

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA  
UNAN-LEÓN  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO.**

Determinación de bovinos permanentemente infectados (PI) por el virus de la Diarrea Vírica Bovina (vBVD) en fincas de los municipios de Telica y Larreynaga, durante los meses abril-mayo de 2013.

Autores:

Br. Yeltsin Samuel Bordas Areas

Br. Yasser José García Dolmus

Tutor:

Dr. Migdonio R. Quintanilla Darce.

León, Diciembre del 2013

**“A la libertad por la Universidad”**



## I. INTRODUCCIÓN

El virus de la diarrea viral bovina (vBVD) es uno de los patógenos de distribución mundial que afecta a los rumiantes domésticos y silvestres, causa pérdidas económicas debido a las infecciones transplacentarias y su asociación con otros patógenos del tracto respiratorio y digestivo <sup>(1)</sup>. El virus de vBVD pertenece al género pestivirus de la familia Flaviviridae.

Los pestivirus se replican en todas las células del hospedador, pero prefieren las células del sistema mieloide, linfoides y células epiteliales, por lo que son considerados inmunosupresores. <sup>(2)</sup>

Existen 2 biotipos: el citopático (cp) y el no citopático (ncp) según su comportamiento en cultivos celulares, y por el reordenamiento genómico del gen no estructural p125/p80, donde en unos no se obtiene el efecto visible en células (no citopático, ncp) y en otros se producen efectos visibles (citopáticos cp) en forma de vacuolización citoplasmática mediante un mecanismo apoptótico. <sup>(6)</sup>

Si el animal esta gestante, el virus atraviesa la placenta y puede ocasionar un conjunto de fetopatías que van desde la reabsorción embrionaria, abortos o mal formación congénita hasta el nacimiento de terneros infectados en forma persistente (PI) como resultado de la infección fetal entre 40 a 120 días de la gestación.

El ternero que nace infectado es inmunotolerante al virus, y por lo tanto, portador y principal diseminador del virus. La principal fuente de infección y reservorio del virus en la naturaleza son los bovinos PI. <sup>(4)(5)(9)</sup>



La mayoría de las infecciones son subclínicas, la forma aguda grave de BVD es poco frecuente, presenta elevada morbilidad y mortalidad, afecta a animales de todas las edades, se le conoce como Enfermedad de las Mucosas. <sup>(3)(8)</sup>



## **II. ANTECEDENTES.**

Este virus fue reconocido por primera vez en 1946 en Estados Unidos por Olacfon al detectar en hatos un síndrome agudo caracterizado por fiebre, diarrea, anorexia y tos. (13)

Ramsay y Chivers descubrieron una enfermedad esporádica caracterizada por diarrea profusa, emaciación, ulceraciones de la mucosa del tracto alimenticio y una mortalidad del 100% luego se descubrió que era el mismo virus de vBVD. (14)

En Colombia los primeros reportes de la enfermedad datan en 1975, tras el ingreso al país de terneros enfermos importados de Holanda. (12)

En 1996 se demostró en Colombia por primera vez la presencia de animales inmunotolerantes, persistentes infectados (PI) por BVD (2) En Chile se describen antecedentes anatomopatológicos que hacían sospechar de la presentación de la enfermedad desde el año 1983. (13)

La naturaleza insidiosa de la BVD ha llevado a pérdidas económicas sustanciales a la industria lechera y de carne, ya que la infección por BVD se encuentra ampliamente distribuida a través del mundo. El grado de difusión y prevalencia tiende a variar entre regiones y países, esta enfermedad tiende a ser endémica en la mayoría de los países con población bovina importante, de modo que el 60 a 80% del ganado presenta anticuerpos frente al agente y entre el 1 al 2% esta persistentemente infectado. (77)

En Febrero del 2006 se realizó un estudio en las fincas pilotos de San Pedro de Lóvago y Santo Tomas, el total de muestras de sangre tomadas a 31 vacas fueron analizadas en laboratorio de DGPSA, (Dirección General de Protección y Sanidad Agropecuaria)



Managua. Del total de muestras analizadas dieron negativas en un 100% a Brucelosis, Leucosis y Hemoparásitos. Se diagnosticó un caso sospechosos de Diarrea Viral Bovina (BVD) para un 96.8% negativo en ambas fincas: <sup>(14)</sup>

En Nicaragua, en el departamento de León en el año 2009, se encontró una seroprevalencia del 21.2%, lo que representa a 60 Bovinos positivos al test de ELISA para la detección de anticuerpos frente al vBVD; resultando como mayor porcentaje de machos positivos en el municipio de Malpaisillo con un 50%(1/2), seguido del municipio de León con un 17.1%(6/35). Con referencia al porcentaje de hembras positivas de igual manera el más alto se encuentra en el municipio de Malpaisillo con 50% (4/8) seguido del municipio de León con 24.5%(48/196). <sup>(78)</sup>



### **III. JUSTIFICACIÓN**

En la ganadería bovina unos de los principales problemas a los que se enfrenta es el aborto, el cual puede ser resultado de enfermedades causadas por diferentes bacterias y virus que se presentan en las explotaciones.

La diarrea viral bovina es escasamente registrada en nuestro país. Las investigaciones sobre la BVD en nuestra región, han sido esporádicas, y debido a la falta de datos específicos de la enfermedad y a la no existencia de planes por parte del gobierno en la recolecta de los mismos, hemos decidido realizar nuestro estudio para reunir valiosa información que sirva de apoyo al sector ganadero de la zona.

Este estudio es de mucha importancia ya que además de la detección de los PI contribuirá a la erradicación del virus lo que vendrá a disminuir las pérdidas económicas que este genera. Hoy por hoy el mercado nacional e internacional es muy exigente por lo que debemos darle la importancia necesaria a esta enfermedad. <sup>(15)</sup>



#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

¿Cuál es la prevalencia de ganado bovino permanentemente infectado (PI) con el virus de la Diarrea Vírica Bovina en fincas de los municipios de Telica y Larreynaga, durante los meses abril-mayo de 2013?



## **V. OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

- Determinar la prevalencia de animales permanentemente infectados (PI) por el virus de la Diarrea Vírica Bovina en los municipios de Telica y Larreynaga, en los meses de abril-mayo del 2013.

