

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE
MEDICINA VETERINARIA**



**“SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL
BOVINA EN LAS CUENCAS GANADERAS DE CINCO
DISTRITOS DE LA REGIÓN AYACUCHO”**

Tesis para Obtener el Título Profesional de
MÉDICO VETERINARIO

Presentado por:
FERNANDO BAUTISTA MEDINA

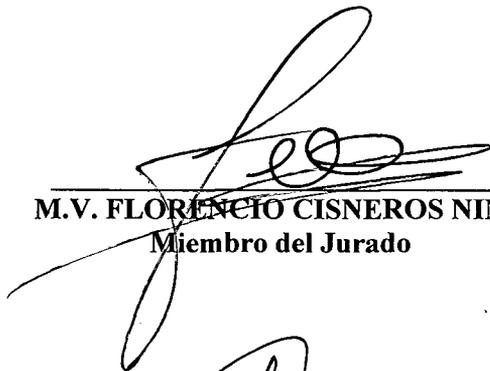
Ayacucho – Perú
2011

**“SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA
EN LAS CUENCAS GANADERAS DE CINCO DISTRITOS DE LA
REGION AYACUCHO”**

Recomendado : 05 de setiembre de 2011
Aprobado : 09 de setiembre de 2011



M.V. CARLOS ALBERTO PISCOYA SARMIENTO
Presidente del Jurado



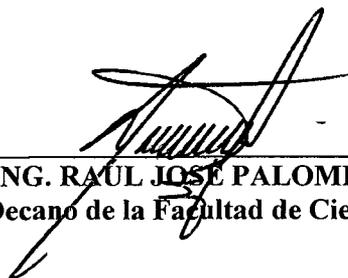
M.V. FLORENCIO CISNEROS NINA
Miembro del Jurado



M.V. GLORIA BETTI ADRIANZEN FACUNDO
Miembro del Jurado



M.V. ALDO ALEXI CIPRIÁN CARREÓN
Miembro del Jurado



M.Sc. ING. RAÚL JOSÉ PALOMINO MARCATOMA
Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias

EL PRESENTE TRABAJO ESTA DEDICADO A

A Dios por permitirme terminar este
trabajo.

A mis padres "Victoria y Felipe", que
sin su apoyo no habría podido culminarlo.

A mis queridos hermanos: Pavel, Luis y
Blanca; por estar siempre a mi lado.

A mi compañera, que sin su aliento exigente
y regañadientes, no hubiera podido finalizar
esta investigación. Gracias amor mío.

A mi amigo y compañero Carlos Alvarado,
a quien conozco desde el colegio. Gracias
por tu amistad y tus sabios consejos.

A todos mis demás familiares y amigos
que veo y no veo, pero que siempre estuvieron
ahí apoyándome en los momentos más difíciles
y me ayudaron de alguna forma a terminar este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento:

- A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en especial a la Facultad de Ciencias Agrarias.
- A la Escuela de Formación Profesional de Medicina Veterinaria.
- Al MV.Msc. Florencio Cisneros Nina, asesor que me ayudo desinteresadamente con la conclusión de este proyecto.
- Agradezco a la ONG SOLID, quienes facilitaron y financiaron los recursos para la ejecución de esta investigación.
- A mis amigos colegas que trabajan en la ONG SOLID: Javier, Luis, Gigi, Luciano, Diomedes, Iván y Francisco; quienes facilitaron la ardua labor de recolección de muestras en campo.
- Al Ing. Aldo E. Martínez Alca, por ser un amigo que me ayudo a desarrollar este trabajo de investigación.
- A todas las demás personas que olvidé mencionarlas, pero que me ayudaron a concluir con este proceso académico, mi más sincera gratitud.

ÍNDICE

Pág.		
	RESUMEN	6
	LISTA DE TABLAS	7
	INTRODUCCIÓN	8
	CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	
	1.1 EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA	10
	1.1.1 Taxonomía	10
	1.1.2 Morfología	10
	1.1.3 Genoma y proteínas virales	11
	1.1.4 Variabilidad	12
	1.1.5 Biotipos	13
	1.1.6 Genotipos	14
	1.1.7 Replicación viral	15
	1.2 EPIDEMIOLOGÍA	16
	1.2.1 Prevalencia	16
	1.2.2 Fuentes de infección	17
	1.2.3 Formas de transmisión	17
	1.3 PATOGÉNESIS Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS	19
	1.3.1 Diarrea viral bovina aguda	19
	1.3.2 Infección persistente	24
	1.3.3 Enfermedad de las mucosas	25
	1.4 RESPUESTA INMUNITARIA EN LAS INFECCIONES POR VDVB	25
	1.5 DIAGNÓSTICO	26
	1.5.1 Detección de anticuerpos	27
	1.5.2 Detección de antígenos virales	28

1.5.3 Detección del ácido nucleico viral	30
1.5.4 Aislamiento en cultivo celular	30
1.6 PREVENCIÓN Y CONTROL	31
1.6.1 Identificación y eliminación de animales PI	32
1.7 ANTECEDENTES DE ESTUDIOS SIMILARES	33
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 LUGAR DE ESTUDIO	35
2.2 MATERIALES	35
2.2.1 Animales	35
2.2.2 Materiales y equipos	36
2.3 MÉTODOS	37
2.3.1 Tamaño muestral	37
2.3.2 Obtención de muestras	37
2.3.3 Procedimiento para la determinación de anticuerpos	38
2.3.4 Análisis de datos	42
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES	
3.1 SEROPREVALENCIA DE LA DIARREA VIRAL BOVINA	43
3.2 SEROPREVALENCIA DE LA DVB, SEGÚN SEXO	45
3.3 SEROPREVALENCIA DE LA DVB, SEGÚN EDAD	46
3.4 SEROPREVALENCIA DE LA DVB, POR COMUNIDADES Y CRIADORES	47
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
4.1 CONCLUSIONES	50
4.2 RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA CITADA	52
ANEXOS	55

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el departamento de Ayacucho, al sur este de la provincia de Huamanga; y tuvo la finalidad de determinar la seroprevalencia del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) en bovinos de crianza extensiva de las cuencas ganaderas de los distritos de Chiara, Vinchos, Socos en la provincia de Huamanga, y de los distritos de Chuschi y Los Morochucos en la provincia de Cangallo, departamento de Ayacucho. Con tal fin se obtuvieron muestras de sangre de 385 animales, sin historial de vacunación, mayor a 6 meses, provenientes de pequeños y medianos criadores. La detección de anticuerpos contra el VDVB, se realizó mediante la prueba de ELISA indirecto. El $75.3 \pm 4.3\%$ (290/385) de los animales presentaron anticuerpos contra el VDVB, distribuidos en todos los grupos de edad. El porcentaje de hembras seroreactoras fue de $75.3 \pm 4.3\%$ (281/373) mientras que en los machos el $75 \pm 4.3\%$ (9/12) resultó seropositivo, no existiendo asociación entre la variable sexo y la seropositividad de los animales. Anticuerpos fueron detectados en animales de todos los distritos con prevalencias entre 67.27% a 86.21%. Asimismo esta alta prevalencia de animales se ve reflejado en un $93.49 \pm 4.3\%$ (114/122) de hatos en los que existe al menos un animal seropositivo. Los resultados indican que el VDVB está presente y ampliamente difundido en la población bovina de la zona. Las altas prevalencias de anticuerpos evidencian intensa actividad viral debido a factores que promueven la difusión viral. Con estos resultados podemos determinar como primera investigación en la zona, que existe prevalencia de la Diarrea Viral Bovina; a partir de ello correlacionar las afecciones de nuestro ganado para determinar el tratamiento o descarte final de animales sensibles o recurrentes a enfermedades; en especial para casos de aborto, que traen como consecuencia grandes pérdidas económicas.

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1:	Seroprevalencia del Virus de la Diarrea Viral Bovina en bovinos, mayores a 6 meses, proveniente de 22 comunidades de los distritos de Chiara, Socos, Vinchos, Chuschi y Los Morochucos. Ayacucho, 2010.	52
Tabla 2.	Seroprevalencia del Virus de la Diarrea Viral Bovina, proveniente de 22 comunidades de los distritos de Chiara, Socos, Vinchos, Chuschi y Los Morochucos; según sexo. Ayacucho, 2010.	53
Tabla 3.	Seroprevalencia del Virus de la Diarrea Viral Bovina, proveniente de 22 comunidades de los distritos de Chiara, Socos, Vinchos, Chuschi y Los Morochucos; según edad. Ayacucho, 2010.	54
Tabla 4.	Seroprevalencia del Virus de la Diarrea Viral Bovina, proveniente de 22 comunidades de los distritos de Chiara, Socos, Vinchos, Chuschi y Los Morochucos; según las comunidades y criadores. Ayacucho 2010.	55

INTRODUCCIÓN

La Diarrea Viral Bovina (DVB), 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; relacionadas a una deficiente capacidad productiva y reproductiva (Lértora, 2003).

El potencial desarrollo de la actividad ganadera en el país, trae consigo el incremento de la población ganadera y la intensificación de su manejo; promoviendo la difusión de enfermedades, entre ellas la DVB; pues así lo demuestran diversos estudios serológicos realizados en bovinos de las principales cuencas lecheras y de crianza extensiva de valles interandinos como: Parinacochas en Ayacucho, Mantaro en Junín, Melgar en Puno, San Pablo en Cajamarca, Espinar en Cusco; que entre otros han demostrado que el VDVB está ampliamente difundido en la población bovina del país (Rivera, 2008).

El desarrollo de la ganadería lechera en la sierra muestra un gran potencial y creciente interés, ya que los recursos forrajeros son más económicos que la costa y la actividad es menos riesgosa comparada con la agricultura. Con muchos valles interandinos y mesetas que cuentan con una gran extensión de pastos naturales y cultivados como es el caso de la ganadería en las provincias de Huamanga y Cangallo, La micro cuenca lechera Cachi, uno de estos lugares de creciente interés y desarrollo ganadero, situada a una altura promedio de 3,500msnm con pisos ecológicos como Montano Bajo Subtropical y Bosque Húmedo Montano Subtropical.

Esta parte del país no cuenta con informes sanitarios respecto a enfermedades que limiten el desarrollo ganadero; es en ese contexto que nace el

interés para realizar el presente estudio, que tiene como objetivo determinar la Seroprevalencia del Virus de la Diarrea Viral Bovina las cuencas ganaderas de cinco distritos de la región Ayacucho; contribuyendo así a un mejor conocimiento de la epidemiología de esta enfermedad. Asimismo los objetivos específicos, comprenden la determinación de la Seroprevalencia del Virus de la Diarrea Viral Bovina según sexo, edad, comunidades y criadores de las veintidós comunidades campesinas.

CAPITULO I REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA

El VDVB, es un importante patógeno del bovino con una amplia distribución mundial y responsable de ocasionar considerables pérdidas económicas a la industria ganadera. Las pérdidas son ocasionadas por los abortos, diarreas, síntomas respiratorios, disminución de la fertilidad y la eliminación de animales persistentemente infectados (PI) (Radostits, *et al.*, 2002).

1.1.1 Taxonomía

El VDVB pertenece al género *Pestivirus*, de la familia *Flaviviridae*. Dentro de este mismo género se encuentra el virus de la peste porcina clásica (VPPC), el virus de la enfermedad de la frontera del ovino (VEF) y el virus de la hepatitis C (Pedrera *et al.*, 2007); con los que el VDVB se encuentra muy relacionado tanto antigénica como genéticamente. Sin embargo este criterio de clasificación es poco fiable debido a que los *Pestivirus* cruzan fácilmente la barrera de especie e infectan otros ungulados, especies del orden *Artiodactyla* (Lértora, 2003).

1.1.2 Morfología

El VDVB es una partícula esférica y envuelta; que mide de 40 a 60 nm. de diámetro; constituido por una nucleocápside icosaédrica entre 25-37nm de diámetro, protegida por una cápside proteica y rodeada por una membrana fosfolipídica con tres glicoproteínas ancladas a ella. E^{ms}, E1 y E2 (Lértora, 2003, Pedrera *et al.*, 2007; Rivera, 2008).

