganado lechero de la cuenca del sur. *Rev Inv Vet, Perú* 12(2): 78-86.
- Paton DJ; JP Lowings; GC. Ramírez (1994). Stability of the gp53 gene of a bovine viral diarrhoea virus isolated at different times from a persistently infected steer. *Br. Vet. J.* 150: pág. 603–607.
- Parra J.; V. Vera; Villamil y G. Ramirez (1994). Seroepidemiología de la diarrea viral bovina en explotaciones lecheras de la Sabana de Bogotá. *Revista*

de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional de Colombia: pág. 29-44.

Peterhans E., T. Jungi and M. Schweizer. (2003). BVDV and innate immunity. *Biologicals* 31:107- 111

Pedrera, M.; M. Risalde; J. Romero; A. Da Silva; A. Alexandre y Nuñez. (2007). Diarrea vírica bovina: etiología formas clínicas, distribución del virus y patogenia. *Real Academia de Andalucía Oriental, Anales*, vol 20. Pág.1-8.

Quispe R.; A. Ccama; H. Rivera; M. Araínga (2008). El virus de la diarrea viral en bovinos criollos de la provincia de Melgar, Puno. *Rev Inv Vet Perú.*; 19: pág. 176-82

Quiñones, J. (2006). Seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en vacunos del establo de la estación experimental ILLPA INIA - Puno. Tesis para optar el título profesional de med. Vet. Y Zoot. UNA PUNO.

Ramos, D. (2016). Seroprevalencia de anticuerpos al virus de la diarrea viral bovina en el distrito de Huacullani-Chucuito. Tesis para optar el título profesional de med. Vet. Y Zoot. UNA PUNO.

Ramsey FK.; WH. Chivers (1953). Mucosal disease of cattle. *North Am Vet* 34: pág. 629-634.

Raymond G. (2002). DVB Bovine Virus Diarrhea Virus Veterinarian's Corner; pág. 2-9.

Ridpath JF. 2005. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S control programs. *Prev Vet Med*72:pág.17-30.

Ridpath, J. (2010). Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status. *Vet Clin Food Anim.* 26: pág. 105–121.

- Rivera, H.; L. Valdivia, Y A. Benito (2001). Diarrea Viral en Bovinos lecheros de crianza semiextensiva de la Provincia de Parinacochas, Ayacucho. Rev. Inv. Vet., Perú. Pág. 117-122.
- Ridpath, J.; S. Bendfeldt; J. Neil Y E. Liebler- Tenorio. (2006). Lymphocytopathogenic activity in vitro correlates with high virulence in vivo for BVDV type 2 strains: Criteria for a third biotype of BVDV. Virus Research (118) pág. 62-65.
- Ridpath, J.; S Bolin. (1991). Hybridization analysis of genomic variability among isolates of bovine viral diarrhoea virus using cDNA probes. Mol Cell Probes. 5: pág. 291-298.
- Samuel Jutzi, (2005). Dirección de producción y sanidad. FAO. Italia-Roma. Despacho C-546.
- SENASA. (2011). (Servicio Nacional de Sanidad Agraria) Informe final caracterización de la diarrea viral bovina neosporosis y rinotraqueitis infecciosa bovina. Sub dirección de análisis de riesgo y vigilancia epidemiológica (SARVET).
- Stahl H; A. Lindberg; H Rivera; C Ortiz; J Moreno-López. (2008). Selfclearance from BVDV infections- A frequent finding in dairy herds in an endemically infected region in Peru. Prev Vet Med 83: 285-296
- Suni, L. (2014). Seroprevalencia de la diarrea viral bovina en la cuenca lechera del distrito de Moquegua. Tesis para optar el título profesional de med. Vet. Y Zoot. UNA PUNO.
- Valera, A. (2007). Microbiología Veterinaria. (1era. Ed.) Buenos Aires, Argentina. pág. 447-450.
- Vanroose, G; H. Nauwinck; A. Van Soom; E. Vanopdenbosch; A. DE Kruif. (1998). Replicación OF Cytopathic and Noncytopathic Bovine Viralk Diarrhea Virus in Zona – Free and Zona – Intact In Vitro – Prodeded Bovine Embryos and the Effect on Embryo Quality. Biology of Reproduccion. 58: pág. 857 – 866.

