

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

SEROPREVALENCIA DE ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS
(PI) CON EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB) EN EL
DISTRITO DE LOCUMBA - TACNA, 2012

TESIS

Presentada por:

Bach. ABEL LENYN SÁNCHEZ COPA

Para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

TACNA - PERÚ

2012

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

SEROPREVALENCIA DE ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS
(PI) CON EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB) EN EL
DISTRITO DE LOCUMBA - TACNA, 2012

TESIS SUSTENTADA Y APROBADA EL 26 DE JULIO DEL 2012, ESTANDO
INTEGRADO EL JURADO CALIFICADOR POR:

PRESIDENTE :
MSc. JUAN NICANOR CASTRO CANCINO

SECRETARIO :
MSc. LUIS ADOLFO RAMOS MAMANI

VOCAL :
MVZ. CESARIO SEBASTIAN CRUZ ANCHAPURI

ASESOR :
Dr. CECILIO HURTADO QUISPE

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
TITULO PROFESIONAL DE

Médico Veterinario y Zootecnista

Tomo: 03

Folio N° 623

El Decano de la Facultad, CERTIFICA,

Que el Bachiller: *Sánchez Copa*
Abel Longin

ha sustentado el presente Trabajo de Tesis y ha sido APROBADO
por *Unanimitad* con el calificativo de *BUENO (16)*

Tacna, *03 setiembre 2012*



J. Valenzuela
CANOFCAG

DEDICATORIA

*A Dios, por permitirme llegar a este momento
tan especial en mi vida.*

*A mi amada hijita Araceli, por ser la razón de mi vida
y el motivo de mi constante superación.*

*A Yude, mi amada esposa por su constante apoyo emocional
en la culminación de mi carrera profesional.*

*A la memoria de mi querida madre Amelia Copa Téllez, por su amor
incondicional y entrega completa de su vida para sus tres hijos.*

*A mi padre Juan Sánchez Neyra, por su apoyo incondicional,
amor y comprensión a lo largo de mi vida.*

*A mis hermanos Eber, Nancy, José y Olga
y a todos mis familiares y amigos
que en los buenos y malos momentos
siempre estuvieron conmigo.*

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento a la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. A todos los docentes, quienes me instruyeron en toda mi etapa universitaria, pues son parte importante en mi formación profesional. Al Dr. Cecilio Hurtado Quispe, por el asesoramiento del presente trabajo de investigación. A los Docentes Juan Castro, Luis Ramos y Cesario Cruz, por sus acertadas sugerencias en el presente trabajo de investigación. Al MVZ. Oscar Pérez Chávez, por sus sugerencias en la realización del presente trabajo de investigación. A todos ellos, mi eterna gratitud.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	i
I. INTRODUCCIÓN.....	01
1.1. Objetivos.....	03
1.1.1. Objetivo General.....	03
1.1.2. Objetivos Específicos.....	03
1.2. Hipótesis.....	03
II. MARCO TEÓRICO.....	04
2.1. Antecedentes de investigación.....	04
2.2. Teorías y conceptos.....	08
2.2.1. Diarrea Viral Bovina.....	08
2.2.2. Características del virus.....	09
2.2.2.1. Estructura viral.....	10
2.2.2.2. Biotipos y Genotipos virales.....	11
2.2.3. Epizootiología.....	12
2.2.4. Epidemiología.....	13
2.2.4.1. Fuentes de infección.....	13
2.2.4.2. Métodos de transmisión.....	14
2.2.5. Patogénesis.....	16
2.2.6. Diagnóstico.....	19
2.2.6.1. Detección de antígenos virales.....	20
2.2.7. Control y Prevención.....	21
2.2.8. Terminología básica.....	24
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
3.1. Material.....	26
3.1.1. Localización del trabajo de investigación.....	26
3.1.2. Material de campo.....	26
3.1.3. Material de laboratorio.....	27

	Pág.
3.2. Métodos.....	29
3.2.1. Tipo de investigación.....	29
3.2.2. Población y muestra.....	29
3.2.2.1. Población.....	29
3.2.2.2. Tamaño de muestra.....	30
3.2.3. Métodos y Técnicas de recolección de datos.....	31
3.2.3.1. Trabajo de campo.....	31
3.2.3.2. Trabajo de laboratorio.....	33
3.2.4. Métodos y Técnicas de análisis de datos.....	33
3.2.4.1. Determinación de la seroprevalencia de animales (PI).....	33
3.2.4.2. Prueba de Chi cuadrado.....	34
IV. RESULTADOS.....	35
V. DISCUSIÓN.....	41
VI. CONCLUSIONES.....	46
VII. RECOMENDACIONES.....	47
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXOS.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA I. Seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba.....	35
TABLA II. Seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba, según edad.....	37
TABLA III. Seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba, según sexo.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba.....	36
FIGURA 2. Seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba, según edad.....	38
FIGURA 3. Seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba, según sexo.....	40

RESUMEN

El presente estudio se realizó en el distrito de Locumba, provincia Jorge Basadre - Región Tacna, teniendo como objetivo determinar la seroprevalencia de animales Persistentemente Infectados (PI) con el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba. Para tal efecto se colectaron 164 muestras de sangre de bovinos de ambos sexos, de entre las edades de 4 a 30 meses, divididos en 4 grupos etarios: 4 a 8 (n=55), 9 a 12 (n=53), 13 a 15 (n=8) y 16 a 30 (n=48), procedentes de 39 establos, sin antecedentes de vacunación contra Diarrea Viral Bovina (DVB), para la detección de antígenos del (VDVB), mediante la prueba de ELISA de captura, obteniendo los siguientes resultados: El 0,61% (1/164) de los bovinos muestreados resultó ser un animal positivo o (PI). Según edad, el animal (PI) fue detectado en el grupo etario de 16 a 30 meses, con una seroprevalencia de 2,08% (1/48) y según sexo, el animal (PI) fue detectado en el grupo de las hembras, con una seroprevalencia de 0,67% (1/149). No existió diferencia estadística significativa entre los grupos etarios ni entre sexo, con respecto a la seropositividad de animales (PI), mediante la prueba de Chi cuadrado, ($p > 0.05$). Se concluye que el (VDVB) está presente en la ganadería bovina del distrito de Locumba.

Palabras clave: Bovinos, (PI), (VDVB), seroprevalencia.

I. INTRODUCCIÓN

La Diarrea Viral Bovina (DVB), es una enfermedad de distribución mundial y endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas, responsable de ocasionar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones, siendo los trastornos reproductivos los de mayor impacto económico, causando grandes pérdidas: Canadá \$31,07 por vaca (Chi *et al.*; 2002), Reino Unido \$31,10 a \$88,75 por vaca (Duffell *et al.*; 1986), Estados Unidos \$41,17 por cabeza (Hessman; 2006).

Tal enfermedad es causada por el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), la infección en vacas gestantes susceptibles, dependiendo de la edad de 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, originándose así un animal persistentemente infectados (PI) con el (VDVB) (McClurkin *et al.*, 1984; Baker, 1995).

Se estima que la prevalencia de animales (PI) es aproximadamente de 0,1 a 2%, en base a numerosos estudios realizados a nivel mundial,

sin embargo, a pesar de los bajos niveles de prevalencia, el riesgo de introducir un animal (PI) a un hato, es muy alto (Morán *et al.*, 2006).

En el Perú, los estudios sobre prevalencia de animales (PI) con el (VDVB), indican que el virus está difundido en las principales cuencas lecheras del país, se reportaron en Arequipa: 0,9% (Olivera, 2000); 0,76% (Morales, 2002); 2,7% (Jayashi, 2004) y 2,7% (Huamán, 2006). En Lima: 2% (Chacón, 2001). En Inclán - Tacna: 1,68% (Mamani, 2010).

En la ganadería lechera del distrito de Locumba, en los últimos años, se han incrementado los casos de abortos y otros problemas reproductivos, quedando muchas veces casos sin llegar a un diagnóstico etiológico, sabiendo de la existencia de animales (PI) en el distrito de Inclán (Mamani, 2010) y por el libre tránsito de bovinos entre estos dos distritos (ferias ganaderas), se sospecha de la existencia de animales (PI) en la ganadería bovina del distrito de Locumba.

Por la magnitud del perjuicio económico que causa dicha enfermedad y al no existir investigación de este tipo en la zona, se planteó realizar la presente investigación, para contribuir en la toma de decisiones, en cuanto a la elaboración y aplicación de planes efectivos para el control y prevención de la infección, por parte del Senasa - Tacna y por los ganaderos de la zona.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General

Evaluar la seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba.

1.1.2. Objetivos Específicos

1. Determinar la seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba.
2. Determinar la seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba, según edad y sexo.

1.2. Hipótesis

H₀: La seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba es mayor a 1,68%.

H₁: La seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba es menor a 1,68%.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de investigación

Mediante una previa revisión de estudios anteriores realizados en las diferentes zonas ganaderas del país, se han considerado los siguientes:

Olivera, (2000), en Arequipa, en un estudio realizado en tres hatos lecheros, determinó una prevalencia general de animales (PI) de 0,9% (3/345), encontrando en el primer hato 0,5% (1/200), en el segundo hato 2,2% (1/45) y en el tercer hato 1% (1/100).

Chacón, (2001), en Lima, en un estudio realizado en dos establos lecheros de crianza intensiva, uno vacunado (A=105) y otro sin vacunar (B=103), en el que el objetivo fue identificar animales (PI), realizando primeramente la prueba de Neutralización viral a todos los animales y posteriormente la prueba de ELISA de captura a aquellos animales negativos a la prueba de Neutralización. Reportó una prevalencia general de animales (PI) de 2% (4/208), los 4 animales (PI) pertenecieron al establo A con 3,8% (4/105) y además pertenecieron al mismo grupo etario: 12-18 meses de edad. Asimismo determinó que, de los animales sin anticuerpos contra el (VDVB) del establo A (n=34), el $11,76 \pm 10,82\%$ (4/34) fueron animales (PI). No realizó la prueba de ELISA de captura en

el establo B, ya que al realizar la prueba de Neutralización viral, los resultados indicaron que este establo no fue infectado por el (VDVB).

Morales, (2002), en Arequipa, en un estudio realizado en dos establos lecheros de crianza intensiva, (establo A=36) y (establo B=95), en el que el objetivo fue identificar terneros (PI) al nacimiento, antes que tomen el calostro, mediante la detección del (VDVB) en la sangre, a través de la prueba de ELISA de captura. Reportó una prevalencia de animales (PI) de 0,76% (1/131), el único animal (PI) detectado perteneció al establo A y al grupo de las hembras con una prevalencia de 5,88% (1/17). No detectó terneros (PI) en el establo B.

Jayashi, (2004), en Arequipa, en un estudio realizado en el que el objetivo fue determinar el efecto de la eliminación de los animales (PI) sobre la seroconversión contra el virus en la nueva generación de animales de un establo lechero de crianza intensiva, para tal efecto colectó muestras de suero de vaquillas entre 6 a 12 meses de edad en cuatro periodos: enero (n=73), junio (n=48), octubre (n=48) del 2003 y enero (n=35) del 2004, para la detección de anticuerpos contra el (VDVB) y para la detección de animales (PI), mediante las pruebas de Neutralización viral y ELISA de captura respectivamente. Reportó una seroprevalencia del (VDVB) de $80,8 \pm 9,0\%$; $56,3 \pm 14,0\%$; $50,0 \pm 14,2\%$ y $22,9 \pm 13,9\%$ en el primero, segundo, tercero y cuarto periodo de

muestreo, respectivamente. Asimismo reportó una prevalencia de animales (PI) de 2,7% (2/73) detectados únicamente en el grupo muestreado en enero del 2003.

Huamán, (2006), en Majes - Arequipa, en un estudio realizado en el que el objetivo fue determinar la prevalencia del (VDVB) y de animales (PI), en bovinos productores de leche, mediante las pruebas de ELISA indirecta y ELISA de captura respectivamente. Reportó los siguientes resultados: de 286 muestras de suero sanguíneo, el 47,2% (135/286) tuvieron anticuerpos contra el (VDVB) y dentro del grupo de animales seronegativos detectó 2,7% (4/151) animales (PI).