### **Objetivos Específicos:**

- Identificar la presencia de anticuerpos específicos frente al virus de la Diarrea Vírica Bovina (vBVD) en muestras de sueros de ganado bovino mediante una prueba de ELISA indirecto.
- Identificar la presencia del virus de la Diarrea Vírica Bovina (vBVD) en muestras de sueros de ganado bovino mediante una prueba de ELISA de captura de antígeno.
- Determinar la distribución geográfica de los focos de infección en los municipios a muestrear.
- Contribuir a la mejora del sector agropecuario mediante la detección y control de la BVD.
- Aportar datos actualizados sobre distintos aspectos de la Diarrea Vírica Bovina y conocer su situación en el sector a estudiar.



## VI. MARCO TEORICO

- Concepto:

El virus de la diarrea viral bovina (vBVD), es el agente causal del complejo diarrea viral bovina (BVD)/enfermedad de las mucosas (EM), es responsable de la ocurrencia de diferentes cuadros clínicos, de variable intensidad y gravedad <sup>(75)</sup>. El carácter inmunodepresor del virus predispone al animal a otras enfermedades causadas por agentes comensales y/o patógenos secundarios oportunistas. <sup>(76)</sup> 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. Las estrategias de erradicación dependen de la situación epidemiológica regional; básicamente consisten en la identificación y eliminación de bovinos persistentemente infectados, principal fuente de infección y reservorio del virus <sup>(77)</sup>

- Etiología

*Taxonomía y estructura.* El virus de la diarrea viral bovina (vBVD) pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*. Son virus envueltos, esféricos y miden 40 a 60 nm de diámetro. Se componen de una cadena simple de ARN compactado por una cápside proteica, rodeada por una membrana fosfolípídica con tres glicoproteínas ancladas a ella <sup>(16)</sup>.

Los animales persistentemente infectados son más importantes como reservorios, los animales con infección aguda pueden ser más importantes para la generación de nuevas variantes antigénicas <sup>(17)</sup>.



### Clasificación.

La clasificación del BVD es difícil, debido a su variabilidad genética y antigénica y a su estrecha relación con otros miembros del género *Pestivirus* (virus de la peste porcina clásica y virus de la enfermedad de la frontera del ovino). Los *hospedadores* en que eran aislados los *Pestivirus* fueron las bases iniciales para su subdivisión. Así, los *Pestivirus* que eran aislados del cerdo, ovino y bovino se los clasificaba como virus de la peste porcina clásica, virus de la enfermedad de la frontera y BVD, respectivamente. Sin embargo, este criterio de clasificación es poco fiable debido a que los *Pestivirus* cruzan fácilmente la barrera de especie <sup>(16)</sup>

Según sus efectos en los cultivos celulares, los *Pestivirus* se dividen en *biotipos* citopáticos (CP) y no citopáticos (NCP). Los virus CP ocasionan vacuolización y muerte celular, los virus NCP no ocasionan cambios visibles en el cultivo celular y la célula infectada parece normal. Esto no implica que los biotipos NCP sean no patogénicos. Por el contrario, es el biotipo predominante en la naturaleza, aislado de la mayoría de las formas clínicas y el único capaz de originar infección persistente <sup>(19)</sup>. El biotipo CP se aísla únicamente de animales con Enfermedad de las Mucosas y 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. <sup>(19)</sup>

- Epidemiología

*Prevalencia de la infección.* Esta enfermedad tiene una distribución mundial y la infección tiende a ser endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas. La mayoría de las encuestas en los diferentes países alcanza niveles de 0,5 a 2% de bovinos persistentemente infectados (PI) y 60 a 80% de bovinos seropositivos <sup>(21)</sup>.



*Hospedador.* Los *Pestivirus* infectan naturalmente sólo a los ungulados del Orden *Artiodáctila*. Los *Pestivirus* rumiantes infectan a porcinos, bovinos, ovinos, caprinos, alpacas, llamas, camellos, búfalos de agua y rumiantes silvestres. Estas consideraciones deben tomarse en cuenta a la hora de implementar un programa de control, ya que los *Pestivirus* cruzan la barrera de especie <sup>(47)</sup>

*Fuente de infección.* La principal fuente de infección y reservorio del virus en la naturaleza son los *bovinos PI*. Ellos eliminan continuamente durante toda su vida grandes cantidades del virus en secreción nasal, saliva, orina, materia fecal, lágrimas, semen y leche. Los animales con infección aguda también son fuente de infección; aunque menos eficiente, ya que eliminan el virus en cantidades más bajas y por cortos períodos <sup>(22)</sup>.

*Modos de transmisión.* La transmisión puede ser vertical u horizontal, por contacto directo o indirecto.

*Transmisión vertical.* La infección transplacentaria ocurre en hembras susceptibles infectadas durante la preñez. Si el feto es infectado por biotipos NCP antes de adquirir competencia inmunológica (antes del día 125 de gestación, aproximadamente) desarrollará una infección persistente <sup>(3)</sup>. Pese a la elevada tasa de mortalidad de los animales PI en su primer año de vida (más de 50%), muchos alcanzan la madurez sexual y se reproducen <sup>(45)</sup>. Hembras PI siempre dan terneros PI. La transmisión vertical también ocurre luego de la transferencia embrionaria si el recipiente es PI, o la vaca donante es PI y no se realiza el correcto lavado del embrión <sup>(22), (35)</sup>.

*Transmisión horizontal.* El *contacto directo* con animales PI, especialmente contacto nariz–nariz, es el modo más eficiente de transmisión en condiciones naturales <sup>(34)</sup>. El contacto directo con animales que cursan una infección aguda también puede transmitir el virus <sup>(22), (35)</sup>.



Se ha demostrado experimentalmente la transmisión por vía aérea a corta distancia entre bovinos persistentemente infectados a bovinos centinelas. Aunque la transmisión aerógena no es la principal ruta de transmisión, puede tener consecuencias graves cuando cepas de alta virulencia afectan a poblaciones susceptibles y con alta densidad animal <sup>(24)</sup>.