- Vega, S. (1998). Diarrea vírica bovina: caracterización de aislados españoles con anticuerpos monoclonales y seroprevalencia en la Comunidad Autónoma de Madrid. Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España
- Walz, P. Bell, T., Wells, J. y Grooms, D. (2001). Relationship between degree of viremia and disease manifestation in calves with experimentally induced bovine viral diarrhoea virus infection. American Journal of Veterinary Research (62). Pág. 103.

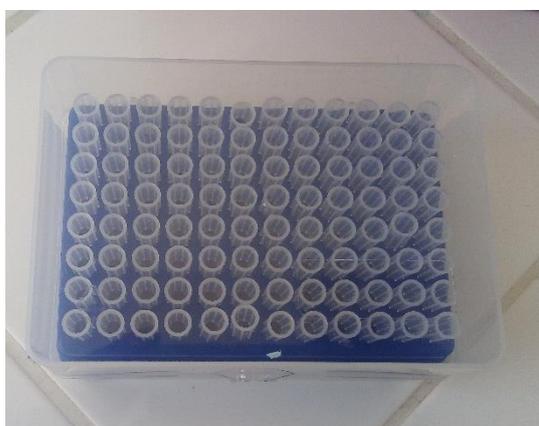
# ANEXOS

Anexo A

Figura A1. Vista de kit vDVB y sus conjugados.



Figura A2. Vista de materiales y equipos (refrigeradora, laptop, viales y micro pipetas).



**Anexo A3****Cálculos realizados para la detección de anticuerpos específicos contra la proteína p80 del vDVB en el laboratorio.**

- Solución lavada (20x).

83 x 300 ul x 3 veces x 2 repeticiones= 149400 ul solución lavado

160000 ul redondeado

1:20 = 160 000/20 = 8000 ul búfer lavado

⇒ 160 000 – 8 000 = 152 000 ul de H<sub>2</sub>O

- Conjugado

83 muestr. X 100 ul = 8 300 1:100

8 500 redondeo ul solución conjugado

8500/100 = 85 ul [ ] conjugado

8 500 – 85 = 8415 ul dilutor conjugado

- 1) Dispensar 50ul solución tampón a c/pocillo o a todos a 83
- 2) Dispensar 50ul C-
- 3) Dispensar 50ul C+
- 4) Dispensar 50ul de C/muestra problema (83)
- 5) Homogenizar y cubrir placa con (cinta embalaje).
- 6) Incubar 1 hora +/- 5 min a 18-26°C
- 7) Lavado 3 veces con solución (1) y secar y con papel toalla golpear => 300ul
- 8) Dispensar 100ul de conjugado (2) homogenizar.
- 9) Incubar por 3 min de 18-26°C.
- 10) Lavado por 3 veces (1) secar y golpear
- 11) Dispensar 100ul de sustrato => homogenizar
- 12) Incubar por 20min +/- 3 min 18-26°C
- 13) Dispensar 100ul de frenado
- 14) Calibrar
- 15) Lector o calcular resultados.

Figura A4. Ficha de muestras colectadas.



Figura A5. Ficha de análisis de muestras.

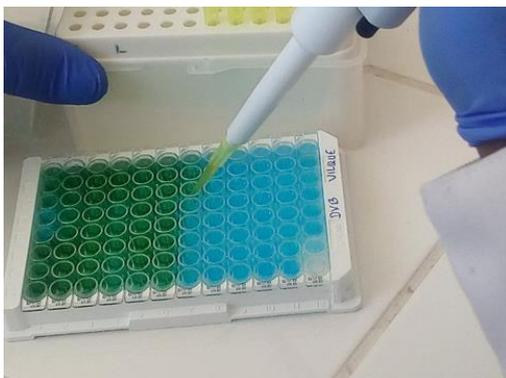


Tabla A1. Ficha de muestreo nombre del productor y fundo.