1.1.3 Genoma y proteínas virales

1.1.3.1 Genoma

EL VDVB posee un genoma lineal compuesto por una simple cadena de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 12.5 kb de longitud. Este virus posee un simple marco de lectura abierto (ORF) flanqueado por regiones no traducidas (UTR) 5' (360-390 bases) y 3' (200-240 bases) (Lértora, 2003; Pedrera *et al.*, 2007).

1.1.3.2 Proteínas virales.

Las proteínas estructurales y no estructurales, en orden de secuencia, codificadas por el genoma viral son:

- **N^{pro}/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.
- **C/p14**: Es la segunda proteína generada y es la más abundante. Constituye la cápside y antígeno del grupo viral. Su función es empaquetar el ARN genómico. Esta proteína no provoca una respuesta de anticuerpos en el ganado.
- **E^{ms}/E0/gp48**: Glicoproteína bien conservada que induce altos niveles de anticuerpos aunque con escasa capacidad neutralizante. Es una ARNasa secretada al espacio extracelular por exocitosis durante la replicación viral.
- **E1/gp25**: Esta proteína no induce una respuesta humoral significativa.
- **E2/gp53**: Es la principal glicoproteína y objetivo antigénico de los anticuerpos; además está asociada con otras actividades biológicas, incluyendo unión al receptor de la célula y ensamblaje viral.
- **p7**: Proteína no estructural que parece ser esencial para la producción y ensamblaje del virus infeccioso.
- **NS2-3/p125**: El ganado infectado o vacunado con virus modificado desarrolla una fuerte respuesta humoral contra este polipéptido; mientras que la vacuna a virus muerto produce una respuesta insignificante. Los anticuerpos contra NS2-3/p125 producen reacción cruzada entre VDVB, VPPC y VEF.

- **NS2/p54:** Es un producto proteolítico de la NS2-3/p125. Esta proteína tiene una actividad de unión en el ARN.
- **NS3/p80:** Determina el fenotipo del virus y tiene actividad de NTPasa en el extremo amino terminal. Es altamente conservada en el biotipo CP y es un antígeno inmunodominante en respuestas de anticuerpo en terneros inmunizados
- **NS4A/p10:** Proteína no estructural hidrofóbica que participa como un esencial cofactor de la NS2-3/p125 y la serina proteasa NS3/p80.
- **NS4B/p32:** Proteína no estructural hidrofóbica, componente de la replicasa y muy importante modulador de la citopatogenicidad de la cepa NADL del VDVB y se encuentra asociado a la producción del NS3/p80 del fenotipo CP.
- **NS5A/p58:** Es una fosfoproteína serina que está íntimamente asociada con una o más quinasas celulares. También es un componente de la replicasa.
- **NS5B/p75:** Es el ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp). Esta proteína ha sido directamente implicada en la morfogénesis del VDVB.

1.1.4 Variabilidad

La principal característica del VDVB es su variabilidad genética y antigénica, debido a modificaciones genómicas en el cruce de especies que involucran mutaciones puntuales o recombinaciones de ARN (homólogos y no homólogos). La característica principal de un virus ARN, es su adaptabilidad y plasticidad, y ésta se debe a la falta de una exonucleasa eficiente para corregir las bases de alta frecuencia mal incorporadas, ocasionando una sustitución de base de alta frecuencia (1 error por cada 10,000 nucleótidos del ARN viral). Esta habilidad de generar mutantes constantemente, permite al virus evadir rápidamente la respuesta del hospedero, lo que dificulta el diagnóstico de la enfermedad y limitan la protección de las vacunas (Pedrera *et al.*, 2007).

Otra posible causa de la variabilidad es que se pueden originar durante el pasaje del virus en bovinos susceptibles que desarrollan una infección aguda, proponiendo que, mientras los animales PI son más importantes como reservorios, los animales con infección aguda pueden ser más importantes para la generación de nuevas variantes antigénicas (Lértora, 2003; Pedrera *et al.*, 2007).

1.1.5 Biotipos

Una propiedad de los pestivirus de rumiantes es la habilidad de replicarse en histocultivos celulares, con o sin efectos citopático. Particularmente en el VDVB se pueden distinguir dos biotipos: no citopático y citopático, (Radostits *et al.*, 2002). Recientemente se ha sugerido la existencia de un tercer biotipo linfocitopático que no causa muerte celular en cultivos de células epiteliales pero sí en cultivos de células linfoides (Pedrera *et al.*, 2007).

1.1.5.1 No Citopático (NCP)

El biotipo NCP es la forma original del virus, no ocasiona cambios visibles en el cultivo celular y la célula infectada parece normal; presenta afinidad por células linfocitarias. Sin embargo, esto no implica que los biotipos NCP no sean patogénicos. Por el contrario, es el biotipo predominante en la naturaleza, aislado de la mayoría de las formas clínicas y el único que atraviesa la placenta e invade al feto (Radostits *et al.*, 2002).

Este biotipo es considerado el más importante porque al infectar vacas gestantes durante el primer tercio de la gestación, cuando el sistema inmune del feto es inmaduro, puede dar lugar al nacimiento de animales inmunotolerantes al virus y con infección persistente (Lértora, 2003).

1.1.5.2 Citopático (CP)

El biotipo CP ocasiona vacuolización y muerte celular en los cultivos celulares, mostrando predilección por células epiteliales. Este biotipo se aísla únicamente de animales con Enfermedad de las Mucosas (EM) que se originan por mutación a partir del biotipo NCP; ya sea por depleción de fragmentos del genoma viral, inserción de fragmentos de ARN celular o duplicación y reordenamiento del ARN viral (Lértora, 2003).

Las cepas del biotipo CP difieren de las del NCP; porque posee adicionalmente una proteína estructural, NS3/p80, la que la confiere el fenotipo citopático (Rebhun, 1995).

1.1.6 Genotipos

Las diferencias antigénicas y genéticas han dividido al VDVB, en dos genotipos: Genotipo 1 (VDVB-1) y genotipo 2 (VDVB-2), basados en la secuencia de nucleótidos 5'UTR del genoma viral y las diversidades antigénicas en la glicoproteína viral E2. Además, los virus de ambos genotipos pueden ser de los dos biotipos (Rivera, 2008).

1.1.6.1 Genotipo 1

El VDVB-1 actualmente puede ser dividido en 13 sub genogrupos y es muy probable que nuevos genogrupos sean revelados en futuros análisis. De todos estos, los más comúnmente aislados son los VDVB-1a y VDVB-1b; siendo más prevalente en EEUU el subtipo VDVB-1b; el mismo que ha sido identificado de cepas usadas para pruebas diagnósticas, investigación y elaboración de vacunas (Lértora, 2003).

En un primer estudio sobre diversidad genética del VDVB en el Perú, utilizando el análisis filogenético la región 5'UTR del virus, se ha concluido que las cepas circulantes en el país son del VDVB-1b; siendo responsables de procesos leves con sintomatología inaparente, caracterizados por un ligero aumento de la temperatura corporal y la presencia de lesiones moderadas restringidas al aparato digestivo y a órganos del sistema linfóide. Asimismo, en vacas gestantes este genotipo puede inducir abortos y otras patologías reproductivas (Rivera, 2008).

1.1.6.2 Genotipo 2

El VDVB-2 puede ser dividido en dos subgenotipos (VDVB-2a y VDVB-2b). Este genotipo ha sido aislado de cepas virales procedentes de animales PI y del Síndrome Hemorrágico Fatal en EE.UU. y Canadá. El VDVB-2 fue primero identificado en los noventa en Norteamérica y ha sido esporádicamente detectada en otros países como: Japón, Alemania y Bélgica; y en América latina en Brasil, Argentina y Chile (Rivera, 2008).

El VDVB-2 está asociado principalmente a la enfermedad respiratoria severa y a un cuadro hemorrágico agudo, llamado también Síndrome

Hemorrágico, caracterizado por trombocitopenia, diarrea hemorrágica, epistaxis, petequias, equimosis en mucosas, anemia, sangrado en zonas de inyección, pirexia, leucopenia y muerte (Pedrera *et al.*, 2007).

1.1.7 Replicación viral

El VDVB después de entrar en contacto con membranas mucosas de la boca o nariz; empezará la replicación en las células epiteliales con una predilección por las tonsilas palatinas, en especial por las células epiteliales de la cripta. El VDVB presenta tropismo por células mitóticamente activas como: linfocitos, fagocitos mononucleares y células epiteliales (Rondón, 2006).

La replicación del ARN pestiviral ocurre en el citoplasma de las células infectadas. El genoma del pestivirus consiste de una simple cadena de ARN de polaridad positiva, la cual sirve como plantilla para la traducción y replicación. La replicación comienza con la adhesión a la membrana plasmática y la penetración en la célula. Seguidamente, ocurre la fusión de la envoltura con la membrana endosomal y el virus ingresa al citoplasma mediante endocitosis mediada por receptor y libera su genoma en el citosol (Rivera, 2008).

Posteriormente, el ARN genómico es traducido por el reclutamiento de los factores de iniciación de la traducción mediados por el sitio de entrada interno al ribosoma, el cual está presente en la región 5'UTR, promoviendo la iniciación de la traducción de la poliproteína viral. Entonces, nuevas proteínas no estructurales sintetizadas arman complejos funcionales de replicasa y lleva a cabo el primer paso de la replicación del genoma, la síntesis de ARN de cadena negativa (anti genoma). Luego, la replicasa deberá completar la síntesis de la progenie de ARN de cadena positiva usando el ARN anti genómico como plantilla (Rondón, 2006).

Luego de la traducción del ORF en una poli proteína viral, las proteasas virales y celulares cortan el polipéptido naciente en sitios específicos para generar proteínas virales intermedias y/o maduras. Por último, luego de la replicación, el genoma viral es encapsidado por la proteína C/p14 y dirigida al retículo endoplasmático o al aparato de Golgi, donde el virus inmaduro, surge hacia el lumen. La maduración del virus incluye la estabilización conformacional por el

plegamiento de las glicoproteínas E1-E2 (glicosilación), los viriones intactos son liberados por germinación en la cisterna del retículo endoplasmático. Finalmente, los virus maduros son liberados en el espacio extracelular mediante exocitosis (Rondón, 2006).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Estudios de prevalencia en todo el mundo, demuestran que el VDVB está ampliamente distribuido y se encuentra presente en la mayoría de países donde exista la crianza de ganado vacuno (Rivera, 2008).

1.2.1 Prevalencia

Los bovinos se presentan como los hospedadores naturales del virus, pero también puede infectar a otros artiodáctilos, como porcinos, ovinos, caprinos, alpacas, llamas, búfalos de agua y rumiantes silvestres (Pedrera *et al.*, 2007).

La mayoría de las encuestas en los diferentes países alcanzan niveles de 60-85% de los bovinos seropositivos al VDVB y un máximo de 0.5 a 2% de los PI (Radostits *et al.*, 2002). En algunos países de Sudamérica como Brasil, Argentina, Colombia y Chile se reporta prevalencias con variaciones entre regiones, pero con tasas superiores al 70% (Rivera, 2008).

La Diarrea Viral Bovina (DVB), fue introducida al Perú en la década del 60 con la importación de vaquillas de un país donde la enfermedad era endémica. Posteriormente, estudios epidemiológicos realizados por algunos investigadores de las distintas universidades del país, han determinado que la DVB se encuentra difundida en la población bovina del país (Rivera, 2008). Es así que en el Valle del Mantaro se encontraron prevalencias de $72.4 \pm 5.8\%$ (Contreras *et al.*, 2000) y $70.9 \pm 7.8\%$ (Rivera *et al.*, 2003); mientras que en Parinacochas, Ayacucho se determinó una prevalencia de $85.3 \pm 3.2\%$ (Rivera *et al.*, 2001); en el valle de Lima se encontró una prevalencia del $56.0 \pm 5.5\%$ (Aguilar *et al.*, 2006); la irrigación Majes indican que el VDVB tiene una prevalencia de entre $98.1 \pm 1.9\%$ (Huamán *et al.*, 2007); en Puno, provincia de Melgar, se determinó una prevalencia de $47.8 \pm 0.05\%$ (Quispe *et al.*, 2008); en Cusco, provincia de Calca se determinó una prevalencia de $90.9 \pm 6.9\%$ (Cabello *et al.*, 2006) mientras que en la provincia de

Espinar se determinó una prevalencia de $52.6 \pm 4.8\%$ (Cárdenas, 2009) y en el departamento de Cajamarca, provincia de San Pablo, se determinó una prevalencia de $27.1 \pm 4.4\%$ (Herrera, 2009).