Quispe *et al.*, (2008), en Melgar - Puno, en un estudio realizado en el que el objetivo fue determinar la seroprevalencia del (VDVB), en bovinos criollos de ambos sexos, mayores a 6 meses de edad (n=347)), a través de la detección de anticuerpos neutralizantes en muestras de suero sanguíneo, mediante la prueba de Neutralización viral. Reportaron $48,7 \pm 0,1\%$ (166/347) animales con anticuerpos contra el (VDVB). No detectaron animales (PI), sin embargo, los títulos de anticuerpos estuvieron en un rango de 2 a >256, los altos títulos de anticuerpos evidenciaron intensa actividad viral, lo que indicó infecciones recientes y sugirieron la existencia de factores que promueven la difusión viral, como las ferias ganaderas y la falta de control en el tránsito interno de animales en la zona.

Mamani, (2010), en Inclán - Tacna, en un estudio realizado en el que el objetivo fue, determinar la seroprevalencia de animales (PI) en el 100% de bovinos de ambos sexos, de entre las edades de 4 a 24 meses (n=1129), mediante la prueba de ELISA de captura. Reportó una seroprevalencia general de animales (PI) de 1,68% (19/1129), según edad, detectó mayores casos positivos en la edad de 16 - 24 meses con 2,2% (7/315) y según sexo, detectó en machos 1,99% (7/351) y en hembras 1,54% (12/778).

Cárdenas *et al.*, (2011), en Espinar - Cusco, en un estudio realizado en el que el objetivo fue determinar la prevalencia del (VDVB) y de animales (PI), mediante las pruebas de Neutralización viral y ELISA de captura respectivamente, en bovinos de ambos sexos, mayores a 6 meses de edad (n=406). Reportaron los siguientes resultados: el $56,2 \pm 4,8\%$ (228/406) tuvieron anticuerpos contra el (VDVB), asimismo, detectaron mayores casos positivos en bovinos de 24 meses a más 65,4% (149/228), además, observaron que el 51,3% (20/39) de los toros jóvenes y adultos, presentaron anticuerpos contra el (VDVB). No detectaron animales (PI).

2.2. Teorías y conceptos

2.2.1. Diarrea Viral Bovina (DVB)

La diarrea viral bovina, es una enfermedad de distribución mundial y endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas. Es responsable de ocasionar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones, siendo los trastornos reproductivos los de mayor impacto económico (Baker, 1987; Houe, 2003).

El efecto de esta enfermedad, sobre la eficiencia productiva y reproductiva de los animales y el impacto económico para la industria lechera, han permitido realizar numerosas investigaciones tendientes a conocer la epidemiología, patogénesis y biología del virus, conocimientos que están haciendo posible el control y erradicación de la enfermedad (Huamán, 2006).

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 descrita posteriormente en New York, EEUU y se le denominó Diarrea Viral Bovina (DVB) (Olafson *et al.*, 1946).

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 *et al.*, 1953).

2.2.2. Características del Virus

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es un miembro del Género *Pestivirus*, Familia *Flaviviridae* (Vanroose *et al.*, 1998; Lértora, 2003). La infección con (VDVB), tiene un impacto negativo en la producción de leche y en la campaña reproductiva de los animales de un hato lechero (Chi *et al.*, 2002). Ocasiona fallas reproductivas, como son repeticiones de celo, muertes fetales y abortos. También se asocia a nacimientos de terneros débiles que mueren al poco tiempo de nacidos (Baker, 1995).

2.2.2.1. Estructura Viral

El (VDVB), es de forma esférica de 40-60 nm de diámetro. La partícula viral, está constituida por una molécula de ácido ribonucleico (ARN), protegido por una cubierta proteica y una envoltura externa de naturaleza lipídica (Ridpath *et al.*, 2000).

Las proteínas estructurales del virus constituyen la proteína de la cápside y tres glicoproteínas ubicadas en la envoltura lipídica.

- **C (p14):** Es la proteína de la cápside y tiene como función empaquetar el (ARN) genómico y proporcionar las interacciones necesarias para la formación de la envoltura del virión (Paton, 1995).
- **E^{ms} (gp48), E1 (gp25) y E2 (gp53):** Se asocian a la envoltura lipídica. La (gp53) contiene una región hipervariable y es la mayor responsable de la producción de anticuerpos neutralizantes tras la infección o vacunación (Paton, 1995; Sanjuán *et al.*, 1999). Asimismo es en la (gp53), donde se producen mutaciones, las cuales originan las diferencias entre las cepas del (VDVB), debido posiblemente a presiones inmunológicas. La proteína (gp48), está asociada a la envoltura viral e induce en parte la producción de anticuerpos neutralizantes (Paton, 1995).

- **Npro (p20):** Es una proteína no estructural responsable de la cortadura de la poliproteína viral (Meyers *et al.*, 1991).
- **NS23 (p125):** Esta proteína no estructural, es indispensable para la multiplicación viral. Los animales infectados naturalmente y aquellos vacunados con cepas vivas, desarrollan una respuesta humoral frente a esta proteína (Paton, 1995).
- **NS3(p80):** Es un fragmento más pequeño que la proteína (NS23), se encuentra en todas las variantes citopatogénicas del (VDVB), la síntesis de esta proteína parece estar ligada al desarrollo de la enfermedad de las mucosas (Meyers *et al.*, 1991).
- Se conocen otras proteínas no estructurales que incluyen la **NS4A(p10)**, **NS4B (p32)**, **NS4B (p38)** y **NS5A (p58)**, cuyas funciones aun no han sido establecidas, sin embargo, parecen ser importantes en la replicación viral (Sanjuán *et al.*, 1999).

2.2.2.2. Biotipos y Genotipos virales

Existen dos biotipos de (VDVB), basado en el efecto de estos, sobre los cultivos celulares: citopatogénico (CP) y no citopatogénico (NCP), aceptándose que el 90% de las infecciones por (VDVB) en los bovinos, se deben a cepas (NCP). Las cepas del (VDVB), se dividen en dos genotipos, (VDVB-I) y (VDVB-II), aunque en forma adicional, existe una amplia diversidad antigénica entre los virus de (DVB), sin llegar a la

categoría de serotipos (Brownlie *et al.*, 1997). El (VDVB), está relacionado antigénicamente con el virus de la peste porcina clásica (VPPC), en cerdos y con el virus de la enfermedad de las fronteras (VEF), en ovinos (Paton, 1995; Murphy *et al.*, 1995; Vega *et al.*, 2000).

2.2.3. Epizootiología

El (VDVB), infecta principalmente a los bovinos, especie para la cual representa uno de los patógenos más importantes, pero también puede ser encontrado en ovejas, cabras y rumiantes salvajes, que pudieran actuar como reservorios del virus (Paton, 1995). La infección transplacentaria de los fetos con (VDVB), en vacas preñadas, es un fenómeno muy frecuente, resultando en animales inmunotolerantes y Persistentemente Infectados (PI) con el virus, cuando la infección del feto ocurre en etapa temprana de la gestación, (45 a 125 días de gestación). Estos (PI) son la fuente más importante de transmisión del virus a los bovinos susceptibles (McClurkin *et al.*, 1984; Brownlie *et al.*, 1998).

Por otro lado, la inhalación e ingestión de saliva, secreciones nasales, orina y heces contaminadas con (VDVB), constituyen las fuentes más frecuentes de infección, así como, el semen, secreciones uterinas, líquido amniótico o placenta contaminada (Paton, 1995; Murphy *et al.*, 1995).

2.2.4. Epidemiología

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

2.2.4.1. Fuentes de infección

Los animales (PI) juegan un rol importante como fuente principal de diseminación del (VDVB), y por ende de la infección. Los animales (PI), eliminan grandes cantidades de virus durante toda su vida, a través de secreciones y excreciones tales como descarga nasal, saliva, semen, orina, heces, lágrimas y leche (Houe, 1995).

Los animales con infección aguda representan también una fuente importante de diseminación viral durante la infección. El virus es usualmente excretado a partir del día 4 al día 10, aunque este virus puede ser excretado durante un período mayor. Si bien, los animales con

infección aguda también eliminan virus por secreciones y excreciones, la cantidad del virus es mucho menor en relación a los animales (PI) (Houe, 1995; Kirkland *et al.*, 1991).

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

2.2.4.2. Métodos de transmisión

Los métodos de transmisión pueden ser vertical y horizontal; siendo la transmisión vertical, la que se da, de una generación a la siguiente, 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, el (VDVB) atraviesa la placenta e infecta al feto (Houe, 1995).

a. Transmisión vertical

La transmisión vertical ocurre de una generación a otra. Se incluye, la transmisión al feto a través del semen infectado de toros con infección aguda o toros (PI). Las hembras seronegativas pueden ser inseminadas con semen infectado, pudiendo infectarse (Houe, 1995).

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 (Brownlie, 1991). Además, puede ocurrir transmisión vertical después de la transferencia de embriones, si la receptora es (PI), si la hembra donante es (PI). El (VDVB) esta presente en niveles altos en el medio uterino, por ello, antes se puede dar una transmisión horizontal de madre a madre, a través de los procedimientos de lavado (Houe, 1995).

b. Transmisión horizontal

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

Al igual que en la transmisión vertical, la principal fuente de infección son los (PI), aunque también esta probado la capacidad de transmitir el (VDVB) a partir de animales con infección aguda (Houe, 1995).

El semen es una fuente importante de transmisión horizontal para las vacas, esto está asociado con la eliminación del virus a través de este medio (McGowan *et al.*, 1995).

2.2.5. Patogénesis

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

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:

a. Infección subclínica

El 70 a 90% del ganado adulto susceptible, puede presentar (DVB) subclínica. El periodo de incubación, es de 5 a 7 días aproximadamente, luego de lo cual, se presenta una ligera fiebre y leucopenia, que usualmente no es notado por el veterinario o ganadero, siendo esto, seguido por una producción de anticuerpos neutralizantes (Baker, 1987).

b. Infección aguda

La infección aguda en animales seronegativos e inmunocompetentes, puede dar un rango muy amplio de signos clínicos, estando relacionados con factores como: cepa del virus, edad del animal, inmunidad, estado fisiológico del animal y la presencia de otros agentes patógenos. La mayoría de las infecciones agudas, están causadas por el biotipo (NCP), generalmente ocurre en animales entre 6 meses y 2 años de edad (Baker, 1995).

c. Enfermedad de las mucosas (EM)

La enfermedad de las mucosas es usualmente de curso fatal y esta asociado con superinfección del animal (PI), con el biotipo (NCP), por el biotipo (CP) del (VDVB) (Brownlie *et al.*, 1997; Paton, 1995). Estos animales desarrollan profusa diarrea, una rápida pérdida de condición

corporal, erosiones a nivel del tracto gastrointestinal y muerte (Tautz *et al.*, 1994; Bolin *et al.*, 1995a).

d. Síndrome hemorrágico

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

e. Complejo respiratorio

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

f. Infección persistente (PI)

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

Los animales (PI), resultan de la infección fetal con biotipos (NCP), antes que el feto adquiriera competencia inmunológica, esto ocurre entre los días 45 y 125 días de gestación, período que comienza al finalizar la etapa embrionaria y culmina cuando el feto adquiere competencia inmunológica al (VDVB) (Houe, 1995). Algunos mueren dentro de los primeros 6 meses de vida, tal vez por el debilitamiento de la respuesta inmune contra la enfermedad. Sin embargo, algunos muestran salud y crecimiento normal, incluso llegan a reproducirse formando las llamadas líneas familiares de animales (PI) que puede ocurrir en varias generaciones (Brownlie, 1991).

2.2.6. Diagnóstico

No existen signos clínicos patognomónicos en una infección con el (VDVB) en el ganado. Por lo tanto, el diagnóstico está basado en las

confirmaciones en laboratorio, mediante el aislamiento del virus, detección de antígenos virales o detección de ácido nucleico y detección de anticuerpos contra el virus.