Famil./lugar asignado	Nombre del productor	Fundo
1	Damián vilca flores	Nuevo horizonte
2	Evaristo flores Ramírez	Nuevo horizonte
3	Leonarda Quispe vilca	Nuevo horizonte
4	celestino flores Ramírez	Nuevo horizonte
5	Irene flores Ramírez	Nuevo horizonte
6	Candy Quispe Quispe	Nuevo horizonte
7	Jorge flores Quispe	Rosario
8	Alex pilco pino	Rosario
9	Teodora Ramírez Meneses	Rosario
10	Felipe flores flores	Nuevo horizonte
11	Silverio Quispe chuquicallat	Nuevo horizonte
12	Jesuzacero apaza	Nuevo horizonte
13	Evaristo otazu vilca	Séptima

Tabla A2. Ficha de muestreo según estado del animal y seropositividad.

Familia/lugar	Nombre del animal	Estado	+/-
1	Carla	PP	0.73
1	gunderver	MACHO	19.58
1	Mery	HEMBRA	19.73
1	Alicia	PS	20.12
1	estrella	HEMBRA	85.26
1	Tomasa	PP	91.42
1	Juana	PP	19.81
1	luz	HEMBRA	88.92
1	daya	VP	83.46
1	pilar	VP	18.80
1	velen	HEMBRA	78.78
1	juan	MACHO	89.63
1	Greis	VP	17.71
2	blanca	PP	18.33
2	lucho	MACHO	62.95
2	flor	HEMBRA	72.93
2	María	PP	19.81
2	Norma	PP	18.25
2	melisa	PP	18.41

2	trini	HEMBRA	41.58
2	lucha	PS	18.02
2	Blanca	VP	19.34
3	crystal	VS	58.35
3	Sandra	HEMBRA	77.15
3	Amarrilla	PP	17.86
3	vena	VS	68.80
3	lola	VS	80.42
4	Lucy	VP	86.43
4	María	VP	16.77
4	Martha	HEMBRA	85.73
5	leti	HEMBRA	81.20
5	Paola	VS	18.33
5	criss	VP	17.47
5	clara	PP	20.12
6	Rosy	HEMBRA	81.67
6	Rafael	MACHO	76.99
6	mocha	VP	28.08
6	Martha	PP	18.95
6	melisa	VP	20.05
6	Paola	PP	20.20
7	Juanito	MACHO	18.33
7	Blanca	PP	19.27
7	rosa	HEMBRA	18.64
7	mocha	VS	18.80
8	nely	HEMBRA	22.39
8	maria	VP	20.20
9	jacarero	MACHO	19.50
9	wunder	MACHO	17.78
9	clara	VS	65.99
9	Carla	VP	18.33
9	yola	PS	57.96
9	flor	HEMBRA	20.44
9	blanca	VS	19.73
10	Bertha	VP	16.15
10	yudy	VS	85.96
10	blanca	VP	36.74
10	lica	VP	24.18
10	lola	VP	20.51
10	rosa	VS	18.25
10	Liz	HEMBRA	18.10
10	liset	HEMBRA	17.94
11	leydy	PP	16.85
11	mily	PS	17.00

11	keca	PS	17.63
11	cachuda	PP	17.63
11	santa	PS	18.80
11	yaqui	VS	18.64
11	Carol	HEMBRA	19.89
11	Beto	MACHO	97.58
11	dulce	PP	16.07
11	luna	PP	20.05
11	lisa	VS	17.63
11	Colonia	VS	16.93
11	Cielo	HEMBRA	18.02
12	mocha	VS	18.10
12	rosa	VP	54.29
12	pedro	MACHO	96.33
12	María	PS	92.12
12	Carina	PP	90.72
12	Antonia	PS	20.67
12	pepe	MACHO	87.36
12	Rosy	PP	77.93
13	isulina	PS	18.25
13	Pancha	PS	19.66
13	Ruth	PS	21.53
13	yola	PS	84.71
13	norma	PS	91.58
13	Carla	VS	76.76
13	Raúl	MACHO	23.40
13	blanca	PS	71.06