Se muestra diferencias importantes de seroprevalencia entre las distintas zonas, lo cual probablemente sea el resultado de las diferencias en el tipo de ganado, densidad poblacional, tipo de manejo, comercio de animales, manejo de pasturas, condiciones climáticas entre otros (Rivera, 2008).

1.2.2 Fuentes de infección

Existen varias fuentes de infección, pero la principal fuente de infección y reservorio del virus en la naturaleza son los bovinos PI (Radostits *et al.*, 2002; Lértora, 2003). Estos animales pueden infectar al 90% de los animales con los que conviven en un período de 3 a 4 meses. Es probablemente el método más importante de transmisión de la DVB; aunque estudios de campo han demostrado que algunas infecciones también pueden producirse en ausencia de animales PI por contacto indirecto: moscas, fómites, semen, contacto con otras especies infectadas con el VDVB, etc. (Radostits *et al.*, 2002; Lértora, 2003; Pedrera *et al.*, 2007).

Los bovinos PI eliminan continuamente durante toda su vida grandes cantidades de virus en secreción nasal, saliva, orina, materia fecal, lágrimas, semen y leche. Los animales con infección aguda también son fuentes de infección, aunque menos eficientes, ya que eliminan el virus en cantidades más bajas y por cortos periodos (4 a 10 días) (Radostits *et al.*, 2002; Pedrera, 2007).

1.2.3 Formas de transmisión

Los factores que influyen en la eficiencia de transmisión del VDVB dentro de un rebaño no son conocidos, pero posiblemente se relacionen al manejo y al medio ambiente, que favorece o impide la transmisión, incluyendo la proporción de animales susceptibles con animales inmunocompetentes, la densidad del rebaño, y la virulencia o infectividad de las cepas del VDVB.

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 (Lértora, 2003).

1.2.3.1 Transmisión horizontal

Puede darse de manera directa o indirecta. La directa es a través de secreciones o excreciones de animales infectados, principalmente PI. El contacto internasal, es el modo más eficiente de transmisión en condiciones naturales donde se puede esparcir la infección durante una breve viremia (7-10 días); pero su rol en el mantenimiento de la infección en el hato parece ser menos importante (Radostits *et al.*, 2002).

El semen de toros PI con infección aguda es una importante vía de transmisión horizontal. Por tal motivo 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.

La forma indirecta es a través de agujas hipodérmicas, guantes la palpación rectal, nariceras y la acción de insectos hematófagos, minutos después de haber estado en contacto con animales PI. Sin embargo, su importancia práctica aún no está determinada, ya que es un virus que se inactiva fácilmente. El VDVB es rápidamente inactivado por el calor, desecación, luz ultravioleta, detergentes, solventes orgánico y pH de 5.7 a 9.3 (Lértora, 2003; Rebhun, 1995).

Así mismo se han demostrado de forma experimental la transmisión por vía aérea a corta distancia entre bovinos PI 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 (Lértora, 2003).

1.2.3.2 Transmisión vertical

La transmisión transplacentaria ocurre de una vaca PI a su descendencia o de una vaca sana susceptible que se infecta horizontalmente durante la preñez

por el biotipo NCP (antes del día 125 de gestación, aproximadamente), tiempo en que el feto no tiene competencia inmunológica, por lo que desarrollara una infección persistente. A pesar de la elevada tasa de mortalidad de los animales PI en su primer año de vida (50%), muchos alcanzan la madurez sexual y se reproducen. La transmisión vertical también ocurre luego de la transmisión embrionaria si el animal receptor es PI o la vaca donante es PI y no se realiza el correcto lavado del embrión (Lértora, 2003).

1.3 PATOGÉNESIS Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La biología del VDVB es muy compleja, lo que da lugar a una gran variedad de manifestaciones clínicas en los animales infectados que dependerá de factores como el genotipo y el biotipo del VDVB, estado inmunitario tanto del rebaño como del animal, de la edad, así como de la situación inmunitaria de las madres y la edad gestacional de éstas, factores estresantes y otros patógenos concurrentes (Radostits *et al.*, 2002; Pedrera *et al.*, 2007).

Los síntomas involucran a los sistemas respiratorios y gastrointestinal; además del reproductivo, inmunitario y sistema nervioso central; todo esto conlleva a cuadros que van desde una infección subclínicas a otra altamente fatal con mortalidad en animales adultos mayores al 50% (Radostits *et al.*, 2002).

1.3.1 Diarrea viral bovina aguda

Cuando la enfermedad fue descrita por primera vez por Olafson, MacCallum y Fox en 1946, la DVB fue caracterizada como una infección viral transmisible marcada por severa leucopenia, fiebre alta, depresión, diarrea, erosiones gastrointestinales y hemorragias. Sin embargo, es aceptado que las infecciones frecuentes están ampliamente distribuidas y son usualmente subclínicas o benignas y que son de escasa importancia clínica (Rebhun, 1995; Lértora, 2003).

La forma aguda es una infección postnatal, de severidad variable en bovinos seronegativos e inmunocompetentes y es causada en su mayoría por el VDVB-NCP. Puede afectar al sistema respiratorio y digestivo, jugando un

importante rol como un agente inmunosupresor o como un potenciador para otras enfermedades secundarias (Radostits *et al.*, 2002).

La fiebre y el abatimiento generalmente se anticipan al comienzo de la diarrea en 2 a 7 días, y con frecuencia la fiebre es bifásica. Después de la segunda oleada de fiebre es posible apreciar las erosiones gastrointestinales o es posible que el paciente cure sin manifestar más signos. Las lesiones orales y digitales, en un 50%, son las únicas visibles a la inspección clínica (Rebhun, 1995).

Los efectos perjudiciales de la infección por el VDVB incluyen la reducción de la producción de leche, la reducción de la función reproductiva, retraso del crecimiento, el aumento de incidencia de otras enfermedades, principio de sacrificio de los animales PI y aumento de la mortalidad entre los animales jóvenes del rebaño (Radostits *et al.*, 2002). Las principales manifestaciones de las infecciones clínicas agudas por el VDVB son:

1.3.1.1 Infecciones subclínicas

La mayoría de bovinos cursan un tipo de infección clínicamente irreconocible en la que se producen anticuerpos neutralizantes del suero, y el virus desaparece de los animales inmunocompetentes normales. Esto justifica el elevado porcentaje de animales normales que presentan una serología positiva frente al virus (Radostits *et al.*, 2002). En ocasiones aparecen manifestaciones clínicas leves y transitorias, que puede acompañarse de inapetencia durante unos días, decaimiento, diarrea leve, fiebre, descarga óculo nasal, leucopenia transitoria y se desarrollan anticuerpos neutralizantes 14 a 28 días post-infección y consecuentemente la curación y protección contra re-infecciones por cepas homólogas del virus es de por vida (Lértora, 2003). La prevalencia superior al 50% de DVB encontrado en bovinos aparentemente normales hacen pensar que esta forma es también predominante en el Perú (Rivera, 1993).

1.3.1.2 Complejo diarrea neonatal bovina

El ternero puede infectarse en la etapa perinatal; es decir, en el último tercio de la gestación o después de nacer, desarrollando una severa enteritis a

veces fatal. Los anticuerpos que el ternero recibe de la madre a través del calostro y leche se agotan entre los 105 a 230 días de edad (Rivera, 2008).

Los efectos inmunosupresivos de la infección aguda por el VDVB son responsables de la potenciación de una variedad de enteropatógenos en el ganado como *Salmonella sp.*, *Rotavirus*, *Coronavirus* y *Escherichia Coli*; que resultan en manifestaciones clínicas más severas (Lértora, 2003).

1.3.1.3 Trombocitopenia y síndrome hemorrágico

Es ocasionado por una variante hiperaguda de la infección por el VDVB2-NCP. 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 de casi el 25% de los animales infectados. Esta signología se atribuye a trombocitopenia y alteración de la función plaquetaria; así como a la marcada depleción de los órganos linfoides (Radostits *et al.*, 2002).

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 (Pedrera *et al.*, 2007).

1.3.1.4 Inmunodepresión

El VDVB posee una fuerte afinidad por el tejido linforeticular, ocasionando necrosis y atrofia de dichos tejidos. Infecta células del sistema inmune innato afectando la función de los neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas. La infección de macrófagos induce efectos inmunosupresivos como la estimulación de síntesis de prostaglandinas E_2 , bloqueo de la inducción de interferones tipo 1 (INF- α/β) y una disminución de la quimiotaxis inducida por citoquina; asimismo conduce a una disminución en la formación del anión súper-óxido y la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Pedrera *et al.*, 2007).

Dadas las propiedades antivirales del INF- α/β y la evidencia que tiene un rol en promover las respuestas Th1 de células T, la inhibición de la inducción del INF- α/β por el biotipo NCP claramente tiene el potencial para alterar las respuestas inmunes y por lo tanto contribuir a la susceptibilidad incrementada a infecciones concurrentes.

Las pruebas que incriminan al virus como patógeno predisponente de las neumopatías bovinas naturales son indirectas. El VDVB es el virus más frecuentemente hallado en brotes de enfermedades respiratorias agudas en bovinos y generalmente es hallado asociado a *Pasteurella haemolytica*, virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina, *Mycoplasma bovis* y el virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) (Radostits *et al.*, 2002).

1.3.1.5 Trastornos reproductivos

El mayor impacto económico de la infección con el VDVB es el ocasionado por los trastornos reproductivos. Tanto el biotipo CP como el biotipo NCP del VDVB pueden causar infección y pérdida del feto (Lértora, 2003).

La infección aguda, en las hembras, altera la función ovárica y reduce la fertilidad. El VDVB causa ooforitis intersticial no purulenta, con necrosis de células de la granulosa y de oocitos; produciendo de esta manera una disfunción ovárica. Es posible detectar el antígeno viral en los macrófagos y células del estroma ovárico, entre los días 6 a 60 post infección y en células foliculares y oocitos en distintos estados de maduración. Asimismo las infecciones agudas ocasionan un retraso en el desarrollo de los folículos pre ovulatorios durante dos ciclos estrales consecutivos, reducción de los niveles de estradiol durante la fase folicular y disminución o ausencia de las oleadas de hormona luteinizante pre ovulatoria o retraso en el tiempo del pico de hormona luteinizante pre ovulatoria (Lértora, 2003).

Los toros PI son generalmente infértiles, producen semen de calidad anormal o reducida. Los lugares donde más se multiplica el virus son las vesículas seminales y la próstata; por tal motivo 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. 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 (Lértora, 2003; Radostits *et al.*, 2002).

El impacto del VDVB durante la preñez se divide en cuatro periodos, en base a las manifestaciones clínicas de la infección considerando los siguientes intervalos de tiempo:

- Etapa embrionaria (0–45 días): Las infecciones de hembras susceptibles próximas al momento del apareamiento ocasiona muerte embrionaria y repeticiones de servicio hasta que desarrollen respuesta inmune. 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 (Lértora, 2003; Rivera, 2008).
- Día 45 a 125 de gestación: Este periodo comienza al finalizar la etapa embrionaria y culmina cuando el feto adquiere competencia inmunológica al VDVB. Durante este periodo también se produce muerte fetal o nacimiento de terneros PI, momificación o aborto meses después y un pequeño porcentaje de teratogénesis. No obstante, la supervivencia fetal tras la infección puede alcanzar el 70% (Radostits *et al.*, 2002; Rivera, 2008).
- Día 125 a 175 de gestación: Este período que representa el comienzo de la inmunocompetencia fetal y del estado de organogénesis; la infección con el VDVB puede presentar altos porcentajes de alteraciones del desarrollo. Se pueden observar distintos tipos y grados de malformaciones tales como hipoplasia cerebelar, microencefalia, hipomielogénesis, hidrocefalia, atrofia o hipoplasia de timo, cataratas, microftalmia, degeneración de retina,

hipoplasia, neuritis del nervio óptico, alopecias, hipotricosis, hipoplasia pulmonar, braquignatismo, artrogriposis, retraso general del crecimiento por disminución sérica de las hormonas tiroideas, deformidades esqueléticas y tener el pelo rizado (Radostits *et al.*, 2002). 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 (Lértora, 2003).