Los animales (PI), pueden ser identificados por el uso combinado de pruebas serológicas y pruebas de identificación viral en muestras de sangre (Lértora, 2003). Uno de los métodos de diagnóstico de laboratorio más usados, es el método de detección de antígenos virales.

2.2.6.1. Detección de antígenos virales

Las técnicas de laboratorio más usuales para detectar antígenos virales son:

a. Inmunofluorescencia (IF)

Es una prueba inmunohistoquímica rápida, para detectar antígeno viral en muestras de tejido fresco, mediante el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales contra el (VDVB), marcados con fluorocromos (Sandvik, 1999).

b. Inmunoperoxidasa

Es una prueba inmunohistoquímica rápida, para detectar antígenos virales en muestras de tejido fresco o fijado en formalina. Esta prueba, es similar a la (IF), pero en este caso el anticuerpo monoclonal o policlonal,

está marcado a una enzima como la peroxidasa. Esta técnica no requiere de microscopio de fluorescencia (Sandvik, 1999).

c. ELISA de captura de antígenos

Es una prueba de laboratorio, basada en la detección de antígenos, a través de anticuerpos monoclonales (Mabs). Debido a que los (Mabs) utilizados reconocen la (p125), debe ser capaz de detectar muchas si no todas, las cepas del (VDVB). La rapidez y su independencia de cultivos celulares, han hecho de esta prueba, una herramienta muy útil para el examen de grandes cantidades de muestras, en programas de control (Sandvik, 1999).

La prueba utiliza dos grupos de anticuerpos monoclonales, los cuales reconocen diferentes epítomos conservados en el polipéptido no estructural (125K/80K) del virus, uno de ellos está pegado a los hoyos de la microplaca, los cuales capturan al antígeno viral de las muestras, el antígeno capturado es detectado por el otro (Mabs) conjugado con una peroxidasa. La presencia de color, seguida de la adición del sustrato de la enzima, identifica muestras positivas (Sandvik, 1999).

2.2.7. Control y Prevención

El conocimiento detallado de la epidemiología de la (DVB) y del comportamiento de las pruebas diagnósticas en uso, son esenciales para

la identificación de animales virémicos y animales con infección aguda, que son la fuente más importante de diseminación viral en hatos afectados (Houe, 1995)

Un programa de prevención, control o erradicación de una enfermedad, puede adoptar distintas estrategias que van a variar de acuerdo a la situación inicial de la explotación, pero apoyadas en tres pilares fundamentales que son: las medidas de bioseguridad, identificación y remoción de los animales (PI) y vacunación contra (VDVB) en el hato (Baker, 1990).

a. Bioseguridad

La implementación de medidas de bioseguridad, están dirigidas a evitar el ingreso del (VDVB), así como su difusión dentro del hato, a través del control estricto de todos los animales que se incorporan, los cuales deben ser seronegativos al virus antes y después de la cuarentena estricta, evitar el contacto directo o indirecto con otros hatos, evitar el servicio con semen sin certificación de ser libre de la enfermedad (Baker, 1990; Houe, 1999).

b. Identificación y eliminación de animales (PI)

Estrategia indispensable, por la importancia epidemiológica de estos animales (Houe, 1999). Con el fin de erradicar la diarrea viral bovina,

países europeos como Noruega, Finlandia, Suecia y Dinamarca implementaron un plan de erradicación a nivel nacional con muy buenos resultados, este plan se basa en la determinación del estatus infeccioso de cada rebaño, por examen serológico a través de ELISA indirecto, en muestras de leche de tanque y/o de sangre de terneros entre 8 y 12 meses de edad, detección y eliminación de animales (PI) positivos a un ELISA basado en anticuerpos policlonales para la detección de antígenos en sangre, así como examen serológico anual, para mantener el estatus libre de infección (Lértora, 2003).

c. Vacunación

Inmunización con vacunas de virus muerto o modificado, con el objetivo de prevenir la infección congénita, así como para evitar las infecciones postnatales (Van Oirschot *et al.*, 1999).

Durante mucho tiempo, la vacunación contra (DVB), no fue específica para combatir la infección uterina, si no, para mejorar la salud de los animales y prevenir la forma clínica. La implementación de vacunas que inducen protección fetal, es relativamente reciente; sin embargo, la duración de la inmunidad y la posibilidad de protección cruzada contra las distintas cepas del virus, aun no son satisfactorias. La vacunación sin remoción de los animales (PI), no produce mejora alguna sobre la situación epidemiológica de un hato. (Moennig *et al.*, 2005).

En la actualidad, se viene implementando en Alemania, un programa de vacunación en dos pasos: se usa en primera instancia, una vacuna a virus tipo 1 inactivado, seguido de una vacuna a virus vivo atenuado cuatro semanas después. Esta estrategia de vacunación, ha producido una respuesta inmune prolongada y protección fetal contra el desafío del (VDVB) 1 y 2, a partir del quinto mes luego de la vacunación. Esta estrategia sería más efectiva conjuntamente con el monitoreo y erradicación de animales (PI) de los hatos (Moennig *et al.*, 2005).

2.2.8. Terminología básica

- **Antígenos:** Sustancias, usualmente proteínas o polisacáridos, que desencadenan la formación de anticuerpos y pueden causar una respuesta inmunitaria (Tizard, 2009).
- **DVB:** Diarrea Viral Bovina, enfermedad de distribución mundial y endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas, es responsable de ocasionar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones, siendo los trastornos reproductivos, los de mayor importancia económica (Baker, 1987; Houe, 2003).
- **ELISA de captura de antígenos:** Ensayo en el cual, un antígeno inmovilizado, se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima, capaz de generar un producto detectable, como cambio de color. La aparición de colorantes, permite medir indirectamente,

mediante espectrofotometría, el antígeno en la muestra (Sandvik, 1999).

- **Inmunosupresión:** Supresión o disminución de las reacciones inmunitarias (Tizard, 2009).
- **Inmunotolerancia:** Estado de reactividad inmunológica específica, que es producido por un contacto previo con el antígeno y que está limitado solo a éste antígeno o a otro que reaccione con éste de forma cruzada (Tizard, 2009).
- **PI:** Persistentemente Infectado, animal infectado en forma persistente con el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), se consideran los transmisores más importantes de la infección, ellos son inmunotolerantes al (VDVB), debido a una infección fetal ocurrida en el primer tercio de la preñez, por lo tanto, ellos no producen anticuerpos, ni pueden eliminar el virus de su organismo, diseminando grandes cantidades de virus, a través de sus excreciones y secreciones (Baker, 1995, Sandvick, 1999; Brownlie *et al.*, 1998).
- **Seroprevalencia:** Estudio de la prevalencia de una enfermedad, en muestras de sangre o suero sanguíneo (Onsalus, 2012).
- **VDVB:** Virus de la Diarrea Viral Bovina, es el prototipo representativo del Género *Pestivirus*, perteneciente a la Familia *Flaviviridae* (Vanroose *et al.*, 1998).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Localización del trabajo de investigación

a. Localización espacial

El estudio se realizó en el distrito de Locumba, provincia de Jorge Basadre, Región - Tacna, que comprenden los sectores de Aurora, Sitana, Piñapa, Conostoco, Locumba, Chaucalana, Sagollo y Chipe, ubicado a una altitud de 559 msnm, Latitud sur: 17°25'00" y Longitud oeste: 70°30'37", con temperaturas máximas de 29,1°C y mínimas de 13,8°C, con precipitaciones promedio entre 7 a 12 mm y con una humedad relativa que oscila entre 67 y 74% (SENAMHI, 2012).

b. Localización temporal

El presente trabajo de investigación se realizó entre los meses de abril y junio del 2012.

3.1.2. Material de campo

- Caja conservadora de temperatura (Cooler)
- Conservador de muestras (geles refrigerantes)
- Tubos vacutainer de 10 ml sin anticoagulante (tapa roja)

- Agujas vacutainer descartables de 20Gx1"
- Holder (adaptador para agujas vacutainer)
- Viales criogénicos con tapa de 3,5 ml
- Gradillas para acomodar los tubos vacutainer
- Marcadores indelebles y lapiceros
- Desinfectante (alcohol medicinal)
- Algodón hidrófilo
- Guantes de látex
- Soporte de plástico para las fichas de muestreo
- Fichas de muestreo
- Mameluco
- Botas de jebe
- Soga
- Mocheta
- Movilidad.

3.1.3. Material de Laboratorio

- KIT ELISA de captura de antígenos (HerdChek BVDV-Ag/Suero Plus)
- Pipetas de precisión monocanal o multicanal para dispensar de 10 µl a 1000 µl
- Puntas de pipeta desechables
- Cilindro graduado de 500 ml para la Solución de Lavado

- Lector de microplacas ELISA
- Agua destilada o desionizada
- Dispositivo para aplicación y aspiración de Solución de Lavado
- Trampa de retención de aspirado y desinfectante
- Cámara húmeda o selladores de placas
- Agitador vórtex.

Reactivos:

El kit y todos los reactivos fueron almacenados entre 2° - 8°C.

	Volumen
1. Placas/tiras de microtitulación, tapizadas con anticuerpos monoclonales E ^{ms}	5 placas
2. Control positivo.....	2 ml
3. Control negativo.....	2 ml
4. Conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRPO).....	60 ml
5. Anticuerpos de detección.....	30 ml
A. Solución de Lavado concentrada (10x).....	480 ml
B. Solución de sustrato TMB, solución de TMB/H ₂ O ₂	60 ml
C. Solución de frenado – 1 M HCl (ácido fuerte).....	60 ml

3.2. Métodos

3.2.1. Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo descriptiva – transversal, ya que se hizo la descripción del fenómeno en un momento dado y no requirió la observación de los sujetos estudiados durante un periodo de tiempo (Rojas, 2006).

El método de muestreo es de tipo probabilístico (al azar o aleatorio), en el cual cada miembro de una población tiene las mismas probabilidades de ser incluido en la muestra (Murray, 2001).

3.2.2. Población y muestra

3.2.2.1. Población

El universo estuvo representado por la población total de bovinos del distrito de Locumba, que conforman 943 cabezas, (MINAG, 2008).

a. Unidades de muestreo

Las unidades de muestreo fueron los bovinos hembras y machos, de entre las edades de 4 a 30 meses, pertenecientes a establos sin antecedentes de vacunación contra (DVB), del distrito de Locumba, los cuales fueron categorizados en 4 grupos etarios:

GRUPO I: (hembras y machos de 4 a 8 meses)

GRUPO II: (hembras y machos de 9 a 12 meses)

GRUPO III: (hembras y machos de 13 a 15 meses)

GRUPO IV: (hembras y machos de 16 a 30 meses).

b. Unidades de análisis

Las unidades de análisis fueron las muestras de sangre obtenidas por punción en la vena coccígea o vena yugular de los bovinos, de las cuales se utilizó la fracción sérica.

3.2.2.2. Tamaño de muestra

Mediante el método no paramétrico de muestreo aleatorio simple, considerando una prevalencia referencial de 1,68% (Mamani, 2010) y un nivel de confianza de 95%, se estimó un tamaño muestral de 25 animales, sin embargo, se trabajó con 164 bovinos ya que se contó con el apoyo financiero, para el análisis de las muestras, por parte de la municipalidad distrital de Locumba. Para que la muestra sea más representativa a nivel distrital se estratificó según sectores, ver Anexo 2.

3.2.3. Métodos y Técnicas de recolección de datos

3.2.3.1. Trabajo de campo

- Se preparó con anticipación el material requerido para el muestreo, teniendo en cuenta el número de establos a visitar y el número de animales a muestrear en ese día.
- Una vez constituido en la zona de estudio (distrito de Locumba), se realizó las coordinaciones respectivas con el personal del SENASA - Tacna para realizar la toma de muestras de sangre.
- En el campo, se realizó la entrevista con el propietario, se le preguntó si realizaba vacunación contra (DVB), si no realizaba vacunación, se le solicitó el apoyo para realizar la toma de muestra o muestras de sangre (una muestra por animal).
- Contando con el apoyo del propietario, se seleccionó al azar al animal o animales que reunían las condiciones establecidas, a los cuales se les tomó una muestra de sangre, por punción en la vena yugular o vena coccígea, con el sistema de tubos vacutainer.
- Se obtuvo una cantidad de sangre no menor a 5 ml en tubos vacutainer sin anticoagulante, los cuales se codificaron y registraron los datos correspondientes en la ficha de muestreo (una ficha por establo). La ficha de muestreo se encuentra en el Anexo 1.