El semen crudo o criopreservado de toros PI o con infección aguda es una importante vía de transmisión horizontal. Para evitar el uso de estos animales, en los centros de inseminación se debe recurrir al aislamiento viral y a un período de cuarentena que supere la fase aguda de la infección. 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 <sup>(25)</sup>

Esta última situación se presenta cuando la infección ocurre en la pubertad, durante la formación de la barrera inmunológica hemato–testicular, permitiendo al virus replicarse dentro del testículo y evadir la respuesta inmune. Por lo tanto, es esencial un examen del eyaculado antes que el semen sea distribuido <sup>(25)</sup>.

Experimentalmente se han demostrado varias vías de *transmisión indirecta* como el uso de agujas, palpación rectal y la acción de insectos hematófagos, minutos después de haber estado en contacto con animales PI. Sin embargo, su importancia práctica aún no está clarificada, ya que es un virus que se inactiva fácilmente. Es rápidamente inactivado por el calor, desecación, luz ultravioleta, detergentes, solventes orgánicos y pH que exceda el rango de 5,7 a 9,3 <sup>(26)</sup>. Otra modo importante de trasmisión es el uso de vacunas a virus vivo modificado o vacunas contaminadas <sup>(22), (35)</sup>.



- Patogenia

El BVD es responsable de originar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones como resultado de la interacción de factores tales como: cepa y biotipo viral, edad y estado inmune del hospedador, respuesta inmune inducida, factores estresantes y otros patógenos concurrentes <sup>(27)</sup>.

*Diarrea viral bovina aguda.* Es una infección post natal aguda, de severidad variable, en bovinos seronegativos e inmunocompetentes <sup>(41)</sup> <sup>(28)</sup>.

*Infección subclínica.* La mayoría de las infecciones son subclínicas o de carácter moderado, con fiebre, descarga oculonasal, leucopenia transitoria, elevada morbilidad y baja mortalidad <sup>(41)</sup> <sup>(28)</sup>. Se desarrollan anticuerpos neutralizantes 14 a 28 días postinfección y consecuentemente la protección contra reinfecciones por cepas homólogas del virus es de por vida <sup>(29)</sup>

*Complejo diarrea neonatal bovina.* Cuando fracasa la transferencia pasiva de anticuerpos, el virus participa en el complejo diarrea neonatal de los terneros. Infecciones concurrentes con enteropatógenos resultan en manifestaciones clínicas más severas, debido al efecto inmunodepresivo del vBVD o simplemente a una sumatoria de efectos. <sup>(30)</sup>

*Infección aguda severa.* Inicialmente se prestaba poco interés a las infecciones agudas, dada su baja mortalidad. Sin embargo, cada vez son más frecuentes los informes de infección aguda severa de elevada morbilidad y mortalidad, asociada con virus de alta patogenicidad, caracterizada por fiebre elevada, signos respiratorios, diarrea, tormenta de abortos, caída en la producción de leche y muerte súbita <sup>(31)</sup><sup>(32)</sup>. En otros casos, la exposición a cepas de alta virulencia ocasiona una enfermedad con signos clínicos y lesiones anatomopatológicas similares a la forma enfermedad mucosa <sup>(33)</sup> <sup>(34)</sup> <sup>(35)</sup>.



*Síndrome hemorrágico.* Virus del genotipo 2 del vBVD se asocian a una condición fatal denominada síndrome hemorrágico. Se caracteriza por mucosas anémicas con hemorragias petequiales y equimóticas, hipertermia, hemorragia en múltiples sistemas orgánicos, diarrea sanguinolenta, epistaxis, sangrado constante en los sitios de inyección, anemia, leucopenia, trombocitopenia y muerte <sup>(36)</sup>, <sup>(37)</sup>. Esta signología se atribuye a trombocitopenia y alteración de la función plaquetaria.

*Inmunodepresión.* El vBVD ocasiona leucopenia y altera las funciones de los leucocitos, aumentando la patogenicidad de microorganismos coinfectantes. Tiene una fuerte afinidad por el tejido linforeticular, ocasionando necrosis y atrofia de dichos tejidos <sup>(41)</sup>.

*Enfermedades respiratorias.* El vBVD origina inmunodepresión sistémica y pulmonar, aumentando la patogenicidad de los restantes agentes respiratorios <sup>(38)</sup><sup>(39)</sup>. Además, se ha demostrado que ciertos virus de la diarrea viral bovina actúan como agentes primarios de neumonías <sup>(40)</sup><sup>(41)</sup>.

*Trastornos reproductivos.* El mayor impacto económico de la infección con el vBVD es el ocasionado por los trastornos reproductivos <sup>(42)</sup><sup>(43)</sup>.

La infección aguda *altera la función ovárica y reduce la fertilidad.* El vBVD ocasiona un retraso en el desarrollo de los folículos pre-ovulatorios durante dos ciclos estrales consecutivos <sup>(44)</sup>, reducción de los niveles de estradiol durante la fase folicular <sup>(45)</sup> y disminución o ausencia de las oleadas de hormona luteinizante pre-ovulatoria o retraso en el tiempo del pico de hormona luteinizante pre-ovulatoria <sup>(46)</sup>

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

*Etapas 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 <sup>(47)(48)(49)</sup>. Se desconoce cómo los biotipos NCP afectan al embrión. El virus no tiene efecto sobre el crecimiento y desarrollo de los embriones hasta el día 8–9, momento en que pierden la zona pelúcida y se vuelven susceptibles. El resultado de la infección puede ser citolítico o no. Ambos terminan en muerte embrionaria, aunque la infección no citolítica también puede causar daño cromosómico, resultando en el desarrollo de malformaciones. Por otra parte, la replicación del virus en células oviductales puede alterar sus funciones biológicas, como la secreción de factores embriotrópicos que soportan el desarrollo embrionario <sup>(50)</sup>.