- 175 días de gestación en adelante: Las infecciones con el VDVB en el último período de la gestación pueden resultar en el nacimiento de terneros normales o débiles; ya que el feto desencadena una respuesta inmunitaria completamente competente que puede llegar a eliminar al virus. Al nacer, el ternero es seropositivo al VDVB; mientras que los abortos son ocasionales (Lértora, 2003; Rivera, 2008).

1.3.2 Infección persistente

Estos resultan por la infección fetal con VDVB biotipo NCP durante el primer trimestre de gestación (aproximadamente antes del día 125 de gestación), dado que el sistema inmune fetal no está desarrollado, por lo que no reconoce el VDVB como agente infeccioso o foráneo. Las proteínas virales son reconocidas como antígenos propios con una resultante selección negativa del VDVB específica de linfocitos B y T durante su ontogenia (Lértora, 2003; Radostits *et al.*, 2002).

La apariencia clínica puede variar de normal a extremadamente anormal. La patología del ternero extremadamente anormal refleja el tropismo viral en el sistema nervioso central (SNC), células linfoides y epiteliales. En el SNC, los sitios predilectos de persistencia viral son la corteza cerebral y el hipocampo. En el tejido linfoide, existe una reducción en la recirculación de las células B y T. La demostración de la amplia distribución del VDVB en tejidos de animales PI podría ser la explicación del porque algunos animales eliminan grandes cantidades de virus por las secreciones oro-nasales, lágrimas, orina, leche, semen y probablemente piel (Radostits *et al.*, 2002; Rivera, 2008).

En un animal PI, es posible aislar el virus de la sangre o tejidos en dos oportunidades con un intervalo de tiempo no menor a dos semanas. La viremia en

estos animales es de por vida y no son capaces de producir anticuerpos contra la cepa que originó la inmunotolerancia. Los animales con infección persistente por lo general se muestran pequeños al nacimiento, con escaso desarrollo y ganancia de peso, débiles y con cuadros recurrentes de enfermedad respiratoria y digestiva. Sin embargo, otros son clínicamente normales, siendo indispensable el laboratorio para su diagnóstico (Lértora, 2003; Rivera, 2008).

1.3.3 Enfermedad de las mucosas (EM)

La EM se genera solo cuando animales PI con biotipo NCP son superinfectados con un biotipo CP homóloga, generada de cambios genéticos o recombinación de ARN de las cepas NCP resistentes, aunque no se descartan fuentes externas: Esto suele ocurrir frecuentemente entre los 6 a 24 meses de edad; siendo posible el aislamiento de ambos biotipos antigénicamente similares (Lértora, 2003; Rivera, 2008).

La morbilidad es baja, pero la mortalidad es elevada (superior al 90%). Es una forma esporádica, fatal, de curso agudo o crónico y se caracteriza por severa leucopenia, diarrea profusa, erosiones y ulceraciones en las membranas mucosas del tracto gastrointestinal, especialmente en sitios con tejido linfoide asociado a intestino (Placas de Peyer), ulceración interdigital y de la conjuntiva. El animal fallece al cabo de 5 a 7 días, desde que comenzó la enfermedad (Lértora, 2003; Radostits *et al.*, 2002).

1.4 RESPUESTA INMUNITARIA EN LAS INFECCIONES POR VDVB

En 1999, Fredriksen determinó que los animales inmunocompetentes seronegativos infectados experimentalmente y naturalmente con VDVB, seroconvertían 14 a 28 días después de la inoculación y que todos los animales seguirán presentando altos niveles de anticuerpos hasta después de los 3 años post-infección (Lértora, 2003; Rivera, 2008).

La infección con el biotipo NCP resulta en altos y prolongados niveles de INF- α/β detectables en el suero, mientras el INF- α/β no es detectable después de la infección con el biotipo CP. Por otra parte, estudios *in vitro* con el virus CP sugieren que el virus no mata células dendríticas (CD), permitiendo que estas

células migren e inicien una respuesta inmune en los nódulos linfáticos locales. Existe un mayor rol de las células CD4⁺, pero no de las células CD8⁺, sugiriendo el establecimiento de la memoria inmune al VDVB (Lértora, 2003; Rivera, 2008).

Los INF- α/β , eliminan las células infectadas a través de la apoptosis. El virus induce la apoptosis a través de la activación de caspasa, también mediante el estrés oxidativo (acumulación intracelular del ARN viral, caspasa 12 asociado al estrés del retículo endoplasmático y activación de caspasa 9 dependiente de mitocondria). El virus NCP inhibe la apoptosis inducida por ARN de doble cadena (dsRNA) y la síntesis de interferón por inhibición de la síntesis ARN mensajero (ARNm) del INF- α/β .

El biotipo NCP podría no estimular una respuesta inmune innata en la superficie de la mucosa después de un desafío intranasal, porque la inmunidad innata no es estimulada en el sitio local, las CD no se activan y no restringirán el crecimiento viral. Sin embargo, cuando el virus libre entra al nódulo linfático, la interacción con las CD plasmocitoides resultaría en la inducción de INF- α . Las CD plasmocitoides son conocidas como las células productoras de interferón natural, las cuales son un tipo celular clave entre la conexión de las respuesta inmune innata y la adaptativa (Rivera, 2008).

Los terneros que tienen anticuerpos calostrales circulantes contra el VDVB, que se exponen a vacunas de virus vivo modificado o a infecciones naturales, producen respuestas celulares tipo T cooperadoras CD4⁺, T citotóxicas CD8⁺, T $\gamma\delta$ ⁺ y células B de memoria. Estos animales al hacerse seronegativos pueden ser resistentes a la infección aguda por el VDVB mediante la respuesta celular (Lértora, 2003).

1.5 DIAGNÓSTICO

Debido al amplio tipo y severidad de lesiones inespecíficas, en ocasiones solo evidenciadas por microscopía, el diagnóstico se basa únicamente en el aislamiento del virus o detección del antígeno viral específico.

Actualmente, los métodos disponibles para el diagnóstico de infecciones agudas o persistentes del VDVB incluyen la inmunohistoquímica, ELISA para la

detección de anticuerpos y captura de antígenos, pruebas de RT-PCR, aislamiento viral, prueba de neutralización viral, entre otras. Para el presente estudio, se utilizó el ELISA indirecto para la detección de anticuerpos (Lértora, 2003; Rivera, 2008).

1.5.1 Detección de anticuerpos

La medición de la respuesta de anticuerpos de animales expuestos a un agente infeccioso a través de una exposición natural o mediante un protocolo de inmunización es todavía un procedimiento estándar. Para el VDVB, los formatos de pruebas han sido grandemente limitados a las pruebas de ELISA y Neutralización Viral. La detección de anticuerpos es el método diagnóstico más común, aunque de menor utilidad en hatos o en zonas donde se usa la vacunación contra el VDVB (Rivera, 2008).

1.5.1.1 Ensayo de Inmunoabsorbancia Ligada a Enzimas (ELISA)

Esta técnica de diagnóstico es muy versátil, ya que pueden trabajarse numerosas muestras simultáneamente y tienen alta sensibilidad y especificidad por lo que son utilizados en estudios epidemiológicos en gran escala como pruebas de tamiz. Las muestras requeridas para esta prueba son: suero, plasma o leche descremada.

El caso en estudio, se utilizó el Kit HerdChek VDVB Ab, es un inmunoensayo enzimático indirecto diseñado para detectar anticuerpo específicos de VDVB en muestras de suero. En el ensayo se utilizan placas de microtitulación tapizadas con antígenos de VDVB. Los anticuerpos del VDVB presentes en la muestra, se unen al antígeno de la placa. El material no ligado se elimina mediante un lavado. El complejo antígeno-anticuerpo se detecta mediante un Conjugado peroxidasa de rábano, el resto del Conjugado se elimina mediante el lavado de la placa y se añade una solución de Substrato/cromógeno. En presencia de la enzima, el substrato se convierte en un producto que reacciona con el cromógeno generando una coloración azul. Al añadir la Solución de Frenado, se genera un color amarillo (Rivera, 2008).

La absorbancia se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda única de 450nm [A(450)] o a una longitud de onda dual de 450nm y 650nm [A(450/650)]. El coeficiente M/P de las muestras se calcula usando la absorbancia [A(450)] o [A(450/650)] de la muestra y un control positivo, corregidas con la absorbancia del control negativo. El desarrollo de color indica la presencia de anticuerpos frente al VDVB en la muestra (resultado positivo) (Rivera, 2008).

1.5.1.2 Serología en leche

La prueba de leche en tanque para la detección de anticuerpos contra el VDVB es un método rápido, no invasivo y de costo efectivo. Para ello se han desarrollado kits de ELISA indirecto. Este método puede ser usado como un primer paso en una estrategia de control para discriminar entre los hatos posiblemente infectados y no infectados, dando una medición cualitativa del estatus de infección en el hato. Además, para infecciones endémicas como el VDVB existe también una correlación entre el nivel de anticuerpos en una muestra de leche en tanque con las vacas positivas (prevalencia de anticuerpos en el hato). La sensibilidad y especificidad corregida para este ELISA indirecto en pools de leche obtenidas a partir de un estudio fueron 96 y 97% respectivamente (Rivera, 2008).

1.5.2 Detección de antígenos virales

La detección de antígeno del VDVB de muestras sospechosas es mucho más rápida y de menor costo que el aislamiento viral. Las técnicas más usadas son inmunofluorescencia (IF) en tejido fresco e inmunoperoxidasa (IP) en tejido fresco o fijado en formalina utilizando anticuerpos monoclonales (mAbs) (Rivera, 2008).

1.5.2.1 Inmunofluorescencia (IF)

Es una prueba inmunohistoquímica, muy utilizada en los laboratorios de diagnóstico como una prueba tamiz, la cual se usa para la detección de antígeno en los tejidos frescos usando para esto anticuerpos monoclonales o policlonales contra el VDVB marcados con una sustancia fluorescente (fluorocromos o conjugados). Los anticuerpos policlonales son muy reactivos; sin embargo

podrían producir coloraciones inespecíficas, dificultando la lectura y dando un resultado de falso positivo. En cambio, los anticuerpos monoclonales producen una coloración más clara, de fácil lectura, pero teniendo cuidado que sean reactivos contra todos los VDVB, para evitar falsos negativos. La IF requiere de un microscopio de fluorescencia para observar el antígeno. La IF tiene una sensibilidad de 77% y una especificidad de 88% (Rivera, 2008).

1.5.2.2 Inmunoperoxidasa (IP)

Es una prueba inmunohistoquímica, usada para la detección de antígeno del VDVB en muestras de tejidos frescos o fijados en formalina. En esta prueba se utiliza un anticuerpo monoclonal o policlonal marcado a una enzima que es la peroxidasa. Para animales PI puede usarse cualquier tipo de tejido, sin embargo se ha observado un mayor éxito utilizando los nódulos linfáticos, glándula tiroides, piel, cerebro, abomaso y placenta. La sensibilidad y especificidad de la prueba IP es de 97% para ambos casos. Además esta prueba permite apreciar la arquitectura del tejido y con esto las lesiones histológicas que puedan estar presentes (Rivera, 2008).

Una prueba inmunohistoquímica para la determinación del VDVB de biopsias de piel ha sido implementada para poder diferenciar entre animales PI y animales con infecciones agudas. Esta prueba se está utilizando como prueba tamiz (Rivera, 2008).