- Se colectaron un total de 164 muestras de sangre, una muestra por animal seleccionado al azar que reunía las condiciones establecidas.
- Después de la sangría los tubos se mantuvieron en posición inclinada y bajo refrigeración (4 a 8 °C), colocados en gradillas hasta la formación del coágulo, acomodados en termos apropiados con hielo hasta su llegada al laboratorio del SENASA – Tacna.
- En el laboratorio del SENASA - Tacna se procedió a separar y transferir los sueros sanguíneo a viales especiales debidamente rotulados para posteriormente ser almacenados a temperatura de congelación (-20 °C).
- La transferencia de los sueros a los viales se realizó en el transcurso de las 12 horas de tomada la muestra, utilizando una pipeta desechable una vez desprendido el coágulo, se incluyó aproximadamente 3,0 ml de suero sanguíneo en cada vial.
- Los viales conteniendo los sueros, cerciorándose de que las tapas estén bien cerradas, fueron desinfectados a través de la inmersión en una solución de ácido cítrico al 0,2% antes del embalaje.
- Luego se embolsó adecuadamente en una caja de tecnopor, con geles refrigerantes para su conservación a temperatura de refrigeración hasta su llegada al laboratorio del SENASA - Lima.
- Las muestras de suero fueron analizadas en el laboratorio del SENASA - Lima.

3.2.3.2. Trabajo de laboratorio

El análisis de las muestras se realizó en el laboratorio del SENASA - Lima. Se utilizó un kit comercial de ELISA de captura de antígenos de nombre, HerdChek BVDV-Ag/Suero Plus, siguiendo meticulosamente las instrucciones del fabricante (IDEXX, 2005). El manual de instrucciones se encuentra en el Anexo 3.

3.2.4. Métodos y Técnicas de análisis de datos

Para determinar la seroprevalencia de animales (PI), los datos, que son los resultados de la prueba (ELISA de captura), estarán dados como positivos (PI) y como negativos. Estos datos fueron ordenadamente registrados en una tabla Excel para su posterior análisis.

3.2.4.1. Determinación de la Seroprevalencia de animales (PI)

Para determinar la Seroprevalencia de animales (PI) " P_{PI} " en bovinos del distrito de Locumba, considerando la seropositividad de los sueros a la prueba ELISA de captura, se utilizó la siguiente fórmula:

$$P_{PI} = \frac{N^{\circ} \text{ de muestras positivas}}{N^{\circ} \text{ total de muestras}} \times 100$$

Los resultados de seroprevalencia de animales (PI) fueron presentados en tablas de contingencia para su respectivo análisis estadístico.

3.2.4.2. Prueba de Chi cuadrado

Se realizó un análisis de frecuencias en la que se utilizó la prueba no paramétrica de Chi cuadrado, para determinar la asociación o independencia entre variables. El cálculo del valor Chi cuadrado se efectuó utilizando el software Minitab versión 15.

IV. RESULTADOS

SEROPREVALENCIA GENERAL

TABLA I. Seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba.

Nº DE MUESTRAS	POSITIVOS		NEGATIVOS	
	Nº	%	Nº	%
164	1	0,61	163	99,39

En la Tabla I, se observa que solo 1 de los 164 bovinos en estudio resultó positivo o persistentemente infectado (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), en el distrito de Locumba, con una seroprevalencia de animales (PI) de 0,61%, mientras que los negativos fueron el 99,39%.

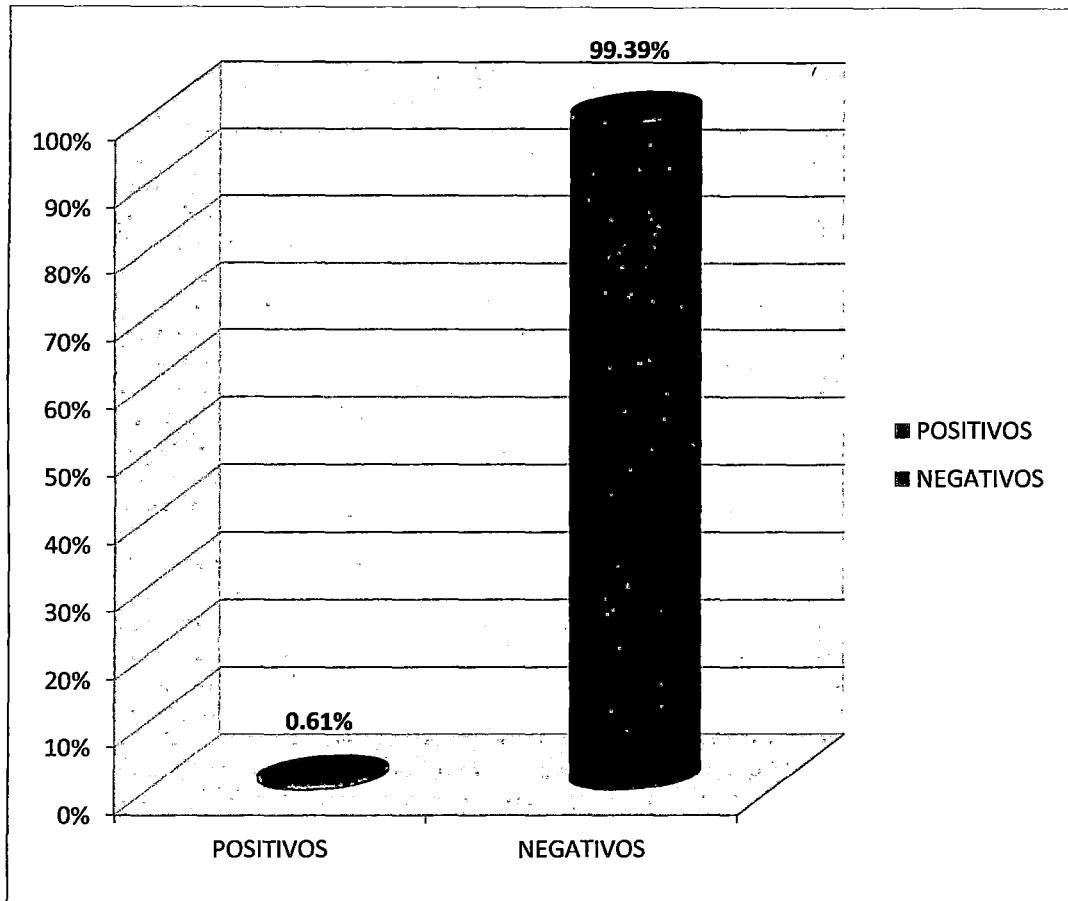


FIGURA 1. Seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba.

En la Figura 1, se observa que el 0,61% de los bovinos en estudio resultó positivo o persistentemente infectado (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), mientras que el 99,39% resultaron ser negativos.

SEROPREVALENCIA SEGÚN EDAD

TABLA II. Seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba, según edad.

GRUPOS ETARIOS (meses)	POSITIVOS		NEGATIVOS		TOTAL
	Nº	%	Nº	%	Nº
4-8	0	0	55	100	55
9-12	0	0	53	100	53
13-15	0	0	8	100	8
16 - 30	1	2,08	47	97,92	48
TOTAL	1	0,61	163	99,39	164

$$\chi^2 = 2,431 \text{ (GL = 3 ; } \chi_{\alpha=0.05}^2 = 7,815) \text{ N.S.}$$

En la Tabla II, se observa que según edad, en los grupos etarios de 4-8, 9-12 y 13-15 la seroprevalencia de animales (PI) es de 0%, mientras que en el grupo etario 16-30 resulto 1 caso positivo que representa el 2,08%, valores sometidos a la prueba estadística de Chi-cuadrado se determinó que existen grupos homogéneos entre las edades de 4 a 30 meses.

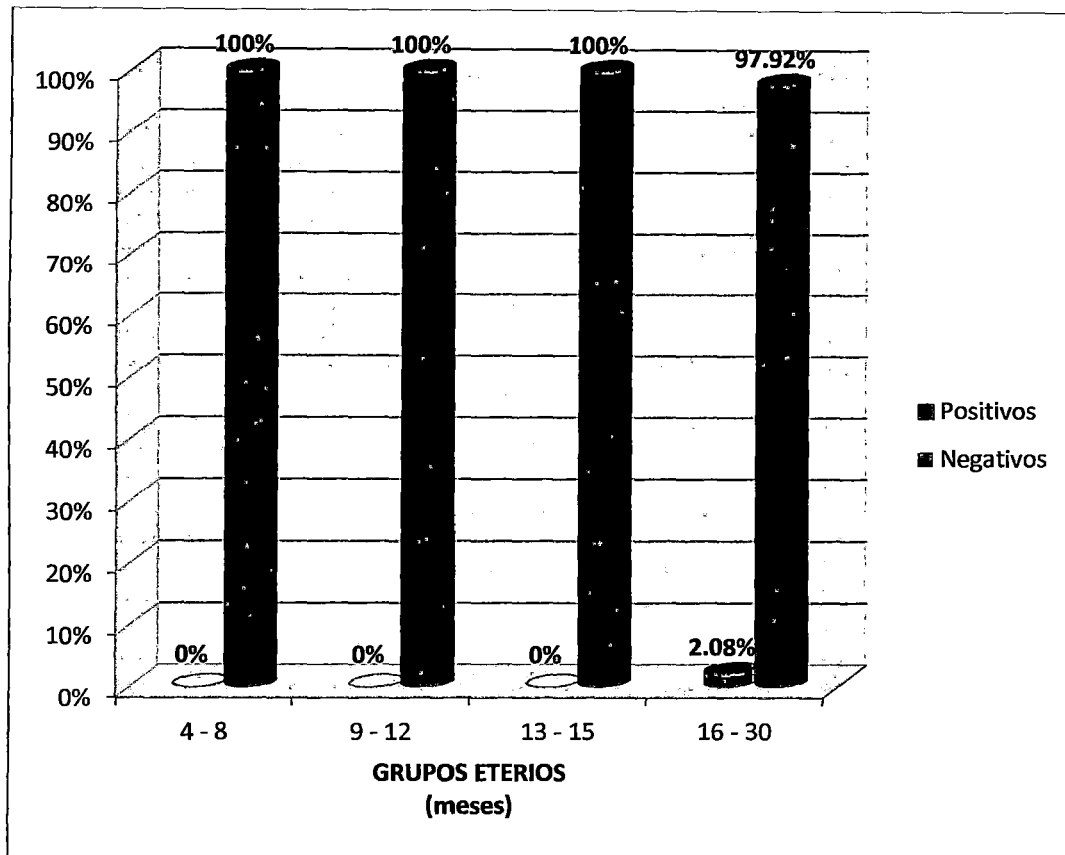


FIGURA 2. Seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba, según edad.

En la Figura 2, se observa que según edad, en los grupos etarios de 4-8, 9-12 y 13-15 la seroprevalencia de animales (PI) es de 0%, mientras que en el grupo etario 16-30 la seroprevalencia de animales (PI) es de 2,08%.

SEROPREVALENCIA SEGÚN SEXO

TABLA III. Seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de locumba, según sexo.

SEXO DEL BOVINO	POSITIVOS		NEGATIVOS		TOTAL
	Nº	%	Nº	%	Nº
Machos	0	0	15	100	15
Hembras	1	0,67	148	99,33	149
TOTAL	1	0,61	163	99,39	164

$$\chi^2 = 1,01 \text{ (GL = 1 ; } \chi_{\alpha=0.05}^2 = 3,84) \text{ N.S.}$$

En la Tabla III, se observa que según sexo, la seroprevalencia de animales (PI) en hembras es de 0,67% (1/148), mientras que en machos es de 0% (0/15), valores sometidos a la prueba estadística de Chi - cuadrado se determinó que existen grupos homogéneos entre machos y hembras.