*Día 45 a 125 de gestación:* Este período comienza al finalizar la etapa embrionaria y culmina cuando el feto adquiere competencia inmunológica al vBVD. El momento exacto en que el feto adquiere competencia inmunológica al virus no es claro; se han detectado anticuerpos neutralizantes contra el virus en fetos infectados entre los días 100 y 135 de gestación. La infección con biotipos NCP antes que el feto adquiriera competencia inmunológica, resulta en el nacimiento de animales persistentemente infectados e inmunotolerantes. Durante este período también se produce muerte fetal con momificación o aborto meses después y un pequeño porcentaje de teratogénesis. <sup>(42)(43)</sup>

*Día 125 a 175 de gestación:* Este período representa el comienzo de la inmunocompetencia fetal y del estado de organogénesis, momento en el cual se presenta un gran porcentaje de alteraciones del desarrollo. También se pueden producir abortos, pero éstos son más frecuentes en las etapas tempranas de gestación. Se pueden observar distintos tipos y grados de malformaciones tales como hipoplasia cerebelar, microencefalia, hipomielogénesis, hidranencefalia, hidrocefalia, atrofia o hipoplasia de timo, cataratas, microftalmia, degeneración de retina, hipoplasia y neuritis del nervio óptico, alopecias, hipotricosis, hipoplasia pulmonar, braquignatismo, artrogriposis, retraso general del crecimiento y deformidades esqueléticas.



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. La inmunohistoquímica reveló abundante cantidad de antígeno en glándula pituitaria, hipotálamo y tiroides de un ternero infectado *in útero* con trastornos severos y generalizados de la osteogénesis. Este hallazgo sugiere que el virus altera el metabolismo hormonal fetal originando trastornos del desarrollo esquelético <sup>(51)</sup>

*175 días de gestación en adelante:* En esta etapa el feto se encuentra en un período de crecimiento general y es inmunológicamente competente. Las infecciones en este período resultan en el nacimiento de terneros seropositivos normales o débiles; mientras que los abortos son ocasionales. <sup>(42)(43)</sup>

*Infección persistente.* Un animal persistentemente infectado es aquél en que es posible aislar el virus de la sangre o tejidos en dos ocasiones sucesivas con un intervalo no menor a dos semanas. Estos animales son virémicos durante toda su vida y no producen anticuerpos contra la cepa que les originó inmunotolerancia. La infección persistente debe ser considerada en todo ternero pequeño al nacimiento, con escaso desarrollo y ganancia de peso, débil y con cuadros recurrentes de enfermedad respiratoria y digestiva. Otros son clínicamente normales, siendo indispensable el laboratorio para su diagnóstico <sup>(28) (52)</sup>.

*Enfermedad mucosa.* Esta condición solo ocurre en animales PI que sufren sobreinfección con biotipos CP homólogos. En esta forma se aíslan ambos biotipos, que son antigénicamente similares. El biotipo CP surge de mutaciones del biotipo NCP, aunque no se descartan fuentes externas. Es una forma esporádica, fatal, de curso agudo o crónico y se caracteriza por severa leucopenia, diarrea profusa, erosiones y ulceraciones en el sistema digestivo <sup>(52) (41) (28)</sup>.



- Diagnostico

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 <sup>(54)</sup>. El objetivo principal del diagnóstico es la detección y remoción de bovinos PI, principal fuente de infección y reservorio del virus.

*Serología.* La distribución de anticuerpos en los distintos grupos de edades de rebaños con animales PI y sin animales PI, determina que existan 5 fases en el ciclo de infección:

*Fase A:* Rebaños con infección aguda sin animales PI. Solo un pequeño porcentaje del rebaño será seropositivo.

*Fase B:* Rebaños infectados con animales PI menores de 3–4 meses de edad. La mayoría de los animales están bajo una infección aguda, a una velocidad variable dependiendo del sistema de producción.

*Fase C:* Rebaños infectados con animales PI mayores de 3–4 meses de edad. Usualmente, más del 90% del rebaño es seropositivo.

*Fase D:* Rebaños previamente infectados, donde los animales PI han sido removidos recientemente. Los animales jóvenes serán seronegativos cuando pierdan sus anticuerpos calostrales a los 6–8 meses de edad. Los animales adultos permanecen seropositivos.

*Fase E:* Rebaño previamente infectado, donde los animales PI han sido removidos hace varios años. Todos los animales jóvenes serán seronegativos (excepto algunos terneros con anticuerpos calostrales). Eventualmente el rebaño se volverá seronegativo <sup>(22)</sup>.



Estos estudios epidemiológicos han permitido desarrollar diferentes métodos serológicos para la detección de rebaños con infección activa (con bovinos PI) de manera simple, eficaz y económica.

El análisis serológico de una pequeña muestra de sangre tomada al azar de terneros de 6 a 12 meses de edad permite distinguir rebaños con infección activa, de rebaños sin bovinos PI, con un alto grado de seguridad <sup>(55)(56)(57)</sup>. Se pueden cometer errores de clasificación cuando los rebaños poseen animales PI muy jóvenes, que no han tenido tiempo de infectar a los animales seronegativos remanentes, cuando los sistemas de explotación y la virulencia de la cepa permitan una diseminación lenta, o si se toma la muestra de animales menores de 6 meses de edad, los cuales tendrán anticuerpos calostrales. Estos problemas se solucionan repitiendo el examen unos meses después <sup>(56)</sup>.

*Detección del virus o componentes virales.* Una vez identificados los rebaños con infección activa, se debe testear individualmente a los animales para detectar a los bovinos PI. Para ello contamos con cuatro métodos diferentes.

- *Aislamiento viral.* El aislamiento viral es el método de referencia, es 100% específico y altamente sensible. Sin embargo, es económicamente prohibitivo para ser usado en el diagnóstico de animales PI en un programa de control y erradicación <sup>(58)</sup>. El cultivo celular se ha optimizado con el sistema *microtitre multi-well*, donde células cultivadas en placas con múltiples pocillos son inoculadas con 10 a 50 µl de suero problema e incubadas por 4 días; la presencia de biotipos NCP se detecta con el empleo de anticuerpos anti-BVD marcados con peroxidasa o fluorocromos <sup>(59)</sup>.
- *Detección de antígenos mediante enzimo-inmunoensayo (ELISA).* La prueba de ELISA utiliza anticuerpos monoclonales o policlonales para “capturar” antígenos del vBVD en muestras de sangre. Comparado con el aislamiento viral, es un método rápido y



- económico, por lo tanto, es el método de preferencia para la detección a gran escala de animales PI <sup>(58)</sup>.