1.5.2.3 ELISA de captura de antígenos

La prueba de ELISA de captura utiliza anticuerpos monoclonales para "captura" de antígenos del VDVB en muestras de sangre. Es un método rápido, y es considerado el método de preferencia para la detección a gran escala de animales PI. Los anticuerpos monoclonales, usados en esta prueba, reconocen la proteína p125, por lo que pueden detectarse las diferentes cepas del VDVB. Estos anticuerpos están adheridos a la placa de ELISA para la captura del antígeno viral presente en las muestras de sangre o suero y un segundo anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa revela la unión Antígeno-Anticuerpo. Para determinar el resultado es necesario observar la presencia de color, la cual indica la

positividad de la muestra. Este método puede llegar a alcanzar una sensibilidad y especificidad de 97.9 a 99.7% respectivamente (Rivera, 2008).

1.5.3 Detección del ácido nucleico viral

Las técnicas moleculares están siendo aplicadas para el estudio del VDVB como la transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) usando iniciadores específicos de la región 5'UTR y la región que codifica la proteína no estructural NS3 del genoma viral. Es útil para detectar virus en animales PI pero también para monitorear virus en suero fetal utilizado para cultivos celulares. La técnica del RT-PCR en tiempo real viene siendo utilizada por su rapidez y precisión, y tiene la ventaja de realizarse en un sistema cerrado evitándose la contaminación entre las muestras y no requiere del análisis por electroforesis del producto post PCR. Adema, Baxi y col en el 2006, han desarrollado RT-PCR múltiple de un paso en tiempo real para el diagnóstico del VDVB, el cual es rápido, altamente sensible y específico; y por lo tanto parece ser útil para la clasificación viral en investigación o para la aplicación en el diagnóstico (Rivera, 2008)..

Actualmente, la tecnología de la proteómica viene representando un enorme potencial con fines de diagnóstico veterinario, como es el caso del "microarray" que primeramente fue usado para el mapeo de genes, pero que recientemente es utilizado para identificar agentes con alta variabilidad genética como el VDVB (Rivera, 2008).

1.5.4 Aislamiento en cultivo celular

A pesar de los recientes avances de la ciencia del diagnóstico del VDVB, el cultivo y la identificación del VDVB es considerada como la técnica diagnóstica "estándar de oro". El virus fácilmente crece en muchas líneas celulares de varias especies animales. En el animal vivo, la mejor muestra para el aislamiento del VDVB es la sangre total, de la cual las células de la sangre blanca son extraídas y usadas como el inóculo. Las mejores muestras de necropsia y fetos abortados son los órganos linfoides como el bazo, las placas de Peyer del intestino delgado, nódulos linfáticos mesentéricos y el timo (Rivera, 2008)..

Debido a que los dos biotipos VDVB (NCP y CP) pueden dar lugar a los mismos signos clínicos, se podría aislar cualquiera de los dos biotipos. Si el biotipo es CP (menos común) se observa el efecto citopático; si se trata del biotipo NCP (el más común en el campo) no se produce ninguna lesión citopática, por lo tanto es necesaria una prueba adicional, como la inmunofluorescencia o la inmunoperoxidasa. El aislamiento viral tiene una sensibilidad de 83% y una especificidad de 100% (Rivera, 2008).

1.6 PREVENCIÓN Y CONTROL

Desde hace varios años, muchos países europeos han implementado estrategias para el control y erradicación de la DVB, tales como Italia, Suecia, Países Bajos, Alemania, Australia; entre otras muchas regiones de Europa. Estos programas han demostrado ser rentables, ya que fueron basados en investigaciones epidemiológicas de la misma zona (Lértora, 2003; Rivera, 2008).

Los estudios epidemiológicos locales, son muy importantes como base para la selección de una estrategia de control; debido a la variación en la epidemiología entre las diferentes zonas geográficas, así como los sistemas de manejo; por lo que la implementación de programas debe basarse en estudios epidemiológicos realizado en las mismas condiciones en las que el programa va a ser aplicado (Lértora, 2003).

Las estrategias de erradicación dependen de la seroprevalencia, uso de vacunas, densidad poblacional y práctica de manejo. En explotaciones no infectadas, sin animales seropositivos, lo más importante es evitar el ingreso del virus a través de un estricto programa de bioseguridad, mientras que en condiciones de alto riesgo podría recurrirse a la vacunación. El uso masivo de vacunas en algunos países por más de cuatro décadas, no ha logrado la reducción de la prevalencia de la DVB (Rivera, 2008); es por eso que en hatos infectados con una alta seroprevalencia, como el caso nuestro, una vacunación extensa es considerada innecesaria y cara (Rivera, 2008).

En el Perú no existe un programa de control de la DVB; tan solo se aprecia interés de algunos ganaderos de las principales cuencas lecheras, que utilizan

voluntariamente la vacunación como estrategia de control, más que de control sistemático (Rivera, 2008). Una medida crítica en el control del VDVB es cambiar los patrones de comercio y prevenir los animales PI de ser colocados en el mercado. Una herramienta poderosa para lograr esto es sensibilizar a los comerciantes de ganado que demanden animales evaluados para DVB e informando a los criadores acerca de la DVB.

Una verdadera estrategia de control y erradicación de la DVB en áreas de alta prevalencia requiere la implementación de programas de control como: detección y remoción de animales PI, métodos de diagnóstico estandarizados, evaluación periódica del estatus de los hatos y finalmente la concientización de los criadores y comerciantes. Todo esto apoyado por las regulaciones oficiales que controlen las vías de transmisión y que coordine la erradicación en todos los rebaños de una región.

El conocimiento del manejo y los factores medioambientales que afectan al ganado infectado con el VDVB mejoraría la habilidad para controlar y prevenir la transmisión del virus, minimizando así los efectos adversos del VDVB en la salud y la productividad del rebaño.

1.6.1 Identificación y eliminación de animales persistentemente infectados (PI)

Los animales PI constituyen la fuente más importante de infección viral por lo que su detección temprana y eliminación es el punto primario de la prevención y control del VDVB (Lértora, 2003; Radostits *et al.*, 2002).

La presencia de animales PI en hatos bovinos en nuestro país ha sido reportado por varios estudios (Chacón *et al.*, 2003; Morales *et al.*, 2003; Rivera *et al.*, 2003; Jayashi *et al.*, 2005; Zúñiga *et al.*, 2006; Huamán *et al.*, 2007). Estas investigaciones demuestran que la infección con VDVB es altamente prevalente en hatos que tienen animales PI.

1.7 ANTECEDENTES DE ESTUDIOS SIMILARES

En la comunidad de Silly, provincia de Canchis departamento de Cusco; se obtuvieron suero sanguíneo de 38 bovinos hembras adultas, y que mediante la prueba de virus-neutralización se determinó la seropositividad a la DVB. El $73.7 \pm 13.9\%$ (28/38) de los bovinos presentaron anticuerpos contra la DVB (Álvarez, Rivera, *et al.*, 2002). Asimismo en el 2006, Cabello, realizó un estudio en la provincia de Calca, donde se colectaron muestras de sangre de 66 bovinos adultos, aparentemente normales, para la detección de anticuerpos contra el VDVB; mediante la prueba de neutralización viral. El 90.0% de los bovinos resultaron positivos a la prueba. Estos resultados indican que los virus en estudio están presentes en el rebaño mixto de la comunidad y podrían tener un rol primario en la presentación de los problemas respiratorios que ocurren en el rebaño (Cabello *et al.*, 2006).

En el valle de Lima, se colectaron muestras de sangre a bovinos productores de leche bajo crianza intensiva a hembras mayores a 6 meses ($n=311$) procedentes de 12 hatos sin antecedentes de vacunación contra la enfermedad de la DVB, para la detección de anticuerpos mediante la prueba de neutralización viral. El $56.0 \pm 5.5\%$ (174/311) de las muestras presentaron anticuerpos contra el VDVB. Los resultados indicaron que el VDVB estaba difundido en el valle de Lima, aunque se encuentran hatos libres de la infección viral o con una prevalencia viral muy baja (Aguilar *et al.*, 2006).

En la Irrigación de Majes, provincia de Caylloma, Arequipa; se realizó un estudio en tres fases consecutiva; donde el $98.04 \pm 1.9\%$ (200/204) de las muestras de leche por hato resultaron positivas. Después se colectaron 286 muestras de suero pertenecieron a los 57 hatos, el 47.20% (135/286) tuvieron anticuerpos contra el VDVB y 52.80% (151/286) no; además dentro de este grupo de animales seronegativos se detectaron 4 (2.65%) animales PI que pertenecieron a 3 de los 57 hatos muestreados. En los animales ($n=20$) del grupo de riesgo de los tres hatos se detectaron otros 2 animales PI, sumando un total de 6 (3.3%), además estos 6 animales PI no presentaron anticuerpos contra el VDVB. Los resultados muestran una amplia distribución del VDVB en la población bovina de los hatos de la Irrigación Majes (Huamán *et al.*, 2006).

En la provincia de Melgar, Puno; se colectaron muestras de sangre de bovino criollo de crianza extensiva (n=347) machos y hembras mayores a seis meses de edad para la detección de anticuerpos mediante la prueba de neutralización viral. El $48.7 \pm 0.1\%$ (166/347) de los animales presentó anticuerpos contra el VDVB. No se detectaron animales portadores del virus. Anticuerpos fueron detectados en animales de todos los distritos con prevalencias entre 15.7 a 94.1% (Quispe *et al.*, 2008).

En la provincia de San Pablo, Cajamarca; se colectaron muestras de sangre en bovinos criollos de crianza extensiva sin historial de vacunación (n=385). La detección de anticuerpos contra el VDVB se realizó mediante la prueba de neutralización viral. El $27.1 \pm 4.4\%$ (104/385) de los bovinos presentó anticuerpos contra el VDVB, distribuidos en los tres grupos etarios, no existiendo diferencia estadística entre las edades ($p > 0.05$). El porcentaje de hembras seroreactoras fue de $27.8 \pm 4.5\%$ (79/285) y de machos $25.1 \pm 4.3\%$ (25/100); no existiendo diferencia estadística ($p > 0.05$). Se concluye que el VDVB está presente en la población de bovinos muestreados de la provincia de San Pablo, aunque con una prevalencia baja comparada a similares estudios efectuados en otras zonas del país (Herrera *et al.*, 2009).

En la microcuenca Ccañipía, provincia de Espinar, Cusco; se colectaron muestras de sangre de 406 animales para la detección de anticuerpos contra el VDVB, donde se determinó una prevalencia de $56.2 \pm 4.8\%$ (228/406). El 86.8% (99/114) de los propietarios tuvieron al menos un animal seropositivo a la DVB (Cárdenas *et al.*, 2009).

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LUGAR DE ESTUDIO

El muestreo se realizó en las comunidades de intervención de la ONG SOLID, comprendiendo las provincias de Huamanga y Cangallo. Dentro de la provincia de Huamanga se muestrearon en los distritos de: Chiara, con las comunidades de Allpachaca, Llachoccmayo, Condorccochoa, Manallasacc, Valenzuela, Sachabamba y Quishuarcancha; en el distrito de Socos, se muestrearon las comunidades de Tambocucho, Toccyasca y Manzanayocc; en el distrito de Vinchos se muestreo la comunidad de Putacca. En la provincia de Cangallo, se muestrearon en los distritos de Los Morochuchos, muestreando las comunidades de Pariahuanca, Papachacra, Chanquil, Munaypata, Cusibamba, Cuchucancha, Churrapallana, Chalco y Ñuñunhuaycco; mientras que en el distrito de Chuschi, se muestrearon las comunidades de Catalinayocc y Puncupata.

Las muestras de estudio fueron obtenidas mediante la colaboración de los técnicos de la ONG SOLID, las que fueron procesadas en el moderno laboratorio de ESALUD en coordinación con la Escuela de Formación Profesional de Medicina Veterinaria, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho año 2010.

2.2 MATERIALES

2.2.1 Animales

Se consideraron 385 animales, mayores de seis meses; pertenecientes a 122 pequeños productores de las 22 comunidades mencionadas de las provincias de Huamanga y Cangallo, departamento de Ayacucho.