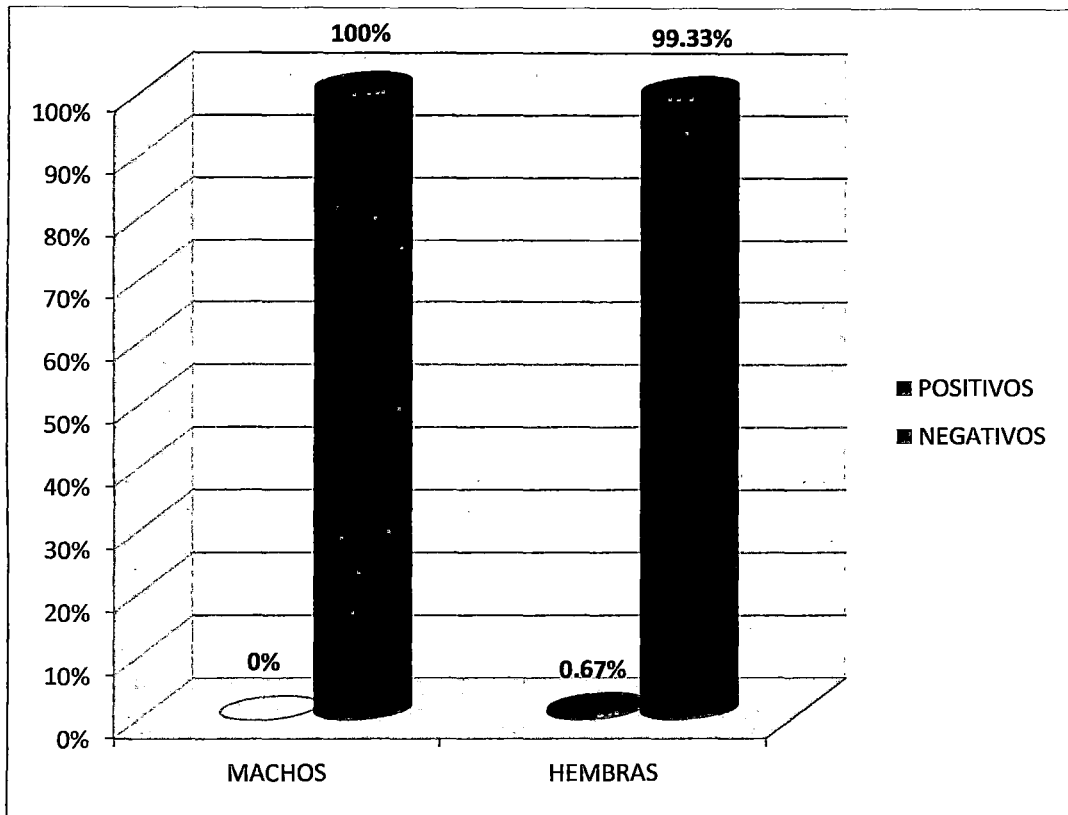


FIGURA 3. Seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba, según sexo.

En la Figura 3, se observa que según sexo, la seroprevalencia de animales (PI) en machos es de 0% mientras que la seroprevalencia de animales (PI) en hembras es de 0,67%.

V. DISCUSIÓN

Estudios anteriores, reportan que el (VDVB) se encuentra ampliamente difundido en las principales cuencas lecheras y valles interandinos del país, (Olivera, 2000; Chacón, 2001; Morales, 2002; Jayashi, 2004; Huamán, 2006; Quispe *et al.*, 2008; Mamani, 2010; Cárdenas *et al.*, 2011), sin embargo, en la zona ganadera del distrito de Locumba, la seroprevalencia de animales (PI), no había sido establecida, a pesar de existir reportes de problemas reproductivos como infertilidad, abortos, etc. (Mamani, 2010).

El resultado de la presente investigación reporta una seroprevalencia de animales (PI) de 0,61% (1/164).

Los resultados obtenidos, tienen similitud a los reportados por Olivera, (2000) en Arequipa, con una seroprevalencia de animales (PI) de 0,9% (3/345), a los reportados por Chacón, (2001) Lima, con una seroprevalencia de animales (PI) de 2,0% (4/208), a los reportados por Morales, (2002) en Arequipa, con una seroprevalencia de terneras (PI) de 0,76% (1/131), a los reportados por Jayashi, (2004) en Arequipa, con una seroprevalencia de vaquillas (PI) de 2,7% (2/73), a los reportados por Huamán, (2006) en Majes - Arequipa, con una seroprevalencia de

animales (PI) de 2,7% (4/151) y a los reportados por Mamani, (2010) en Inclán - Tacna, con una seroprevalencia de animales (PI) de 1,68% (19/1129).

Estas similitudes probablemente se pueden atribuir, a que en la zona de estudio existe introducción 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 (DVB).

Por otro lado, los resultados son discordantes a los reportados por Quispe *et al.*, (2008), en Melgar - Puno, en donde no detectaron animales (PI), asimismo, Cárdenas *et al.*, (2011), en Espinar - Cusco, no detectaron animales (PI). La ausencia de animales (PI) en el momento del muestreo pudo deberse a que se muestrearon animales mayores de 6 meses y usualmente estos animales mueren durante los primeros meses de edad, debido a infecciones secundarias del tracto respiratorio o gastrointestinal. Además, por las condiciones medioambientales en estas zonas altoandinas, los terneros (PI) tienen menos oportunidad de sobrevivir. En las cuencas lecheras como Lima y Arequipa, donde el sistema de crianza es mayormente intensivo o semi-intensivo, los animales (PI) son detectados en animales que pueden llegar hasta el primer parto (Chacón, 2001; Huamán, 2006).

Respecto a la edad, en el presente trabajo de investigación se detectó solo un animal (PI) en el grupo etario de 16 a 30 meses, con una seroprevalencia de 2,08% (1/48).

Los resultados obtenidos con respecto a la edad, tienen una similitud a los reportados por Mamani, (2010), en el distrito de Inclán - Tacna, con una seroprevalencia de animales (PI), entre las edades de 16 a 24 meses de 2,22% (7/315). También a lo reportado por Chacón, (2001), en la cuenca de Lima, en una crianza intensiva, encontrándose una seroprevalencia de animales (PI), entre las edades de 12-18 meses de 2%. Además según Houe, (1999), informa que la diseminación del (VDVB) en estos animales puede ser tan grande que en 3 a 4 meses son capaces de infectar al 90% de los animales con los que conviven.

Estas similitudes probablemente se atribuyen a que es justamente en ese rango de edad, en que las vacas son más susceptibles, ya que han sido mayormente manipuladas durante el manejo productivo y reproductivo.

Respecto al sexo, en el presente trabajo de investigación, el único animal (PI) detectado pertenecía al grupo de las hembras, con una seroprevalencia de 0,67% (1/149).

Los resultados de la presente investigación, con respecto al sexo, difieren a los reportados por Mamani, (2010), en el distrito de Inclán -

Tacna, que reportó una seroprevalencia de machos (PI) de 1,99% (7/351) y hembras (PI) de 1,54% (12/778).

Estas diferencias probablemente se deban a que Mamani, (2010), realizó el estudio en el 100% de los bovinos de ambos sexos (n=1129) y no como en el caso del presente estudio que se realizó en un tamaño muestral (n=164). Además, estas diferencias pueden deberse a que en la zona estudiada, existe una creciente tendencia a usar inseminación artificial para la reproducción del ganado bovino lechero y esto debido a los continuos proyectos pecuarios ejecutados por la municipalidad distrital de Locumba, mientras que en muchos sectores del distrito de Inclán, aún se usa la monta natural.

La detección de sólo 0,61% (1/164) animales (PI), en los hatos estudiados, prevalencia relativamente baja, podría deberse a varios factores que evitaron la detección de estos animales (PI) tales como: su eliminación temprana del hato, muerte por infecciones secundarias o porque no fueron identificados al usarse un muestreo aleatorio. Si bien, la prueba de ELISA de captura tiene un alta especificidad > 99,7% y una sensibilidad próxima al 100% (Wolf, 2007; Van Maanen, 2001; IDEXX, 2005), no garantiza la detección de todos los animales (PI), si durante la toma de muestra no hubiera suficiente antígeno o virus circulante (Van Maanen, 2001). Por lo tanto cabe la posibilidad de que hubiera más

animales (PI), ya que los datos mostrados en el presente estudio, son sólo referenciales y demostrativos.

5.1. Contrastación de hipótesis

Se rechaza la hipótesis planteada (H_0) y se acepta la hipótesis alterna (H_1), puesto que a la Prueba de Chi-cuadrado, el nivel de significancia (S) es igual a ($S = 0,000$), concluyendo que la presentación de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), en bovinos del distrito de Locumba, es menor a 1,68%, encontrándose en el presente estudio una seroprevalencia de animales (PI) de 0,61%.

VI. CONCLUSIONES

Se llegaron a las siguientes conclusiones:

1. La seroprevalencia de animales persistentemente infectados (PI) con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos del distrito de Locumba, fue de 0,61% (1/164).
2. Según edad, el único animal (PI) fue detectado en el grupo etario de 16 a 30 meses, con una seroprevalencia de animales (PI) de 2,08% (1/48), y según sexo, el único animal (PI) fue detectado en el grupo de las hembras, con una seroprevalencia de animales (PI) de 0,67% (1/149).

VII. RECOMENDACIONES

A las autoridades sanitarias, a los ganaderos y a la comunidad científica, se hace las siguientes recomendaciones:

1. A las autoridades sanitarias: realizar campañas de difusión, sobre el impacto económico que ocasiona la (DVB) en la ganadería bovina y sobre las estrictas medidas de bioseguridad que se deben adoptar para controlar y erradicar la enfermedad.
2. A los ganaderos: identificar los animales (PI) y eliminarlos del hato, además de adoptar estrictas medidas de bioseguridad en coordinación con las autoridades sanitarias.
3. A la comunidad científica: identificar los factores epidemiológicos que condicionan la presencia del (VDVB) en el ganado bovino del distrito de Locumba y en el futuro realizar estudios similares incluyendo bovinos de ambos sexos, cuyas edades sean de 4 meses a más.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. BAKER, J. (1987). Bovine Viral Diarrhea Virus: A Review. JAVMA 190 (11): 1449-1458.
2. BAKER, J. (1990). Clinical aspects of bovine virus diarrhea virus infection, Rev Sci Tech Off Int Epi 1990; 9: 25-41.
3. BAKER, J. (1995). The clinical manifestation of Bovine Viral Diarrhea infection in BVD virus. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Practice 11: 425-445.
4. BOCK, R.; RODWELL, B. (1997). Detection of calves persistently infected with bovine pestivirus in a sample of dairy calves in South-Eastern Queensland. Aust Vet J 75(9):656-659.
5. BOLIN, S. (1995a). The pathogenesis of Mucosal disease. In: Bovine viral diarrhea virus. Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice 11(3):489-500.
6. BROWNLIE, J. (1991). The pathways for bovine virus diarrhea virus biotypes in the pathogenesis of disease. Arch. Virol. 3:79-96.
7. BROWNLIE, J.; BOOTH, M.; STEVENS, M. (1997). Expression of non-cytopathogenic (BVDV) in oocytes and follicles of persistently infected cattle. Vet Record 141:335-337.