Los sistemas ELISA basados en anticuerpos policlonales dirigidos contra varias proteínas y glicoproteínas de cepas antigénicamente diferentes, son capaces de detectar una amplia variedad de vBVD. Este sistema, comparado con el aislamiento viral, ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad (97,9% y 99,7% respectivamente) y es comparable a los sistemas ELISA que utilizan un pool de anticuerpos monoclonales <sup>(60)</sup>. Por otra parte, los sistemas ELISA basados en un anticuerpo monoclonal epitope específico son cuestionables, debido a que su estrecho rango de especificidad puede fallar en detectar algunas cepas del BVD <sup>(61)</sup>

- *Detección de antígenos mediante inmunohistoquímica (IHQ)*. La IHQ se realiza, rutinariamente, en tejido fijado en formalina y embebido en parafina; aventajando a otras técnicas en términos de conveniencia en la remisión de las muestras, posibilita el estudio retrospectivo de muestras enviadas para examen histopatológico y permite una precisa asociación entre el antígeno viral con tipos celulares y lesiones histológicas. <sup>(58)</sup>

La IHQ de tejidos fijados en formalina es el método diagnóstico más conveniente para la detección del BVD en fetos. Hay un significativo número de resultados falsos positivos y falsos negativos con la inmunofluorescencia (sensibilidad: 77%, especificidad: 83%), y significativo número de falsos negativos con el aislamiento viral (sensibilidad: 83%, especificidad: 100%), mientras que la IHQ posee el mejor desempeño: especificidad: 97% y sensibilidad: 97% <sup>(62)</sup>. En casos de fetos con avanzada autólisis, la IHQ de cerebro fijado en formalina se recomienda sobre el aislamiento viral y la detección de antígeno por ELISA <sup>(63)(7)</sup>

La presencia del antígeno del BVD en queratinocitos de la epidermis y células epiteliales de folículos pilosos de bovinos PI clínicamente normales <sup>(64)</sup>, ha originado el



desarrollo de la técnica inmunohistoquímica en biopsias de piel para el diagnóstico de estos animales. Esta técnica, en comparación con el aislamiento viral, ha demostrado ser eficaz, rápida, económica, sencilla y fácilmente implementable en cualquier laboratorio de histopatología. Además, la colección y remisión de las muestras al laboratorio es simple. Las muestras fijadas en formalina son más estables que las muestras de sangre o suero, evitándose así falsos negativos por autólisis o putrefacción, y los anticuerpos calostrales no interfieren con la técnica, permitiendo analizar terneros neonatos <sup>(65), (66), (67), (68), (69), (70)</sup>.

*Detección del ácido nucleico viral.* La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método rápido, sensible, que detecta diversos BVD y permite investigar un gran número de muestras en corto tiempo <sup>(71)</sup>. Su sensibilidad permite detectar el virus en pool de muestras de sangre y leche de tanque <sup>(72)(73)</sup>. Sin embargo, su elevada sensibilidad puede originar resultados falsos positivos <sup>(74)</sup>.



- Tratamiento

No existe tratamiento curativo, solamente tratamiento paliativo.



## **VII. MATERIAL Y MÉTODO**

### **Tipo de estudio:**

Descriptivo de tipo Transversal.

### **Ubicación del estudio:**

Se realizó este estudio para determinar el porcentaje de bovinos permanentemente infectados (PI) en el sector de Telica y Larreynaga, que se encuentra ubicado en el departamento de León. Las muestras se tomaran en 9 fincas del sector: Telica, San Jacinto, El caimito, La calera, Jorge Barreto, San Idelfonso, Malpaisillo, Puente La Milagrosa y La carbonera.

### **Población en estudio, tamaño y selección de la muestra:**

Este estudio se realizó en 9 fincas que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión en el sector de Telica y Larreynaga con una población total de 707 individuos, el tamaño de la muestra se calculó utilizando el Programa estadístico Win episcopo 2.0 con una prevalencia esperada de 10.5 %, un error aceptado de 5 % y un nivel de confianza de 95% obteniéndose un tamaño de muestra de 121 especímenes, de los cuales 45 son hembras adultas y 47 hembras jóvenes resultando un total de 92 hembras, y 29 machos de los cuales 4 son machos adultos y 25 machos jóvenes, con esto se pretende detectar la presencia de PI (permanentemente infectados) en los distintos hatos bovinos. Las fincas fueron seleccionadas por conveniencia. Tabla 1. Ver anexos.

La raza predominante en las fincas muestreadas es el Pardo Brahman, estas fincas no presentan tecnificación, los animales se alimentan de pasto natural y agua de pozos



artesanales. La selección de la muestra se hizo por conveniencia, tomando en cuenta solamente las fincas en donde no se aplicó vacunas contra el BVD, y se codificaron del número 1 al 9 según la siguiente tabla 2. Ver anexos.

#### **Criterios de inclusión:**

- Que la explotación sea de doble propósito (producción de carne y de Leche)
- Que sean bovinos machos y hembras.
- Que no hayan sido vacunados.
- Que el propietario acepte la participación voluntaria en el estudio.
- Que disponga de los animales en el momento específico de tomar la muestra.

#### **Criterios de exclusión:**

- Que hayan sido vacunados frente al BVD.
- Que los propietarios no hayan querido participar.

#### **Técnicas y métodos de recolección de los datos:**

En primera instancia se les explicará al productor(a) dueño de los animales los objetivos del estudio (consentimiento informado), luego se procederá a la aplicación de un instrumento de recolección de datos sobre el hato, que conllevara datos como: Identificación del bovino, edad, raza, sexo, propietario, ubicación de la finca, teléfono celular, para posteriormente extraer la sangre por punción de la vena coccígea de los bovinos.



**Limitaciones:**

- Muestras perdidas por mal manejo y hemólisis.

**Ventajas:**

- Acceso fácil al muestreo, debido a que las fincas están cerca de la ciudad y cerca de la carretera.
- Participación voluntaria de parte de los propietarios.
- La prueba ELISA de detección de antígenos es de alta confiabilidad para detectar animales PI.



## **VIII. RESULTADOS**

1. El resultado por Elisa de captura de anticuerpos fue del 55.4 %.
2. El resultado por Elisa de captura de antígeno fue 0%.
3. El 62% de los focos de BVD se ubican en el municipio de Telica.
4. El 38% de los focos de BVD se ubican en el municipio de Larreynaga.
5. Los resultados crudos provenientes del lector de placas de Elisa, no suministran resultados positivos.
6. El procesamiento de los datos confirma lo expresado en el punto anterior.
7. En base a este resultado se comprueba la inexistencia de animales PI en las fincas muestreadas.