2.2.2 Materiales y Equipos

Materiales y equipos para la colección de muestras en campo:

- Tubos al vacío (sistema vacutainer)
- Agujas vacutainer
- Alcohol y algodón
- Centrifuga
- Congeladora
- Viales

Materiales y equipos de laboratorio:

- Pipetas de precisión multicanal adecuadas para dispensar de 10 µl a 100 µl
- Puntas de pipeta desechables
- Cilindro graduado de 500 ml para la solución de lavado
- Lector de microplacas
- Agua destilada o desionizada
- Dispositivo para aplicación y aspiración de Solución de Lavado
- Trampa de retención de aspirado y desinfectante
- Cámara húmeda o sellador de placas
- Vórtex

Reactivos: Kit para la detección de Anticuerpos frente al Virus de la Diarrea Viral Bovina, de procedencia comercial HerdChek BVDV Ab, del laboratorio IDEXX Switzerland AG. Es un inmunoensayo enzimático indirecto diseñado para detectar anticuerpos específicos del VDVB en muestras de suero, plasma y leche. El ensayo consiste en una técnica de ELISA indirecta, método de sándwich.

	Volumen
• Placas de microtitulación, tapizadas con antígenos de VDVB	5 placas
• Control positivo	1 ml
• Control negativo	1 ml
• Conjugado Peroxidasa de rábano (HRPO)	60 ml
• Diluyente de la muestra	60 ml
• Solución de lavado (10x)	480 ml

- Solución de sustrato TMB 60 ml
- Solución de frenado 60 ml

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Tamaño muestral

El tamaño de muestra se obtuvo mediante la fórmula para poblaciones infinitas, tomándose como referencia una prevalencia de 49.3% (Rivera, datos no publicados), con un nivel de confianza de 95% y un error de 5%, mediante la siguiente formula (Daniel, 1994):

$$n = \frac{Z^2 pq}{e^2}$$

Dónde:

n = tamaño mínimo de muestra

Z= nivel de confianza al 95% = 1.96

p = proporción de animales infectados (49.3%; Rivera datos no publicados)

q = (1-p), proporción de animales no infectados (50.7%)

e = precisión = 5%

$$N = \frac{(1.96)^2 (49.3\%) (50.7\%)}{(5\%)^2} = 385$$

2.3.2 Obtención de las muestras

Las muestras fueron colectadas por punción directa de la vena coccígea, utilizando el sistema vacutainer, a animales mayores a seis meses. Previo y durante la colección se registró el lugar, hato y nombre del propietario; así como la identificación del animal, sexo, y categoría.

Las muestras colectadas en el día, se dejaban reposar hasta la noche, para así conseguir que la sangre se coagule y sedimente, para obtener suero. Para mejorar las muestras, estas fueron centrifugadas por las noches; para luego trasvasar el suero a viales e inmediatamente llevadas a congelación. La recolección se hacía en días hábiles de la semana, los que se almacenaban a -

10°C hasta el fin de semana para finalmente transportarlas a la ciudad de Huamanga y almacenarlas en congelación a -10°C, hasta su procesamiento.

Fotografía de recolección de muestra de sangre, por medio del sistema vacutainer, para análisis de laboratorio.



2.3.3 Procedimiento para la determinación de Anticuerpos contra VDVB

La detección de los anticuerpos contra VDVB, se realizó mediante la prueba de ELISA indirecta, utilizando placas descartables de 200 pocillos, según el procedimiento de la técnica descrita por el fabricante de los reactivos HerdChek BVDV Ab, del laboratorio IDEXX Switzerland AG. A continuación se describe brevemente el procedimiento:

2.3.3.1 Preparación de reactivos:

Solución de lavado: La solución de lavado concentrada (10x) debe alcanzar la temperatura ambiente y debe agitarse para asegurar la disolución de posibles precipitados. La solución de lavado concentrada debe diluirse 1 a 10 con agua destilada/desionizada antes de su uso (Ejemplo: 30 ml de concentrado + 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.

2.3.3.2 Protocolo del ensayo: Todas los reactivos alcanzaron la temperatura ambiente, de 18 a 25°C antes de usarse. Los reactivos deben mezclarse mediante un agitado o utilizando el Vórtex. Use una punta de pipeta diferente para cada muestra.

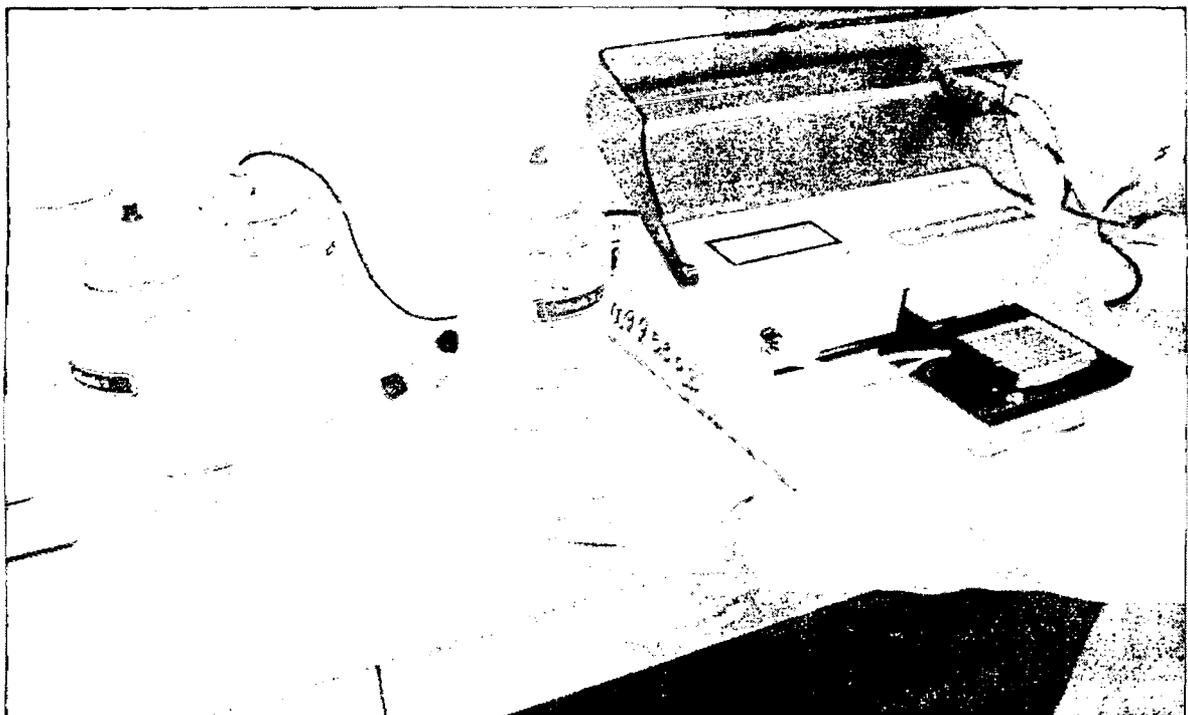
1. Tome las placas tapizadas y marque la posición de las muestras en una hoja de trabajo.
2. Añada 100 µl del diluyente de la muestra a cada pocillo. Una pipeta multicanal (8 canales) puede emplearse en esta paso
3. Añada 25 µl de control negativo en los pocillos apropiados.
4. Añada 25 µl de control positivo en los pocillos apropiados.
5. Añada 25 µl de las muestras en los pocillos restantes. Use una punta de pipeta diferente para cada muestra. Continúe en el paso 6 de la sección protocolo del ensayo.
6. Mezcle el contenido de los pocillos golpeando levemente la placa o use un agitador de placas de microtitulación.
7. Incube durante 90 minutos a temperatura ambiente (18-25°C). las placas deben ser firmemente selladas para evitar evaporaciones.
8. Aspire los contenidos líquidos de los recipientes en un reservorio apropiado.
9. 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 fina, elimine el fluido de lavado residual de cada placa golpeándola firmemente sobre material absorbente. Evite que las placas se sequen entre los lavados y antes de añadir el reactivo siguiente.
10. Dispense 100 µl de conjugado en cada pocillo.
11. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25°C)
12. Repita los pasos 8 y 9.
13. Dispense 100 µl de la solución de substrato TMB en cada pocillo.
14. Incube 10 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) en oscuridad. Comience a cronometrar después de llenar el primer pocillo.
15. Dispense 100 µl de la solución de frenado en cada pocillo para frenar la reacción. Añada la solución de frenado en el mismo orden en que la solución de substrato fue añadida en el paso 13.
16. Calibre el espectrofotómetro con aire.

17. Mida y anote la Absorbancia de las muestras y controles a 450nm usando una longitud de onda dual de 450nm y 650nm.
18. Calcule los resultados.

Fotografía de análisis de laboratorio, donde se está añadiendo 25µl de las muestras en los pocillos.



Fotografía de lector de ELISA en proceso de frenado y lavado.



2.3.3.3 Cálculo de Resultados

Para que el ensayo sea válido, la diferencia (P-N) entre la medida del control positivo (PCx) y la medida de control negativo (NCx) debe ser mayor o igual a 0.150 de densidad óptica (DO). Además, la media del control negativo (NCx) debe ser menor o igual a 0.250 DO. Para los ensayos no válidos, debe sospecharse de la técnica y el ensayo debe repetirse siguiendo una revisión meticulosa del material suministrado. La presencia o ausencia de anticuerpos por VDVB en la muestra se determina mediante el cociente M/P de cada muestra.

Cálculos:

Cálculo de la media del control negativo (NCx)

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

Cálculo de la media del control positivo (PCx)

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

Cálculo del resultado de la muestra analizada

$$M/P = \frac{\text{Muestra A450} - NCxA450}{PCx A450 - NCx A450}$$

2.3.3.4 Interpretación de los resultados

1. Las muestras con valores de M/P menores de 0.20 son consideradas como negativas para anticuerpos VDVB.
2. Las muestras con valores de M/P mayores de 0.20 pero menores a 0.30 son consideradas como dudosas. El animal debe volver a analizarse en pocas semanas.
3. Las muestras cuyos valores de M/P son mayores o iguales a 0.30 son consideradas positivas.

2.3.4 Análisis de los datos

2.3.4.1 Prevalencia a la prueba

La seroprevalencia fue determinada haciendo uso de la fórmula descrita por Thursfield (1990), según la siguiente fórmula:

$$\text{PREVALENCIA} = \frac{\text{Número de muestras positivas}}{\text{Total de muestras}} \times 100$$

2.3.4.3 Intervalo de confianza

La prevalencia obtenida son expresadas con su respectivo intervalo de confianza (IC) de 95%, según la siguiente fórmula (Daniel, 1994):

$$\text{IC} = Z\sqrt{(p \cdot q/n)} = 4.3\%$$

En donde:

Z = nivel de confianza al 95% = 1.96

p = prevalencia aparente y corregida

q = (1-p), proporción de animales no infectados (50.7%)

n = número de muestras

2.3.4.4 Prueba de Chi cuadrado

Esta prueba estadística no paramétrica se realizó para determinar si existía asociación entre las variables del estudio como los grupos edad y sexo frente la seropositividad contra el VDVB, utilizando un nivel de significación de 0.05.

Para poder realizar este análisis se dividió a los animales en cuatro grupos: animales de 1 a menores a 3 años (1 a 3 años), mayores e iguales a 3 años a menores a 6 años (3 a 6 años), mayores e iguales a 6 años a menores a 9 años (6 a 9 años) y animales mayores e iguales a 9 años (≥ 9 años).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Después de realizar la prueba de ELISA a las 385 muestras de sangre, colectadas entre los meses de mayo, junio y julio; se dieron los siguientes resultados:

3.1 SEROPREVALENCIA DE LA DIARREA VIRAL BOVINA

TABLA 1: SEROPREVALENCIA DEL VDVB EN BOVINOS, MAYORES A 6 MESES, PROVENIENTE DE 22 COMUNIDADES DE LOS DISTRITOS DE CHIARA, SOCOS, VINCHOS, CHUSCHI Y LOS MOROCHUCOS DEL DEPARTAMENTO DE AYACUCHO, 2010.