8. BROWNLIE, J.; HOOPER, L; THOMPSON, I.; COLLINS, M. (1998). Maternal recognition of fetal infection with (BVDV)-the bovine pestivirus. *Clin and Diag Virol* 10:141-150.
9. CÁRDENAS, C.; RIVERA, H.; ARAÍNGA, M. (2011). Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina y de animales portadores del virus en bovinos en la provincia de espinar, Cusco. *Rev. investig. vet. Perú*, jul./sep. 2011, vol.22, no.3, p.261-267. ISSN 1609-9117.
10. CHACÓN VILLANUEVA, J. (2001). Identificación de animales persistentemente infectados con el virus de la diarrea viral bovina en dos establos lecheros de crianza intensiva en Lima. Tesis Bachillerato. Fac Med. Vet Univ. Nac. Mayor San Marcos. Lima - Perú. 54 Pág.
11. CHI, J.; VANLEEUEWEN, J.; WEERSINK, A.; KEEFE, G. (2002). Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum*, *Prev Vet Med.* 2002 Sep 30;55(2):137–53.
12. CHILDS, T. (1946). X disease in cattle. *Can J Comp Med* 10: 316-319.
13. DUFFELL, S.; SHARP, M.; BATES, D. (1986). Financial loss resulting from BVD-MD virus infection a dairy herd, *The Veterinary Record* 1986 Jan 11;118(2);38–39.

14. FREDRIKSEN, B.; SANDVIK, T.; LOKEN, T. (1999). Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 144: 111-114.
15. FULTON, R.; PURDY, C.; CONFER, A.; SALIKI, J.; LOAN, R. (2000). Bovine viral diarrhoea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res* 64:151-159.
16. HESSMAN, B. (2006). Effects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) persistently infected (PI) calves in the feedyard and management of PI calves after initial identification. Oral presentation by the author at the BVDV Control; The Future is Now conference, Denver, Colorado, USA.
17. HOUE, H. (1995). Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Practice* 11: 521-547.
18. HOUE, H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64: 89-107.
19. HOUE, H. (2003). Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 31: 137-143.
20. HUAMÁN, G. (2006). Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina y animales persistentemente infectados con el virus, en hatos

- productores de leche de la irrigación de Majes, Arequipa. Tesis Bachillerato. Fac Med Vet Univ Nac Mayor San Marcos. Lima - Perú. 44 Pág.
21. IDEXX Laboratories (2005). Bovine Viral Diarrhea Virus Antigen Serum/Plus Test Kit Validation Data Report. Westbrook, Maine. Disponible en los archivos de IDEXX Laboratories, Inc.
22. JAYASHI FLORES, C. (2004). Dinámica de Seroconversión en Terneras y Vaquillas Post eliminación de animales portadores del Pestivirus Bovino en un Hato Lechero de Arequipa en un Período de Doce Meses. Tesis Bachillerato. Fac Med Vet Univ Nac Mayor San Marcos. Lima - Perú. 45 Pág.
23. KIRKLAND, P.; RICHARDS, S.; ROTHWELL, J. (1991). Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet Rec* 128, 587-90.
24. LÉRTORA, W. (2003). Diarrea Viral Bovina: Actualización. Cátedra de Patología General y Sistemática, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina. *Rev. Vet.* 14: 1, 2003.
25. MAMANI GARCÍA, R. (2010). Determinar la seroprevalencia de antígenos de animales persistentemente infectados con la

- diarrea viral bovina (DVB) en bovinos del distrito de Inclán, valle de Sama, región de Tacna - 2009. Tesis Bachillerato. Fac. Cienc. Agrop. Esc. Med. Vet. y Zoot. Univ. Nac. Jorge Basadre Grohmann. Tacna - Perú. 126 Pág.
26. MCCLURKIN, A.; LITLEDIKE, E; CUTLIP, R.; Frank, G. (1984).
Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus.
Can J Comp Med 48: 156-161.
27. MCGOWAN, M.; KIRKLAND, P. (1995). Early reproductive loss due to
bovine pestivirus infection. Br Vet J. 151(3):263-270.
28. MEYERS, G.; TAUTZ, N.; Dubovi, E.; Stark, N.; Brownlie, J. (1991).
Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic
pestiviruses. Virology. 191(2):368-386.
29. MINAG (2008). Ministerio de Agricultura. Dirección Regional Sectorial
Agraria Tacna. Anuario Estadístico Agrario Regional 2008.
Tacna – Perú.
30. MOENNIG, V.; EICKEN, K.; FLEBBE, U. (2005). Implementation of
two-step vaccination in the control of BVD. Prev Vet Med:
72:109-114.
31. MORALES CAUTI, S. (2002). Detección de terneros con infección
congénita con el virus de la diarrea viral bovina en dos hatos
lecheros de la provincia de Arequipa. Tesis Bachillerato. Fac
Med Vet Univ Nac Mayor San Marcos. Lima - Perú. 50 Pág.

32. MORÁN, P.; DI SANTO, M.; GOGORZA, L. (2006). Transmisión del virus de la diarrea viral bovina. Factores de riesgo en el ingreso y diseminación en los rodeos. *Rev Vet* 2006; 17 (1) :50-56.
33. MURRAY, R. (2001). Estadística. Tercera Edición. McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V. México. D.F.
34. MURPHY, F.; FAUQUET, C.; BISHOP, H.; GHABRIALK S. (1995). *Flaviviridae, Virus taxonomy*. Springer, New york, pp 415-427.
35. NJAA, B. *et al.* (2000). Diagnosis of Persistent Bovine Viral Diarrhea Virus Infection of Inmunohistochemical Staining of Formalin – Fixed Skin Biopsy Specimens. *J Vet Diagn Invest* 12: 393-399.
36. OLAFSON, P.; MACCALLUM, A.; FOX, A. (1946). An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet* 36: 205-213.
37. OLIVERA, L. (2000). Sanidad del ganado lechero de la cuenca del sur. *Rev. Inv. Vet. Perú* 12(2): 78-86.
38. ONSALUS (2012). OnSalus.com. Diccionario médico virtual. <http://www.onsalus.com/diccionario/seroprevalencia/27371>.
Fecha de visita, 12-04-2012.
39. PATON, D. (1995). Pestivirus diversity. *J Comp Path.* 112:215-236.
40. QUISPE, R.; CCAMA, S.; RIVERA, H. *et al.* (2008). El virus de la diarrea viral en bovinos criollos de la Provincia de Melgar, Puno. *Rev. Investig. Vet. Perú*, jul./dic. 2008, vol.19, no.2, p.176-182. ISSN 1609-9117.

41. RAMSEY, F.; CHIVERS, W. (1953). Mucosal disease of cattle. *Nth amer. Vet.*, 34, 629 - 633.
42. RIDPATH, J.; NEILL, J.; FREY, M.; LANDGRAF, J. (2000). Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 bvdv from North America. *Vet Microbiol.* 77:145-155.
43. ROJAS, M. (2006). Libro Electrónico. Manual de Redacción Científica. http://www.unsch.edu.pe/investigaciones/manual_investigacion_y_redaccion.pdf. Fecha de visita: 20-07-2012.
44. SANDVIK, T. (1999). Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet Microbiol.* 64:123-134.
45. SANJUAN, M.; GARCÍA, C.; CORRALES, J. (1999). Etiopatogenia de la diarrea vírica bovina: aspectos de interés. En E.Yus y M.L. Sanjuán. Eds. *Diarrea vírica bovina*. Consejo General de Médicos Veterinarios de España. 24:9-24.
46. SENAMHI (2012). Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología Dirección Regional Tacna – Moquegua.
47. TAUTZ, N.; THIEL, E.; DUBOBI, J.; MEYERS, G. (1994). Pathogenesis of mucosal disease: a citophagenic pestivirus generated by a internal deletion. *J Virol* 68: 3289.
48. TIZARD, I. (2009). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. 8va. Ed. Editorial Elsevier. Barcelona, España.

49. TRAVÉN, M.; ALENIUS, S.; FOSSUM, C.; LARSSON, B. (1991).
Primary bovine viral diarrhoea virus infections in calves following
direct contact with a persistently viraemic calf. *J Vet Med* 38:
435-462.
50. VAN OIRSCHOT, J.; BRUSCHKE, C. (1999). Vaccination of cattle
against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol* 64:169-183.
51. VAN MAANEN, C. (2001). Deventer Validation Report-Bovine Viral
Diarrhoea Virus (BVDV) Antigen Detecting ELISAs. Deventer,
Holanda. Servicio de Sanidad Animal.
52. VANROOSE, G; NAUWINCK, H. (1998). Replication of Cytopathic and
Noncytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus in Zona - Free and
Zona - Intact In Vitro - Produced Bovine Embryos and the Effect
on Embryo Quality. *Biology of Reproduction*. 58: 857 - 866.
53. VEGA, S.; ROSELL, R.; PATON, J.; ORDEN, J. (2000). Antigenic
characterization of bovine viral diarrhoea virus isolates from
Spain with monoclonal antibodies. *J Vet Med* 47: 701-706.
54. WOLF, G. (2007). The perfect BVDV diagnosis en actas del:
Symposium on Diagnosis of BVDV in Ear Notch Samples.
Stendal, Alemania.

ANEXOS

ANEXO 1
FICHA DE MUESTREO

Ficha N°:.....

Sector:.....

Nombre del Propietario:.....

Dirección:.....

Fecha de colección de muestras:

DATOS DE LAS MUESTRAS

N°	Código de la muestra	ID del animal	Edad	Sexo
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

Observaciones:

.....
.....

ANEXO 2

POBLACIÓN

Población de ganado vacuno por sectores y según categoría
en el distrito de Locumba - 2008

SECTOR	Nº DE VACAS	Nº DE VAQ.	Nº DE TORETES	CRÍAS MACHOS	CRÍAS HEMBRAS	TOTAL CABEZAS
AURORA	91	64	9	11	29	204
SITANA	40	24	8	0	11	83
PIÑAPA	41	28	6	2	22	99
CONOSTOCO	4	0	10	0	1	15
LOCUMBA	27	11	6	2	8	54
CHAUCALANA	87	43	32	19	37	218
SAGOLLO	42	23	40	15	26	146
CHIPE	48	25	29	5	17	124
TOTAL	380	218	140	54	151	943

Fuente: MINAG – DIA (2008)

MUESTRA

Muestreo según sectores

SECTORES	Nº total de bovinos	Nº de bovinos muestreados
AURORA	204	48
SITANA	83	8
PIÑAPA	99	23
CONOSTOCO	15	3
LOCUMBA	54	20
CHAUCALANA	218	31
SAGOLLO	146	16
CHIPE	124	15
TOTAL	943	164

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 3

MANUAL DE INSTRUCCIONES

(HerdChek BVDV-Ag/Suero Plus)

Kit para la detección de antígenos del virus de la Diarrea Virica Bovina (BVDV)/Suero Plus HerdChek® BVDV Ag/Suero Plus

Nombre y uso previsto

HerdChek BVDV-Ag/Suero Plus es un ensayo inmunoenzimático de IDEXX para la detección de antígenos del virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) a partir de muestras de suero, de plasma, o de sangre entera o de tejidos de muesca de oreja.

Información general

El Virus de la Diarrea Virica Bovina (BVDV), el Virus de la Enfermedad de la Frontera (Border Disease, BDV) y el Virus de la Peste Porcina Clásica (CSFV) pertenecen al género Pestivirus, de la familia Flaviviridae. El BVDV es uno de los virus más patógenos de la especie bovina y causa pérdidas considerables en la ganadería de vacuno de leche y carne en todo el mundo. Los síntomas típicos de la infección por BVDV son diarrea, fiebre, seguida de un descenso en la producción lechera. Su efecto de inmunosupresión puede potenciar infecciones por otros microorganismos. El virus puede atravesar la barrera placentaria en vacas gestantes infectadas, comportando pérdidas reproductivas debidas a abortos, terneros nacidos muertos o de muerte precoz. Algunos de los terneros que sobreviven son inmunotolerantes y excretan grandes cantidades de virus infecciosos durante el resto de su vida. Es importante identificar las crías "portadoras" para interrumpir el ciclo de infecciones en los rebaños. Estos animales portadores suelen morir de la Enfermedad de las Mucosas durante los primeros dos años de vida. Debido a la infección en el útero, el virus BVDV es un contaminante frecuente de productos biológicos tales como vacunas y medicamentos. El virus de la Border Disease o Enfermedad de la Frontera (BDV) produce una enfermedad similar en las ovejas, mientras que el de la peste porcina clásica (CSFV), provoca serias pérdidas económicas por su alta patogenicidad y por causar tasas de mortalidad muy altas. Este kit sólo es para diagnóstico veterinario in vitro.