## **IX. DISCUSIÓN**

1. La prevalencia de seroreactores en fincas exentas de vacunación, es posible explicar por la elevada circulación de semovientes entre fincas o en los caminos de acceso, así como por la compra de sementales y hembras de reposición sin análisis previos ni cuarentena.
2. Al no encontrar PI en ninguno de los animales muestreados, se evidencia la no preferencia del virus por sexo o raza.
3. Podemos afirmar que la presencia de anticuerpos en los especímenes analizados es producto de contaminación por virus campo circulantes de baja patogenicidad ya que los anticuerpos calostrales no son detectables después de los 6 meses de vida, y en este caso todos cumplen con esa condición.
4. Es posible que el mayor porcentaje de seroreactores encontrados en el municipio de Telica sea atribuible al acceso a matadero en vehículos únicos para transporte de ganado y servicio a la finca.
5. El hecho de no encontrar ningún PI, puede atribuirse a la muerte temprana de los mismos, debida a la inmunosupresión o a deformaciones que aparecen en esta patología.



## **X. CONCLUSIONES**

1. Se confirma la presencia de seroreactores en un 55.4 %.
2. El porcentaje de PI es 0.
3. El 62 % de focos están ubicados en el municipio de Telica.
4. El porcentaje de seroreactores es superior a los resultados obtenidos por Hernández y Henríquez en 2010 y López y Salgado en 2011.



## **XI. RECOMENDACIONES**

1. Iniciar un programa de vacunación frente al BVD en las fincas muestreadas, vacunando solamente a los animales sanos y la reposición antes de la primera monta o inseminación, y revacunando cada seis meses. La vacuna por sí sola no elimina los animales PI y debe emplearse como una herramienta para evitar la reintroducción de la infección.
2. Debemos tener presente que en los rebaños con infección activa, el 60% o más de los bovinos son seropositivos y naturalmente inmunes al BVD; por lo tanto, no tiene sentido vacunar a una población donde la mayoría de sus individuos ya está protegida.
3. Establecer un plan de vigilancia serológica. Los esfuerzos deben dirigirse a la detección y eliminación de los bovinos PI, principal fuente de infección y reservorio.
4. Mejorar las condiciones higiénico-sanitarias de las fincas, con el fin de disminuir la incidencia del agente a través de fómites.
5. En Nicaragua los estudios de la enfermedad son aún escasos. Queda mucho por investigar en términos de situación epidemiológica en distintas regiones, impacto económico de la infección, prerrequisitos indispensables para planear una estrategia de erradicación y control. Además, se desconoce la real participación de este virus como causal de patologías digestivas, respiratorias y reproductivas del bovino en nuestros sistemas de producción.



## **XII. REFERENCIAS**

1. Houe, H. 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 31: 137-143).
2. (Collet, M.S.; V. Moening; M.C. Horzinek. 1989. Recent advances in pestivirus research. *J. Gen. Virol.* 70: 253-266).
3. Houe, H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Practice* 11: 521-547) (Schreiber, P.; E. Dubois; F. Dreze; N. Lacroiz; B. Limbourg; P. Coppe. 1999. Prevalence of bovine virus diarrhoea virus infection in Belgain white blue cattle in southern Belgium. *Vet. Quart.* 21: 28.32)
4. Brown T, De la Hunta A, Scott F, et al.. 1975. In: Moening V. Liess B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin north Amer* 1995; 11: 477-487)
5. Blood D, Henderson J, Radostis D. *Medicina Veterinaria. España. Editorial interamericana de España Mc Graw Hill.* 1992. 2: 909-922.)
6. Weinstock D, Bhudevi B, Castro A. Singletube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 343-346.).
7. Fray M, Prentice M, Clarke C, Charleston B. immunohistochemical evidence for the localization of bovine viral diarrhoe virus, a single-stranded RNA virus, in ovarian oocytes in the cow. *Vet Pathol* 1998; 35: 253-259, Glew E, Howard C. Antigen-presenting cells from calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, a member of the flaviviridae, are not compromised in their ability to present viral antigen. *J Gen Virol* 2001; 82: 1677-1685)
8. Raymond G. BVDV. *Veterinarians corner* 2002; 2(9).



9. Frederiksen B, Press C, Loken T, Odegaard SA Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhea. *Vet Microbiol* 1999; 64:109-122
10. Moennig V, Liess B. pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Amer* 1995; 11:477-487
11. Baker, J. 1995. The clinical manifestation of bovine viral diarrhea infection in BVD virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Practice* 11: 425-445)
12. BORDA A. R. Diarrea Viral Bovina en terneros y terneras procedentes de Holanda. "Tesis". *MedVet. Universidad Nacional de Colombia, sede de Bogotá* 1975.
13. Fiedler, H., V. Cubillos, E. Paredes, G. Reinhardt, S. Riedemann, M. Niedda, M. Aguilar. 1986. Enfermedad mucosa – diarrea viral bovina. Hallazgos anatomopatológicos de los primeros casos en Chile, *Arch. Med. Vet.* 18: 151-155)
14. MAGFOR, Enfermedades infecciosas, prevención enfermedades infecciosas y hemoparásitos, JICA agencia de cooperación internacional de Japón, 2006.
15. Rweyemamu, M. (1990) incidencia, epidemiología y control de la diarrea viral bovina,. Recuperado el 7 de noviembre del 2013 de <http://www.oie.int/doc/ged/D9423.PDF>)
16. Donis RO. 1995. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Food Anim. Pract.* 11: 393–423.
17. Nettleton PF, Entrican G. 1995. Ruminant Pestiviruses. *Br. Vet. J.* 151: 615–642.
18. Paton DJ, Lowings JP, Ramírez GC. 1994. Stability of the gp53 gene of a bovine viral diarrhoea virus isolated at different times from a persistently infected steer. *Br. Vet. J.* 150: 603–607.