Número de comunidades	Número de criadores (hatos)	Número de muestras	Animales con anticuerpos contra el VDVB	
			N	% - IC*
22	122	385	290	75.3±4.3%

*IC: Intervalo de confianza al 95%

La tabla 1 muestra que el 75.3±4.3% (290/385) de las muestras presentaron anticuerpos contra el VDVB. Los anticuerpos detectados fueron inducidos por el VDVB de campo ya que los criadores no utilizan la vacuna como práctica para prevenir la enfermedad. No se dispone de información acerca de cuándo el virus ingresó a las comunidades de los distritos intervenidos; pero se asume que fue con los animales mejorados traídos principalmente de las cuencas ganaderas de Huancayo, Puno, Arequipa y Lima. Este alto índice de prevalencia podría deberse a la constante reintroducción del virus por la compra de animales en ferias comunales y por la falta de un control interno en el tránsito de animales.

Estudios realizados a nivel nacional y en condiciones geográficas similares a las realizadas en el presente estudio, revelan datos similares. Es así que en la comunidad de Silly, provincia de Canchis departamento de Cusco; el $73.7 \pm 13.9\%$ (28/38) de los bovinos presentaron anticuerpos contra la DVB (Álvarez *et al.*, 2002), mientras que en el Valle del Mantaro se encontraron prevalencias de $72.4 \pm 5.8\%$ (Contreras *et al.*, 2000) y $70.9 \pm 7.8\%$ (Rivera *et al.*, 2003). Asimismo se tiene resultado diferentes al nuestro en Parinacochas, Ayacucho donde se determinó una prevalencia de $85.3 \pm 3.2\%$ (Rivera *et al.*, 2001); en el valle de Lima $56.0 \pm 5.5\%$ (174/311) (Aguilar *et al.*, 2006); en la irrigación Majes indican que el VDVB tiene una prevalencia de $98.04 \pm 1.9\%$ (200/204) (Huamán *et al.*, 2007); en Calca, Cusco 90% (59/66) (Cabello *et al.*, 2006); en Melgar, Puno $48.7 \pm 0.1\%$ (166/347) (Quispe *et al.*, 2008); San Pablo, Cajamarca; en bovinos criollos de crianza extensiva $27.1 \pm 4.4\%$ (104/385) (Herrera *et al.*, 2009); Ccañipía, Espinar, Cusco; $56.2\% \pm 4.8$ (228/406) (Cárdenas *et al.*, 2009).

A nivel internacional, los estudios muestran un 60-85% de los bovinos que presentan anticuerpos positivos. En algunos países de Sudamérica como Brasil, Argentina, Colombia y Chile se reporta prevalencias superiores al 70% (Rivera, 2008).

3.2 SEROPREVALENCIA DE LA DVB, SEGÚN SEXO

TABLA 2. SEROPREVALENCIA DEL VDVB, PROVENIENTE DE 22 COMUNIDADES DE LOS DISTRITOS DE CHIARA, SOCOS, VINCHOS, CHUSCHI Y LOS MOROCHUCOS; SEGÚN SEXO. AYACUCHO, 2010.

Sexo	Animales muestreados	Animales positivos	Prevalencia del VDVB \pm IC*
Machos	12	9	75 \pm 24.5% ^a
Hembras	373	281	75.3 \pm 4.4% ^a
Total	385	290	75.3 \pm 4.3% ^a

*IC: Intervalo de confianza al 95%

^a: No existe diferencia estadística ($p > 0.05$)

Animales seroreactores fueron encontrados tanto en machos como hembras; es así que de 12 bovinos machos muestreados, 9 resultaron positivos, lo que representa el 75 \pm 24.5% (9/12); mientras que en caso de las hembras, el 75.3 \pm 4.4% resultaron positivas de un total de 373. Se puede observar que las prevalencias obtenidas de ambos sexos es similar; asimismo no se encontró asociación entre la variable sexo y la seropositividad de los animales mediante la prueba de Chi-cuadrado.

Un estudio similar en la provincia de San Pablo, Cajamarca; revela una prevalencia similar entre ambos sexos, donde el 27.8 \pm 4.5% (79/285) de las hembras resultó positivo a la prueba, mientras que en los machos el 25.1 \pm 4.3% (25/100) fueron seroreactores; pero no existiendo diferencia estadística ($p > 0.05$) (Herrera *et al*, 2009).

La actividad viral también sugiere reciente ingreso del virus a una población susceptible ya que en hatos pequeños como los de las comunidades colectadas, la infección por el VDVB tiende a ser auto limitante; pues al infectarse todos los animales quedan inmunizados naturalmente y por periodo largo, el animal por tanto está protegido contra nuevas infecciones por el mismo virus (Rivera, 2008).

3.3 SEROPREVALENCIA DE LA DVB, SEGÚN EDAD

TABLA 3. SEROPREVALENCIA DEL VDVB, PROVENIENTE DE 22 COMUNIDADES DE LOS DISTRITOS DE CHIARA, SOCOS, VINCHOS, CHUSCHI Y LOS MOROCHUCOS; SEGÚN EDAD. AYACUCHO, 2010.

Edad	Positivo	Negativo	Total	Prevalencia del VDVB \pm IC*
1 a 3 años	37	14	51	72.5 \pm 12.3% ^a
3 a 6 años	166	62	228	72.8 \pm 5.8% ^a
6 a 9 años	73	19	92	79.3 \pm 8.3% ^a
> a 9 años	14	0	14	100 \pm 0.0% ^a
Total	290	95	385	75.3 \pm 4.3%^a

*IC: Intervalo de confianza al 95%

^a: No existe diferencia estadística ($p > 0.05$)

Usualmente más del 70% de los animales inmunocompetentes infectados por el VDVB presentan una infección subclínica pero eliminan al virus a través de sus secreciones aunque por un corto periodo (Rivera, 2008), lo que indica la amplia difusión y actividad viral dentro de los diferentes grupos de edad.

Mayor prevalencia se detectó en bovinos mayores a 6 años, indicando una relación directa entre la edad y la seropositividad; lo que concuerda con otros trabajos de investigación realizados en San Pablo en Cajamarca, Espinar en Cusco, Melgar en Puno entre otros. Asimismo Mainar-Jaime *et al* (2001), demuestran que a mayor edad de los animales, mayor seropositividad a anticuerpos. La mayor prevalencia del VDVB observado en animales de más edad, puede deberse a dos factores: una debido a que el virus induce altos niveles de anticuerpos que persisten por largos períodos, para luego declinar lentamente (Lértora, 2003) y otra debido a que estos animales estuvieron expuestos al VDVB más número de veces en comparación a los animales más jóvenes. Asimismo no se encontró asociación entre la variable edad y la seropositividad de los animales mediante la prueba de Chi-cuadrado.

3.4 SEROPREVALENCIA DE LA DVB, SEGÚN LAS COMUNIDADES CAMPESINAS Y NÚMERO DE CRIADORES

TABLA 4. SEROPREVALENCIA DEL VDVB, PROVENIENTE DE 22 COMUNIDADES; SEGÚN LAS COMUNIDADES Y CRIADORES. AYACUCHO 2010.

Provincia	Distrito	Comunidad	Número de criadores muestreados	Numero de muestras	% de animales seropositivos por comunidad \pm IC*	Criadores con al menos un animal seropositivos en su hato	Prevalencia de la DVB por Distrito
Huamanga	Chiara	Allpachaca	9	19	89.5 \pm 13.8% ^a	9 (100 \pm 0.0%)	81.1 \pm 7.9%
		Llachoccmayo	5	22	68.2 \pm 19.5% ^a	5 (100 \pm 0.0%)	
		Condorccocha	3	13	53.9 \pm 27.1% ^a	3 (100 \pm 0.0%)	
		Manallasacc	5	13	100 \pm 0% ^a	5 (100 \pm 0.0%)	
		Valenzuela	1	5	100 \pm 0% ^a	1 (100 \pm 0.0%)	
		Sachabamba	2	9	77.8 \pm 27.2% ^a	2 (100 \pm 0.0%)	
		Quishuarcancha	1	14	92.9 \pm 13.5% ^a	1 (100 \pm 0.0%)	
	Socos	Tambocucho	6	8	75 \pm 30% ^a	6 (100 \pm 0.0%)	67.3 \pm 12.4%
		Toccyascca	4	7	85.7 \pm 25.9% ^a	4 (100 \pm 0.0%)	
		Manzanayocc	15	40	62.5 \pm 15% ^a	14 (93.3 \pm 12.6%)	
Vinchos	Putacca	6	29	86.2 \pm 12.5% ^a	6 (100 \pm 0.0%)	86.2 \pm 12.6%	
Cangallo	Morochuchos	Pariahuanca	2	8	75 \pm 30% ^a	2 (100 \pm 0.0%)	73.7 \pm 6.3%
		Papachacra	7	15	86.7 \pm 17.2% ^a	7 (100 \pm 0.0%)	
		Chanquil	24	58	72.4 \pm 11.5% ^a	22 (91.7 \pm 11.1%)	
		Munaypata	7	21	52.4 \pm 21.4% ^a	5 (71.43 \pm 33.5%)	
		Cusibamba	5	17	64.7 \pm 22.7% ^a	4 (80 \pm 35.1%)	
		Cuchucancha	6	32	84.4 \pm 12.6% ^a	6 (100 \pm 0.0%)	
		Churrapallana	2	8	75 \pm 30% ^a	1 (50 \pm 69.3%)	
		Chalco	2	18	77.8 \pm 19.2% ^a	2 (100 \pm 0.0%)	
	Ñuñunhuaycco	4	9	77.8 \pm 27.2% ^a	3 (75 \pm 42.4%)		
	Chuschi	Catalinayocc	2	9	66.7 \pm 30.8% ^a	2 (100 \pm 0.0%)	70 \pm 20.1%
Puncupata		4	11	72.7 \pm 26.3% ^a	4 (100 \pm 0.0%)		
Total	5	22	122	385	75.3\pm 4.3%^a	114 (93.5 \pm 4.4%)	

Los resultados obtenidos, demuestran la existencia de una alta prevalencia de por lo menos un animal seropositivo dentro de un mismo hato. Es así que de los 122 criadores cuyos animales fueron muestreados, el 93.5% (114/122) tuvieron al menos un animal seropositivo en su hato.

La alta difusión del virus en los animales de una zona ganadera sugiere prácticas comunes de manejo, cercanías durante el pastoreo, uso común de agua, reintroducción de nuevas cepas de virus por la compra de animales en ferias ganaderas con fines de cría y principalmente el desconocimiento de la enfermedad y sus medidas de bioseguridad.

En un estudio similar en la microcuenca Ccañipía, provincia de Espinar, Cusco, se determinó que el 86.8%(99/114) de los propietarios tuvieron al menos un animal seropositivo a anticuerpos contra el VDVB.