Descripción/Principios

HerdChek BVDV-Ag/Suero Plus es un inmunoensayo enzimático diseñado para detectar antígenos (Ag) en suero, plasma, sangre entera y tejido de muesca de oreja. Se ha configurado un formato de placas de microtitulación tapizadas con anticuerpos monoclonales específicos de BVDV (E^{ns}). El antígeno del BVDV de la muestra es capturado en las placas. Tras incubación de la muestra en el pocillo, el antígeno es detectado por anti-cuerpos específicos y conjugado de peroxidasa de rábano picante. Después se lava el conjugado sin enlazar para eliminarlo y se añade una solución de sustrato/cromógeno. En presencia del enzima, el sustrato se convierte en un producto que reacciona con el cromógeno, generando una coloración azul. Con la adición de la solución de frenado se genera un color amarillo. La absorbancia se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda única de 450 nm [A(450)] o doble de 450 nm y 650 nm [A(450/650)]. El valor de la densidad óptica (DO) corregida de las muestras se calcula usando la absorbancia [A(450)] o [A(450/650)] obtenida con la muestra del ensayo y corregida con la absorbancia del control negativo.

Reactivos

Conservar todos los reactivos entre 2° y 8°C

	Volumen	Volumen
1. Placas/liras de microtitulación tapizadas con anticuerpos monoclonales E ^{ns}	2 placas	5 placas
2. Control positivo	1 ml	2 ml
3. Control negativo	1 ml	2 ml
4. Conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRPO)	25 ml	60 ml
5. Solución tamponada (buffer) para sumergir la muesca de oreja (10x)	10 ml	10 ml
6. Anticuerpos de detección	15 ml	30 ml
A. Solución de lavado concentrada (10x)	125 ml	480 ml
B. Solución de sustrato TMB, solución de TMB/H ₂ O	30 ml	60 ml
C. Solución de frenado—1 M HCl (ATENCIÓN! Es un ácido fuerte)	30 ml	60 ml

Continúa página siguiente

Viene página anterior

Materiales necesarios pero no suministrados

- Pipetas de precisión monocal canal o multicanal apropiadas para distribuir de 10 a 1000 µl.
- Puntas de pipeta desechables
- Cilindro graduado de 500 ml para la solución de lavado
- Lector de microplacas
- Agua destilada o desionizada
- Dispositivo para la aplicación y aspiración de solución de lavado
- Trampa de retención de aspirado y desinfectante
- Cámara húmeda o selladores de placas
- Agitador vortex
- Tubos para sumergir las muescas de oreja

Precauciones a tomar y advertencias a los usuarios

- Maneje todo el material biológico como material potencialmente infectado.
- No use la boca para pipetear.
- No coma, beba ni fume en los lugares donde se esté trabajando con las muestras o los reactivos del kit.
- La solución del sustrato irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel. Evite el contacto con la piel y los ojos.
- La solución de frenado contiene HCl 1 M y puede producir quemaduras.
- No exponga la solución TMB a una luz intensa ni a agentes oxidantes. Maneje dicha solución con material limpio de plástico o vidrio.
- Almacene todos los reactivos entre 2° y 8°C. Deje que adquieran la temperatura ambiente (de 18° y 25°C) antes de utilizarlos, y refrigérelos de nuevo a entre 2° y 8°C después del uso.
- Todo el material usado deberá descontaminarse adecuadamente antes de su eliminación.
- Manipule con cuidado los componentes del kit para evitar contaminaciones.
- No use componentes que hayan caducado y no mezcle componentes de diferentes lotes.
- Obtendrá resultados óptimos si sigue escrupulosamente este protocolo. Para mantener la precisión y reproducibilidad es necesario un pipeteo correcto, respetar los tiempos de incubación y un lavado adecuado.
- Los dos controles deben usarse para cada serie de ensayos.
- Utilice sólo agua desionizada o destilada para la preparación de los reactivos que se empleen en el ensayo.
- Los pocillos que no se usen deberán almacenarse bien cerrados dentro de su bolsa de plástico entre 2° y 8°C.
- Sólo para uso veterinario.

Preparación de los reactivos

Solución de lavado

La solución de lavado concentrada (10x) debe dejarse que adquiera la temperatura ambiente y agitarse para asegurar la disolución de posibles sales precipitadas. Esta solución deberá diluirse 1/10 con agua destilada/desionizada antes de emplearla (por ej., 30 ml de concentrado más 270 ml de agua por placa a analizar). Preparándose en condiciones estériles, la solución de lavado puede almacenarse durante una semana entre 2° y 8°C.

Solución tamponada (buffer) para sumergir la muesca de oreja

La solución tamponada (buffer) para sumergir la muesca de oreja a concentración 10x debe de agitarse y debe de alcanzar temperatura ambiente antes de ser utilizada. La solución tamponada (buffer) para sumergir la muesca de oreja debe de diluirse a una proporción 1:10 con agua destilada/desionizada antes de usarse (por ejemplo 1,5 ml de concentrado más 13,5 ml de agua para analizar 92 muestras). La solución tamponada (buffer) para sumergir la muestra puede almacenarse refrigerada durante dos semanas.

Continúa página siguiente

Viene página anterior

Preparación de las muestras

Pueden analizarse muestras frescas o congeladas de suero, plasma, sangre entera o muesca de oreja.

Muestras de muesca de oreja:

- Utilice recipientes para la muesca de la oreja (muestras) de unos 2–3 mm de diámetro (por ejemplo tome la muestra cuando se apliquen en la oreja los cortales, provistos de un dispositivo para la toma de muestra).
- Transfiera la muesca de la oreja del dispositivo a un tubo de dilución. Son preferibles los tubos de dilución de pequeño tamaño, hasta unos 500 µl, con forma cónica.

NOTA: sólo pueden utilizarse muestras de muesca de oreja frescas; muestras que hayan sido correctamente conservadas mediante desecación o muestras congeladas. No deben de usarse tejidos macerados para la prueba.

- Añada 150 µl de 1x Solución tamponada (buffer) para sumergir la muesca de oreja. Asegúrese de que toda la muestra quede cubierta por la solución (sacudir con cuidado o agitar).
- Cierre el tubo y deje las muestras sumergidas durante la noche a una temperatura de 2°–8°C.
- Mezcle la solución con una pipeta antes de aspirar los 50 µl de la solución necesarios para la prueba.

NOTA: la solución restante puede separarse del tejido de la muesca de oreja y conservarse congelada (-20°C) para pruebas posteriores o si necesita repetirse la prueba.

Protocolo del ensayo

Debe dejarse que todos los reactivos adquieran la temperatura ambiente (de 18° a 25°C), antes de usarlos. Los reactivos deberán mezclarse agitándolos o volteándolos suavemente. Use una punta de pipeta diferente para cada muestra.

1. Tome la placa(s) tapizada(s) y marque la posición de la muestra en una hoja de trabajo.
2. Dispense 50 µl de los anticuerpos de detección en cada pocillo. En esta operación puede usarse una pipeta multicanal (8 o 12 canales).
3. Dispense 50 µl de control negativo en los pocillos apropiados.
4. Dispense 50 µl de control positivo en los pocillos apropiados.
5. Dispense muestras de 50 µl en los pocillos restantes. Use una punta de pipeta diferente para cada muestra.
6. Mezcle el contenido de los pocillos golpeando levemente la placa o use un agitador de placas de microtitulación.
7. Incube durante 2 horas a 37°C o toda la noche (12–18 horas) entre 2°C y 8°C (en un refrigerador). En cualquier opción de incubación, las placas deben sellarse firmemente para evitar evaporaciones, o incubarse en una cámara húmeda.
8. Aspire los contenidos líquidos de los pocillos en un recipiente de desechos apropiado.
9. Lave cada pocillo con aproximadamente 300 µl de solución de lavado cinco veces. Aspire los contenidos líquidos de todos los pocillos después de cada lavado. Después de la aspiración final, elimine el fluido de lavado residual de cada placa golpeándola sobre material absorbente. Evite que las placas se sequen entre los lavados y antes de añadir el reactivo siguiente.
IMPORTANTE! Controle cuidadosamente que no queden rastros de sangre en las paredes o bordes de los pocillos. Para eliminar la sangre antes de pasar a la siguiente fase puede ser necesario realizar 2 ó 3 lavados más.
10. Dispense 100 µl de conjugado en cada pocillo.
11. Incube durante 30 minutos a la temperatura ambiente (18° y 25°C).
12. Repita los pasos 8 y 9.
13. Dispense 100 µl de solución de sustrato TMB en cada pocillo.
14. Incube 10 minutos a la temperatura ambiente (de 18° y 25°C) en la oscuridad. Empiece a cronometrar después de llenar el primer pocillo.
15. Para detener la reacción, dispense 100 µl de solución de frenado en cada muestra. Añada la solución de frenado en el mismo orden en que añadió la solución de sustrato en el paso 13.
16. Calibre el espectrofotómetro en aire.
17. Mida y anote la absorbancia de las muestras y controles a 450 nm o usando doble longitud de onda, a 450 nm y 650 nm.
18. Calcule los resultados.

Continúa página siguiente

Viene página anterior

Resultados

Para que el ensayo sea válido, la diferencia (P - N) entre la media del control positivo (PCx) y la media del control negativo (NCx) debe ser mayor o igual a 0,150 de densidad óptica (DO). Además, la media del control negativo (NCx) debe ser inferior o igual a 0,250 DO.

En los ensayos no válidos, debe sospecharse de la técnica, y el ensayo tiene que repetirse siguiendo una revisión metódica del material suministrado.

La presencia o ausencia de antígenos de BVDV en la muestra se determina mediante el valor de la densidad óptica corregida (M - N) de cada muestra.

Para ejemplos, vea "Cálculos."

NOTA: IDEXX tiene a disposición instrumentos y sistemas de software para el cálculo de valores medios y diferencias M - N, y la elaboración de resúmenes de datos.

Cálculos

Cálculo de la media del control negativo (NCx)

$$NCx = \frac{NC1 A450 + NC2 A450}{2}$$

Ejemplo:

$$\frac{0,056 + 0,060}{2} = 0,058$$

Cálculo de la media del control positivo (PCx)

$$PCx = \frac{PC1 A450 + PC2 A450}{2}$$

Ejemplo:

$$\frac{1,100 + 1,090}{2} = 1,095$$

Cálculo del resultado de las muestras analizadas

$$M - N = \text{Muestra } A450 - NCx A450$$

Ejemplo: resultado de las muestras 1,558

$$M - N = 1,558 - 0,058 = 1,500$$

Interpretación de los resultados

Muestras de suero, plasma o sangre entera

1. Las muestras con valores M - N iguales o inferiores a 0,3 se clasifican como negativas a antígenos de BVDV.
2. Las muestras con valores M - N superiores a 0,3 se clasifican como positivas.

Los resultados positivos para esta prueba son válidos para terneros de cualquier edad. Sin embargo, titulaciones elevadas de anticuerpos maternos pueden interferir con la detección del antígeno de BVDV en terneros. Por ello, para los terneros que presenten un resultado negativo, en particular los de menos de 3 meses de edad, se recomienda repetir el análisis cuando tengan 12 o 15 semanas de vida.

Muestras de muesca de oreja

1. Muestras con un valor de DO corregido menor o igual a 0,2 son clasificadas como negativas para el antígeno de BVDV.
2. Muestras con un valor de DO corregido mayor que 0,2 pero menor o igual que 0,3 son consideradas sospechosas.
3. Muestras con un valor de DO corregido mayor que 0,3 son clasificadas como positivas para el antígeno de BVDV.

Las muestras sospechosas deben de analizarse de nuevo utilizando otros 50 µl de la solución tamponada de inmersión restante. Si quedaran menos de 50 µl, se puede repetir la prueba sumergiendo la muestra de la muesca de oreja en otros nuevos 150 µl de solución de inmersión durante la noche a 2°-8° C. Si la muestra vuelve a dar un resultado sospechoso, debe tomarse una muestra de sangre para analizarla con el kit de IDEXX BVDV Ag/Suero Plus-ELISA, con VI o con PCR para BVDV.