19. Paton DJ. 1995. Pestivirus Diversity. *J. Comp. Path.* 112: 215–236.
20. Deregt D, Loewen KG. 1995. Bovine viral diarrhoea virus: biotypes and disease. *Can. Vet. J.* 36: 371–377.
21. Meyers G, Tautz N, Dubovi EJ, Heinz–Jürden Thiel. 1996. Origin and diversity of cytopathogenic Pestivirus. *International Symposium Bovine Viral Diarrhoea Virus a 50 Year Review*, Cornell University, USA, pp. 24–34.
22. Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64: 89–107.
23. Houe H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Food Anim. Pract.* 11: 521–547.
24. Baker JC. 1987. Bovine viral diarrhoea virus: A review. *JAVMA* 190: 1449–1458.
25. Mars MH, Brusckke CJ, Van Oirschot JT. 1999. Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Vet. Microbiol.* 66: 197–207.
26. Fray MD, Paton DJ, Alenius S. 2000. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61: 615–627.
27. Tremblay R. 1996. Transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Med.* 91: 858–866.
28. Bielefeldt Ohmann H. 1995. The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection. *Food Anim. Pract.* 11: 447–476.
29. Kelling CL. 1996. The effects of BVDV infection on cattle. *Vet. Med.* 91: 862–863.



30. Fredriksen B, Sandvik T, Loken T, Odegaard SA. 1999. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 144: 111–114.
31. De Verdier Klingenberg K. 2000. Enhancement of clinical signs in experimentally rotavirus infected calves by combined viral infections. *Vet. Rec.* 147: 717–719.
32. Drake TR, Moore DA, Whitlock RH, Castro AE, Hattel AL, Reams R, Stoffregen W. 1996. An outbreak of acute BVD in Pennsylvania cattle. *International Symposium Bovine Viral Diarrhea Virus a 50 Year Review*, Cornell University, USA, pp. 208.
33. Sockett D, Bolin D, Ridpath J, Bolin S. 1996. Outbreak of acute bovine viral diarrhea (BVD) in Wisconsin. *International Symposium Bovine Viral Diarrhea Virus A 50 Year Review*, Cornell University, USA, pp. 207.
34. David GP, Crawshaw TR, Gunning RF, Hibberd RC, Lloyd GM, Marsh PR. 1994. Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *Vet. Rec.* 134: 468–472.
35. Hibberd RC, Turkington A, Brownlie J. 1993. Fatal bovine viral diarrhoea virus infections of adult cattle. *Vet. Rec.* 132: 227–228.
36. Tremblay R, Carman S, Stevenson D, Lusi P, Caldwell D, Shapiro J. 1996. Acute BVD in Ontario. *International Symposium Bovine Viral Diarrhea Virus a 50 Year Review*, Cornell University, USA, pp. 65.
37. Bolin SR, Ridpath JF. 1992. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in calves. *Am. J. Vet. Res.* 53: 2157–2163.
38. Pernthaner A, Schilcher F, Baumgartner W. 1997. Acute bovine viral diarrhoea virus infections in Austrian cattle. *Israel J. Vet. Med.* 52: 104–107.



39. Brodersen BW, Kelling CL. 1998. Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus infections on respiratory tract and enteric diseases in calves. *Am. J. Vet. Res.* 59: 1423–1430.
40. Grooms DL. 1998. Role of bovine viral diarrhoea virus in the bovine respiratory disease complex. *Bov. Pract.* 32: 7–12.
41. Baule C. 2000. Molecular characterization of bovine viral diarrhoea virus, an important pathogen of cattle. *Acta Universit. Agric. Sueciae* 95: 9–38.
42. Hamers C, Couvreur B, Dehan P, Letellier C, Lewalle P, Pastoret P, Kerkhofs P. 2000. Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea virus strains isolated from hemorrhagic syndromes. *Vet. J.* 160: 250–258.
43. Dubovi EJ. 1994. Impact of bovine viral diarrhoea virus on reproductive performance in cattle. *Food Anim. Pract.* 10: 503–514.
44. Moennig V, Liess B. 1995. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Food Anim. Pract.* 11: 477–487.
45. Grooms DL, Brock KV, Pate JL, Day ML. 1998. Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Theriogenology* 49: 595–605.
46. Fray MD, Mann GE, Clarke MC, Charleston B. 1999. Bovine viral diarrhoea virus: its effects on estradiol, progesterone and prostaglandin secretion in the cow. *Theriogenology* 51: 1533–1546.
47. McGowan MR, Kafi M, Kirkland PD, Kelly R, Bielefeldt Ohmann H, Occhio MD, Jillella D. 2003. Studies of the pathogenesis of bovine Pestivirus–induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology* 59: 1051–1066



48. Grahn TC, Fahning ML, Zemjanis R. 1984. Nature of early reproductive failure caused by bovine viral diarrhea virus. *JAVMA* 185: 429–432.
49. McGowan MR, Kirkland PD, Rodwell BJ, Kerr DR, Carroll CL.. 1993. A field investigation of the effects of bovine viral diarrhea virus around the time of insemination on the reproductive performance of cattle. *Theriogenology* 39: 443–449.
50. Virakula P, Fahning ML, Joo HS, Zemjanis R. 1988. Fertility of cows challenged with a cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus during an outbreak of spontaneous infection with a noncytopathic strain. *Theriogenology* 29: 441–449.
51. Vanroose G, De Kruif A, Van Soom A. 2000. Embryonic mortality and embryo–pathogen interactions. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61: 131–143.
52. Constable PD, Hull BL, Wicks JR, Myer W. 1993. Femoral and tibial fractures in a newborn calf after transplacental infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 132: 383–385.
53. Taylor LF, Janzen ED, Ellis JA, Van Den Hurk JV, Ward P. 1997. Performance, survival, necropsy, and virological findings from calves infected with the bovine viral diarrhea virus originating from a single Saskatchewan beef herd. *Can. Vet. J.* 38: 29–37.
54. Ames TR. 1986. The causative agent of BVD: its epidemiology and pathogenesis. *Vet. Med.* 81: 848–869.
55. Bielefeldt Ohmann H. 1995. The pathologies of bovine viral diarrhea virus infection. *Food Anim. Pract.* 11: 447–476.
56. Bitsch V, Houe H, Nylin B, Ronsholt L. 1997. Examination of blood and bulk tank milk samples to monitor the bovine viral diarrhoea infections status of cattle



57. herds, Proceedings of the 3th Symposium on Pestiviruses, sept. 1996, Lelystad, Netherlands. ESVV, pp. 158–161.
58. Houe H. 1992. Serological analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy herds. Res. Vet. Sci. 53: 320–323.
59. Reinhardt G, Riedemann S, Tadich N. 2002. Muestreo predial pequeño para predecir una infección activa por virus diarrea viral bovina (BVD) en planteles lecheros de la Xª Región, Chile. Arch. Med. Vet. 34: 97–101.
60. Dubovi EJ. 1996. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. Vet. Med. 91: 867–872.
61. Sandvik T. 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. Vet. Microbiol. 64: 123–134.
62. Ronsholt L, Nylin B, Bitsch V. 1997. A BVDV antigen– and antibody blocking ELISA (DVIV) system used in a Danish voluntary eradication program, Proceedings of the 3er Symposium on Pestiviruses, sept. 1996, Lelystad, Netherlands. ESVV, pp. 150–153.
63. Graham DA, McLaren IE, German A. 1998. Evaluation of the suitability of a commercial bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA for diagnostic testing. Vet. J. 157: 149–154.
64. Ellis JA, Martin K, Norman GR, Haines DM. 1995. Comparison of detection methods for bovine viral diarrhoea virus in bovine abortions and neonatal death. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 433–436.
65. Thür B, Hilber M, Strasser M, Ehrensperger F. 1997. Immunohistochemical diagnosis of Pestivirus infections associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. Am. J. Vet. Res. 58: 1371–1375.



66. Bielefeldt Ohmann H. 1983. Pathogenesis of bovine viral diarrhea–mucosal disease: distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves. *Res. Vet. Sci.* 34: 5–10.
67. Brodersen BW, White AK, Smith DR. 1998. Immunohistochemical test on skin biopsies as a method for detection of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Proc. Am. Assoc. Bov. Pract.* 31: 246.
68. Grooms DL, Keilen ED. 2002. Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clin. Diagn. Lab. Imm.* 9: 898–900.
69. Haines DM, Clark EG, Dubovi EJ. 1992. Monoclonal antibody–based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhea virus in formalin–fixed, paraffin–embedded tissues. *Vet. Pathol.* 29: 27–32.
70. Lertora WJ. 2002. Inmunohistoquímica en biopsias de piel y en bulbos pilosos, para el diagnóstico de bovinos persistentemente infectados con el virus diarrea viral bovina. Tesis de Maestría, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, p. 61–90.
71. Njaa BL, Clark EG, Janzen E, Ellis JA, Haines DM. 2000. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin–fixed skin biopsy specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 393–399.
72. Thür B, Zlinsky K, Ehrensperger F. 1996. Immunohistochemical detections of bovine viral diarrhea virus in skin biopsies: a reliable and fast diagnostic tool. *J. Vet. Med B* 43: 163–166.



73. Ward P, Misra V. 1991. Detection of bovine viral diarrhea virus, using degenerate oligonucleotide primers and the polymerase chain reaction. *Am. J. Vet Res.* 52: 1231–1236.
74. Laamanen UI, Neuvonen EP, Yliviuhkola EM, Veijalainen PML. 1997. Comparison of RT–PCR assay and virus isolation in cell cultures for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in field samples. *Res. Vet. Sci.* 63: 199–203.
75. Renshaw RW, Ray R, Dubovi EJ. 2000. Comparison of virus isolations and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhea virus in bulk milk tank samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 184–186.
76. Corapi, W.V., R.D. Elliott, T.W. French, D.G. Arthur, D.M. Bezek, E.J. Dubovi. 1990. Trombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196: 590-596.
77. Duffell, S.J., J.W. Harkness; 1985. Bovine virus diarrhoeamucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.* 117: 240-245.
78. Lian R, Babiuk L. Compatibility of plasmid encoding bovine viral diarrhea virus type 1 and type 2 E2 in a single DNA vaccine formulation. *Vaccine* 2007; 25: 5994-6006. ; Mehdy S, Shen S, Talbot B, Massie B, Harpin S, Elazhary Y. Recombinant adenoviruses expressing the E2 protein of Bovine Viral Diarrhea virus induce humoral and cellular responses. *Microbiology Letters* 1999; 177: 159-165.
79. Hernández y Méndez, seroprevalencia de Diarrea Viral Bovina en 5 municipios del departamento de León, comprendido de Marzo a Septiembre del año 2009. Tesis para optar al título de licenciado en Medicina Veterinaria. Nicaragua, UNAN León, 2009.



### **XIII. ANEXOS**

➤ **Técnica Prueba de ELISA:**

- ✓ Dispense 50 ul de los anticuerpos de detección en cada pocillo.
- ✓ 50 ul de control positivo y negativo, las cuales van después de depositar las muestras en cada pocillo.
- ✓ 50 ul de la muestra en cada pocillo.
- ✓ Mezclar el contenido de los pocillos golpeando levemente.
- ✓ Incubar por 2 horas a 37 grados centígrados. Lavar cada pocillo con aproximadamente 300 ul de solución de lavado 5 veces.
- ✓ Dispense 100 ul de conjugado en cada pocillo.
- ✓ Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- ✓ Lavar los pocillos de nuevo 5 veces.
- ✓ Dispense 100 de solución de sustrato en cada pocillo.
- ✓ Incube 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad,
- ✓ Dispense 100 de solución de frenado en orden.
- ✓ Leer la placa.



Tabla 1

Código de la finca	Muestras	Total Finca
1	24	211
2	12	54
3	9	33
4	15	79
5	15	94
6	16	104
7	5	18
8	10	44
9	15	70
Total	121	707

Tabla 2.

Código de la finca	Nombre de la finca	Hembras jóvenes	Hembras adultas	Total Hembras	Machos jóvenes	Machos adultos	Total Machos	Total
1	La Grencha	150	40	190	17	4	21	211
2	San Marco	22	26	48	4	2	6	54
3	La Candela	22	8	30	2	1	3	33
4	Sta. Teresa	30	42	72	4	3	7	79
5	El Socorro	45	33	78	15	1	16	94
6	La Milagrosa	29	38	67	35	2	37	104
7	La Huertona	8	6	14	3	1	4	18
8	Las Lechuzas	22	14	36	6	2	8	44
9	El Hormiguero	12	37	49	20	1	21	70