**Anexo B.**

**Cuadro B1. Prueba de Ji-cuadrada para Seroprevalencia del virus Diarrea Viral Bovina en vacunos Brown Swiss del Distrito de Vilque – puno mediante el software IBM SPSS Statistics 22.**

[Conjunto de datos1] D:\Corridas SPSS\Julio SPPS.sav					
<b>Estadísticos</b>					
Seroprevalencia					
N	Válido	90			
	Perdidos	0			
<b>Seroprevalencia</b>					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Negativo	31	34.4	34.4	34.4
	Positivo	59	65.6	65.6	100.0
	Total	90	100.0	100.0	

**Cuadro B2. Prueba de Ji-cuadrada para Seroprevalencia del virus Diarrea Viral Bovina en vacunos Brown Swiss en la cuenca lechera del Distrito de Vilque – puno mediante el software IBM SPSS Statistics 22.**

<b>Sexo*Seroprevalencia tabulación cruzada</b>					
				Seroprevalencia	
				Negativo	Positivo
				Total	
Sexo	Macho	Recuento	6	5	11
		Recuento esperado	5.5	5.5	11.0
	Hembra	Recuento	8	9	17
		Recuento esperado	8.5	8.5	17.0
Total		Recuento	14	14	28
		Recuento esperado	14.0	14.0	28.0
<b>Pruebas de chi-cuadrado</b>					
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	,150 <sup>a</sup>	1	.699		

**Cuadro B3. Prueba de Ji-cuadrada para Seroprevalencia de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en vacunos Brown Swiss de la comunidad de Huisacollana del Distrito de Vilque – puno mediante el software IBM SPSS Statistics 22.**

<b>Edad*Seroprevalencia tabulación cruzada</b>					
				Seroprevalencia	
				Negativo	Positivo
				Total	
Edad	Joven	Recuento	14	14	28
		Recuento esperado	9.6	18.4	28.0
	Adulto	Recuento	17	45	62
		Recuento esperado	21.4	40.6	62.0
Total		Recuento	31	59	90
		Recuento esperado	31.0	59.0	90.0
<b>Pruebas de chi-cuadrado</b>					
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	4,356 <sup>a</sup>	1	.037		

**Cuadro B4. Prueba de Ji-cuadrada para Seroprevalencia de la diarrea viral Bovina en vacunos Brown Swiss de la comunidad de Huisacollana del Distrito de Vilque – puno mediante el software IBM SPSS Statistics 22.**

Estado reproductivo*Seroprevalencia tabulación cruzada					
			Seroprevalencia		Total
			Negativo	Positivo	
Estado reproductivo	preñada seca	Recuento	5	9	14
		Recuento esperado	3.5	10.5	14.0
	Preñada producción	Recuento	3	15	18
		Recuento esperado	4.5	13.5	18.0
Total		Recuento	8	24	32
		Recuento esperado	8.0	24.0	32.0