Si hubiera alguna duda sobre el estado de un animal vivo positivo que se considere valioso, para la confirmación de una infección persistente se debe realizar un nuevo análisis con otra muestra obtenida entre 7 y 14 días después de haberse tomado la primera muestra. Recomendamos que los resultados positivos obtenidos con sangre entera se confirmen empleando suero o plasma del mismo animal.

Continúa página siguiente

Viene página anterior

Resumen del protocolo del test

Se recomienda antes de la realización del test por primera vez, realizar una lectura completa del manual de instrucciones.

Paso	Acción							
1. Preparación de muestras de oreja	<ul style="list-style-type: none"> - Utilice recipientes para la muesca de la oreja (muestras) de unos 2-3 mm de diámetro (por ejemplo tome la muestra cuando se apliquen en la oreja los cortales, provistos de un dispositivo para la toma de muestra). - Transfiera la muesca de la oreja del dispositivo a un tubo de dilución. Son preferibles los tubos de dilución de pequeño tamaño, hasta unos 500 µl, con forma cónica. - Añada 150 µl de 1x Solución tamponada (buffer) para sumergir la muesca de oreja. Asegúrese de que toda la muestra quede cubierta por la solución (sacudir con cuidado o agitar). - Cierre el tubo y deje las muestras sumergidas durante la noche a una temperatura de 2°-8°C. - Mezcle la solución con una pipeta antes de aspirar los 50 µl de la solución necesarias para al prueba 							
2. Distribución de los anticuerpos de detección	<ul style="list-style-type: none"> - Tome la placa(s) tapizada(s) y marque la posición de la muestra en una hoja de trabajo. - Dispense 50 µl de los anticuerpos de detección en cada pocillo. En esta operación puede usarse una pipeta multicanal (8 o 12 canales). 							
3. Distribución de las muestras (muestras de suero, plasma, sangre entera o muesca de oreja)	<ul style="list-style-type: none"> - Dispense 50 µl de control negativo en los pocillos apropiados. - Dispense 50 µl de control positivo en los pocillos apropiados. - Dispense muestras de 50 µl en los pocillos restantes. Use una punta de pipeta diferente para cada muestra. - Mezcle el contenido de los pocillos golpeando levemente la placa o use un agitador de placas de microtitulación. 							
4. Incubación de las muestras	<ul style="list-style-type: none"> - Incube durante 2 horas a 37°C o toda la noche (12-18 horas) entre 2°C y 8°C (en un refrigerador). En cualquier opción de incubación, las placas deben sellarse firmemente para evitar evaporaciones, o incubarse en una cámara húmeda. 							
5. Lavado de la placa	<ul style="list-style-type: none"> - Aspire los contenidos líquidos de los pocillos en un reservorio apropiado. - Lave cada pocillo con aproximadamente 300 µl de Solución de Lavado 5 veces. Aspire los contenidos líquidos de todos los pocillos después de cada lavado. Tras la aspiración final, elimine el fluido de lavado residual de cada placa golpeándola firmemente sobre material absorbente. 							
6. Dilución del conjugado	<ul style="list-style-type: none"> - Dispense 100 µl de conjugado en cada pocillo. 							
7. Incubación del conjugado	<ul style="list-style-type: none"> - Incube durante 30 minutos a la temperatura ambiente (18° a 25°C). 							
8. Repita la etapa 5								
9. Distribución sustrato	<ul style="list-style-type: none"> - Dispense 100 µl de solución de sustrato TMB en cada pocillo. 							
10. Incubación del sustrato	<ul style="list-style-type: none"> - Incube 10 minutos a la temperatura ambiente (de 18° a 25°C) en la oscuridad. Empiece a cronometrar después de llenar el primer pocillo. 							
11. Frenado de la reacción	<ul style="list-style-type: none"> - Para detener la reacción, dispense 100 µl de solución de frenado en cada muestra. Añada la solución de frenado en el mismo orden en que añadió la solución de sustrato en el paso 9. 							
12. Medición de la placa	<ul style="list-style-type: none"> - Calibre el espectrofotómetro en aire. - Mida y anote la absorbancia de las muestras y controles a 450 nm o usando doble longitud de onda, a 450 nm y 650 nm. - Calcule los resultados. 							
13. Interpretación (M-N)	<table border="1"> <tr> <td rowspan="2">Muestras de oreja</td> <td>≤ 0.2</td> <td>$>0.2 \text{ a } \leq 0.3$</td> <td>> 0.3</td> </tr> <tr> <td>Negativo</td> <td>Dudoso</td> <td>Positivo</td> </tr> </table>	Muestras de oreja	≤ 0.2	$>0.2 \text{ a } \leq 0.3$	> 0.3	Negativo	Dudoso	Positivo
	Muestras de oreja		≤ 0.2	$>0.2 \text{ a } \leq 0.3$	> 0.3			
Negativo		Dudoso	Positivo					
Muestras de suero, plasma o sangre entera	<table border="1"> <tr> <td>≤ 0.3</td> <td>> 0.3</td> </tr> <tr> <td>Negativo</td> <td>Positivo</td> </tr> </table>	≤ 0.3	> 0.3	Negativo	Positivo			
≤ 0.3	> 0.3							
Negativo	Positivo							

Fabricado por:

IDEXX Switzerland AG
Stationsstrasse 12
3097 Liebefeld-Bern, Switzerland

Para asistencia técnica:

contacte el representante local IDEXX

o visite:

www.idexx.com/production/contact

IDEXX U.S. Technical Support: 00-800-727-43399

*HeriClix es una marca fabrica o una marca registrada de IDEXX Laboratories, Inc. en los Estados Unidos de America y/o en otros países.

ANEXO 4

TRABAJO DE CAMPO

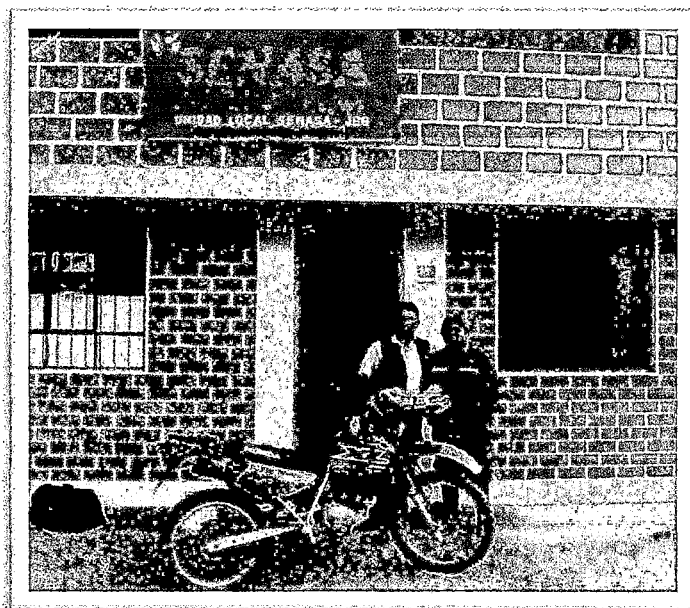


Imagen 1. Constitución en la zona de estudio (Distrito de Locumba) para la toma de muestras en coordinación con el personal de Senasa - Tacna

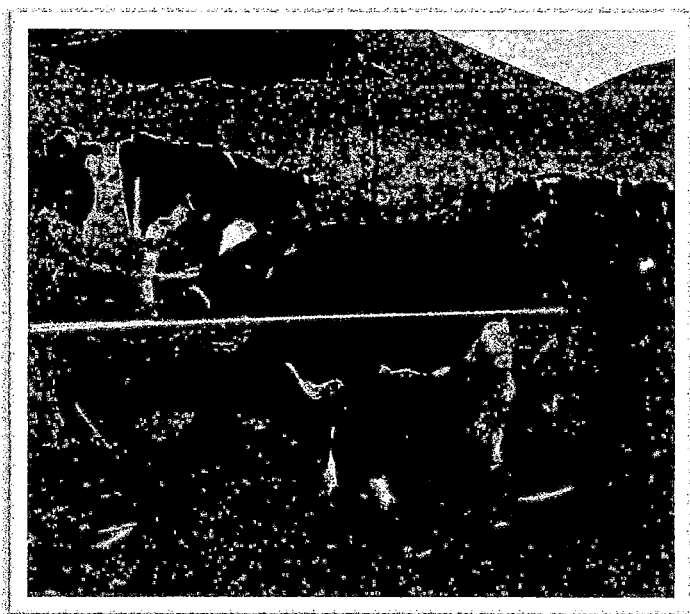


Imagen 2. Sujeción del animal para la toma de muestra



Imagen 3. Toma de muestra de sangre de la vena coccígea.

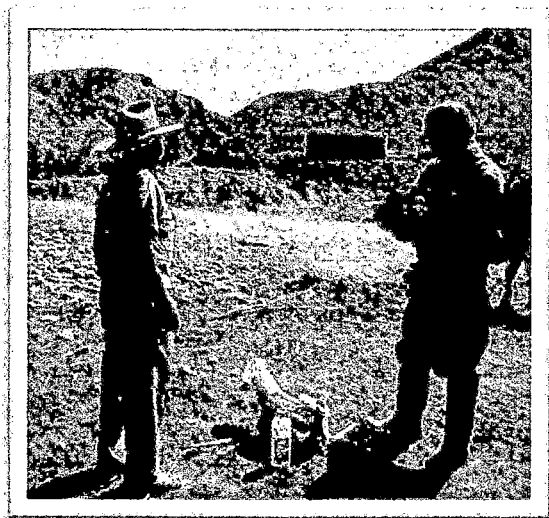


Imagen 4. Codificación del tubo vacutainer y registro de la muestra en la Ficha de Muestreo.

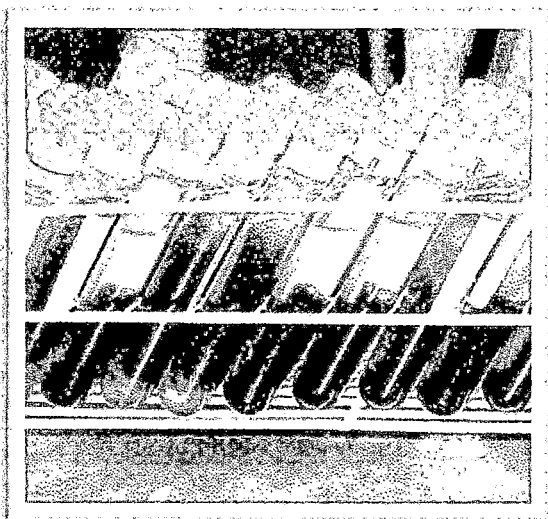


Imagen 5. Separación del suero sanguíneo al cabo de 12 horas.

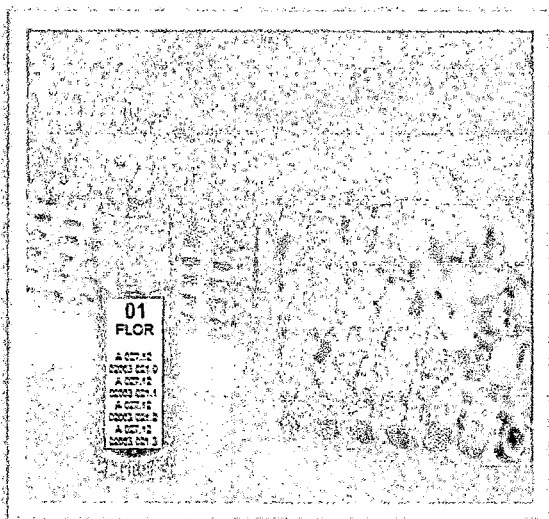


Imagen 6. Transferencia de los sueros sanguíneos a viales criogénicos rotulados.

ANEXO 5

UBICACIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO (DISTRITO DE LOCUMBA)