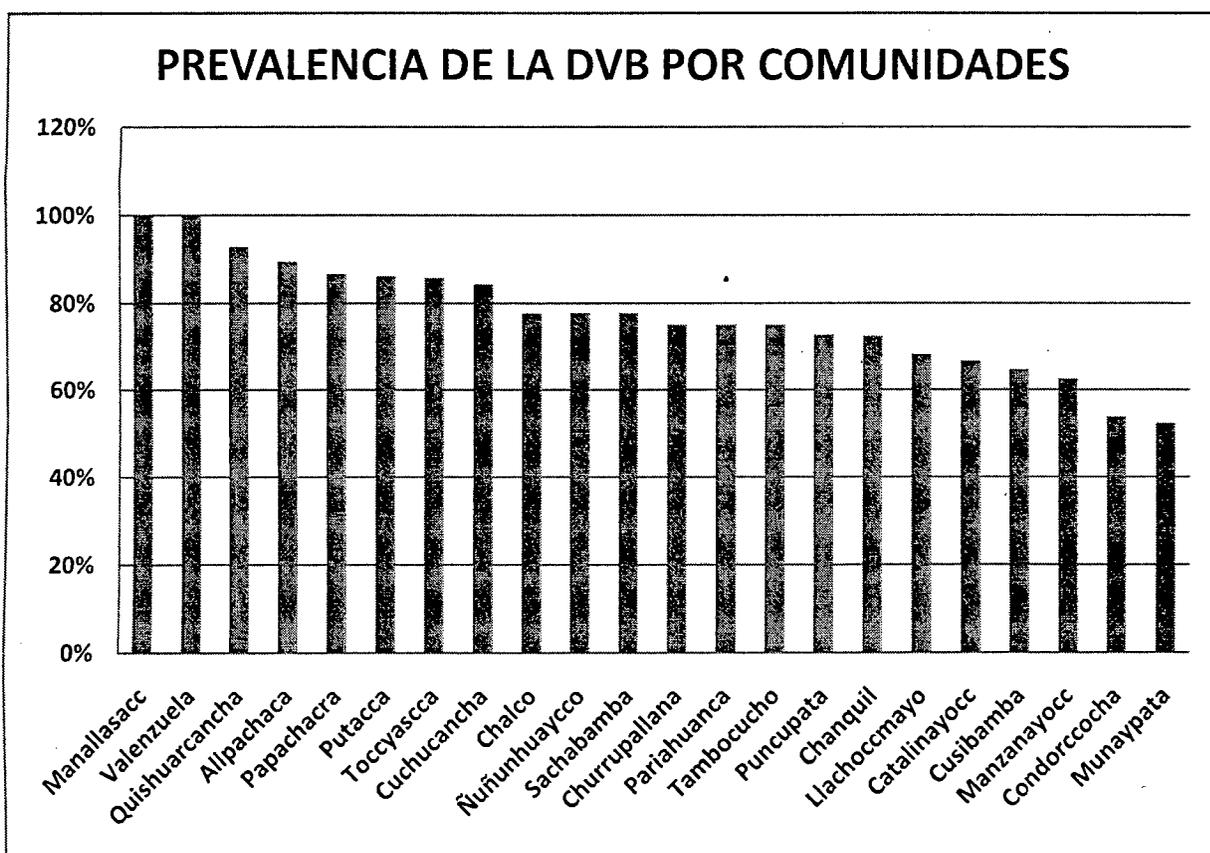


Grafico 1: Seroprevalencia de la DVB por comunidades de los distritos de Chiara, Socos, Vinchos, Chuschi y Los Morochucos, Ayacucho, 2010.

A una altitud de 3500 m.s.n.m. en promedio, los terneros PI, posiblemente no sobreviven mucho tiempo, tal vez son los que mueren en la etapa neo o perinatal, sin que el criador sepa si fue o no un PI. En las cuencas lecheras como Cajamarca, Lima y Arequipa donde el sistema de crianza es mayormente intensivo o semi intensivo; los animales PI son detectados en el grupo de animales en riesgo, es decir, desde que nace hasta antes del primer parto lo cual facilita su detección (Chacón *et al.*, 2003; Huamán *et al.*, 2007).

La prevalencia de los animales PI es de 0.5 a 2% a nivel mundial, son la fuente del virus y los más eficientes transmisores de la infección en condiciones naturales ya que en 2 a 4 meses de vida puede infectar a más del 70% de los animales del hato (Houe, 1999).

En la región, la infección por el VDVB es principalmente de tipo subclínico, posiblemente debido a la benignidad del clima, tipo de terreno y/o menor densidad de la población bovina, lo que imposibilita al virus a una eficiente transmisión. Los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian que el VDVB está difundido en el ganado bovino de crianza extensiva de las provincias de Huamanga y Cangallo, departamento de Ayacucho, y su rol podría ser el de un agente primario en la ocurrencia de problemas respiratorios, infertilidad, entre otros; pero podría estar siendo confundido con otros problemas como desnutrición, parasitosis, entre otros.

Por último, los problemas reproductivos y respiratorios frecuentes en la ganadería de la sierra son de origen multifocal, donde la DVB, es una de las enfermedades pero también es considerada uno de los agentes productores de abortos en bovinos.

CAPITULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. Se detectaron anticuerpos contra el VDVB en bovinos de crianza extensiva en los 5 distritos de la región Ayacucho, con una prevalencia de $75.3 \pm 4.3\%$ (290/385). En la provincia de Huamanga se obtuvo una prevalencia de 77.7% (139/179) mientras que en la provincia de Cangallo el 73.3% (151/206), departamento de Ayacucho.
2. La incidencia es similar tanto en sexo, edad y por comunidad. Asimismo no existió asociación estadística entre las variables sexo, edad y seropositividad contra el virus de la diarrea viral bovina en la población de bovinos estudiado.
3. La seroprevalencia del virus de la diarrea viral en bovinos de crianza extensiva, es similar a lo detectado en otras zonas andinas del sur del país.
4. Los animales son seropositivos asintomáticos en las cuencas ganaderas muestreadas.

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de seroprevalencia en otras especies de ungulados que comparten pasturas con bovinos, para identificar especies portadoras de la DVB.
2. Realizar mayores estudios de investigación en lugares específicos, con la finalidad de determinar si los casos de diarreas profusas, abortos o mortalidad neonatal son propias de la DVB.
3. Realizar el estudio del impacto económico de la infección por el VDVB.
4. Concientización y sensibilización de los criadores y comerciantes de la gravedad de la enfermedad, con la finalidad de no colocar a los bovinos recurrentes a abortos o animales persistentemente infectados en el mercado.
5. Intervención del estado para emitir regulaciones oficiales para el control y erradicación de la enfermedad; así como facilidades a los criadores para no impactar su actividad.
6. Incentivar la cultura de llevar registros en hatos ganaderos, con la finalidad de identificar los animales persistentemente infectados.
7. Identificar y eliminar a los animales persistentemente infectados, a través de los signos clínicos y corroborados con análisis de laboratorio.
8. Comprar o utilizar semen que preste las garantías y certificación correspondiente.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. **Aguilar R, Benito A, Rivera H. 2006.** Seroprevalencia del virus de la diarrea viral bovina en ganado lechero de crianza intensiva del valle de Lima. *Rev. Inv. Vet. Perú* 17(2):148-153.
2. **Álvarez S, Rivera H, Pezo D, García W. 2002.** Detección de anticuerpos contra pestivirus en rumiantes de una comunidad campesina de la provincia de Canchis, Cusco. *Rev. Inv. Vet. Perú* 13(1): 46-51.
3. **Cabello K, Quispe R, Rivera H. 2006.** Frecuencia de los virus parainfluenza-3 respiratorio sincitial y diarrea viral bovina en un rebaño mixto de una comunidad campesina de Cusco. *Rev. Inv. Vet. Perú* 17(2):167-172.
4. **Cárdenas C.A, Rivera H. 2009.** Evaluación Serológica de la Diarrea Viral en bovinos productores de leche de la micro cuenca Ccañipía, Espinar, Cusco. Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario UNMSM-Lima.
5. **Chacón J, Benito A, Rivera H. 2003.** Detección de animales portadores del virus de la diarrea viral bovina en un establo vacuno y en otro sin vacunar del valle de Lima. *Rev. Acad. Perú. Cienc. Vet.* 3(1):14-23.
6. **Contreras G, Stahl K, Arana C, Rivera H. 2000.** Anticuerpo contra el virus de la diarrea viral bovina en muestras de leche de bovinos del valle del Mantaro (Jauja, Concepción y Huancayo). *Rev. Inv. Vet. Perú* 11(1):58-65.
7. **Daniel W. 1994.** Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. De la 5ª edición en inglés. Uteha Noriega editores—México, págs.: 197, 198, 205 y 206.
8. **Gerrit Dirksen, Hans-Dieter Grunder, Matthaeus Stober. 2003.** Medicina Interna y Cirugía del Bovino. Cuarta edición Intermédica, Buenos Aires-Argentina: 521-529.

9. **Herrera A, Rivera H. 2009.** Seroprevalencia del virus de la Diarrea Viral en bovinos de crianza extensiva de la provincia de San Pablo, departamento de Cajamarca. Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario UNMSM-Lima.
10. **Huamán J.C., Rivera H, Araínga M, Gavidia C, Manchego A. 2007.** Diarrea viral bovina y animales portadores del virus en hatos productores de leche de la irrigación Majes, Arequipa. Rev. Inv. Vet. Perú 18(2): 141-149.
11. **Ian R. Tizard. 1998.** Inmunología Veterinaria. Quinta Edición McGraw-Hill Interamericana: 255-260.
12. **[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 1996.** Censo Nacional Agropecuario INEI, Ministerio de Agricultura. Lima. Tomo III y IV: 2146-2235.
13. **Jayashi C, Gavidia C, Araínga M, Manchego A, Rivera H. 2005.** Dinámica de seroconversión en hembras bovinas post eliminación de animales portadores del virus de la diarrea viral bovina. Rev. Inv. Vet. Perú 16(1): 56-64.
14. **Lértora W.J. 2003.** Diarrea Viral Bovina: actualización. Rev. Vet. 14(1):42-50.
15. **[MINAG] Ministerio de Agricultura del Peru-1996.** Producción pecuaria e industrial avícola. Presidencia de la Republica. Documento de consulta.
16. **Morales S, Benito A, Rivera H. 2003.** Terneros persistentemente infectados con el virus de la diarrea viral bovina en dos hatos lecheros de la provincial de Arequipa. Rev. Acad. Perú Cienc. Vet. 3(1):8-13.
17. **Pedrerá M., Risalde M.A., Romero-Trevejo J.L., Da Silva Alexandre A., Núñez A., Ruiz-Villamor E., Gómez-Villamandos J.C., Sánchez Cordón P.J. 2007.** Diarrea Vírica Bovina: Etiología, formas clínicas, distribución del virus y patogenia. Anales – Vol. 20(1) Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental: 136-158.
18. **Quispe R, Ccama A, Rivera H, Araínga M. 2008.** El virus de la diarrea viral en bovinos criollos de la provincia de Melgar, Puno. Rev. Inv. Vet. Perú 19(2):176-182.
19. **Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. y Hinchcliff K.W. 2002.** Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Novena edición. McGraw-Hill: 1285-1308.

20. **Rebhun W.C. 1995.** Enfermedades del ganado vacuno lechero. Editorial Acrivia Zaragoza-España:255-270.
21. **Rivera H. 1993.** El virus de la diarrea viral bovina (DVB). Rev. Inv. Pec. IVITA (Perú) 6(1):1-6.
22. **Rivera H, Valdivia L, Benito A. 2001.** Diarrea viral bovina en bovinos lecheros de crianza semi-intensiva de la provincia de Parinacochas, Ayacucho. Rev. Inv. Vet., Supl. 1:380-381.
23. **Rivera H, Huamán K, Benito A, Doaz A, Arana C., 2003.** Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina y animales portadores del virus en un hato lechero del Valle del Mantaro. Rev. Acad. Perú Cienc. Vet. 3(1):1-7.
24. **Rivera H, 2008.** Evolución del conocimiento sobre la enfermedad de la diarrea viral bovina y su agente etológico. Rev. Inv. Vet. Perú 19(1):93-112.
25. **Rondón I. 2006.** Diarrea Viral Bovina: Patogénesis e inmunología. Rev. MVZ Córdoba. 11(1):694-704.
26. **Zuñiga A, Rivera H, Arainga M, Manchago A. 2006.** Evaluación de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina de un hato en proceso de erradicación de la enfermedad. Rev. Inv. Vet. Perú 17(1):44-50.

ANEXOS

ANEXO 01: FICHA DE RECONOCIMIENTO

Número:.....
Comunidad:.....
Anexo:.....
Barrio:.....
Caserío:.....
Estancia:.....
Nombre del ganadero:.....
Nº total del ganado:.....
.....

Propietario privado Empresa Asociación Comunal

Acepta realizar la prueba: Si
No

Tiene problemas reproductivos : Si
No

Qué tipo de problemas:

- Problemas Respiratorios: Crónicos
Constantes
- Problemas diarreicos: Crónicos
Constantes
- Problemas de fertilidad
- Abortos
- Celos esporádicos
- Nacimiento de terneros muertos
- Nacimiento de terneros débiles
- Muerte de terneros antes del año
- Retención de placenta
- Otros, especificar:
.....