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	1,524 <sup>a</sup>	1	.217		

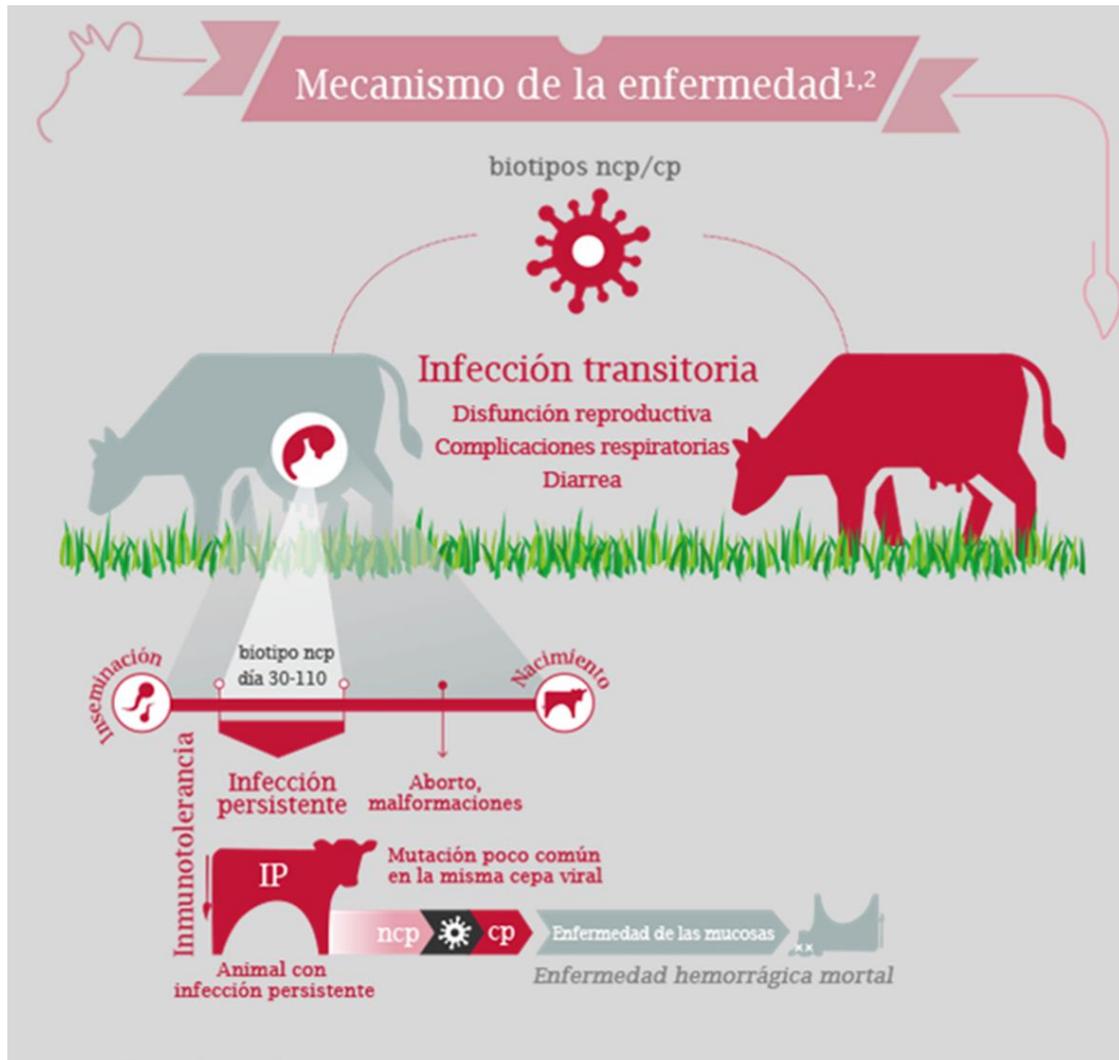
**Cuadro B5. Prueba de Ji-cuadrada para Seroprevalencia de la diarrea viral Bovina en vacunos Brown Swiss del Distrito de Vilque – puno mediante el software IBM SPSS Statistics 22.**

Estado productivo*Seroprevalencia tabulación cruzada					
			Seroprevalencia		Total
			Negativo	Positivo	
Estado productivo	VP	Recuento	3	13	16
		Recuento esperado	4.8	11.2	16.0
	VS	Recuento	6	8	14
		Recuento esperado	4.2	9.8	14.0
Total		Recuento	9	21	30
		Recuento esperado	9.0	21.0	30.0

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	2,066 <sup>a</sup>	1	.151		

**Cuadro B4: Mecanismo de transmisión**



Fuente: © 2018 Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH.