UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TITULO DE INGENIERO AGROPECUARIO

Seroprevalencia y factores de riesgo asociados al virus de la diarrea vírica bovina (VDVB) en bovinos de leche y doble propósito en Ecuador.

ARTÍCULO ACADÉMICO

AUTOR: Ramos Ortiz, Raúl Fernando

DIRECTOR: Saa, Luis Rodrigo Ph.D.

LOJA – ECUADOR

2017

Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es

2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL ARTÍCULO ACADÉMICO

Doctor. Ph.D.

Luis Rodrigo Saa

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente Articulo académico **Seroprevalencia y factores de riesgo asociados al virus de la diarrea vírica bovina (VDVB) en bovinos de leche y doble propósito en Ecuador**. Realizado por Raúl Fernando Ramos Ortiz ha sido orientado y realizado durante su ejecución por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Septiembre 2017

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Ramos Ortiz Raúl Fernando declaro ser el autor del presente artículo académico: Seroprevalencia y factores de riesgo asociados al virus de la diarrea vírica bovina (DVB) en bovinos de leche y doble propósito en Ecuador de la titulación de Ingeniería Agropecuaria, siendo Luis Rodrigo Saa. Dr. Ph.D. Director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f. …….
Autor: Ramos Ortiz Raúl Fernando
Cédula: 1104194855

DEDICATORIA

El presente trabajo de fin de titulación lo dedico a mi madre un pilar fundamental en mi vida gracias a ella he logrado llegar a donde estoy y ser la persona con metas y sueños propuestos que llegare a cumplir.

A mi esposa Katty con sus palabras de aliento y apoyo me inspira cada día a tomar nuevos objetivos.

Al gran amor de mi vida Doménica el motor para salir adelante, con su amor inocente e incondicional, que esta meta cumplida le dé un ejemplo de lucha y persistencia.

AGRADECIMIENTOS

Primero gracias a Dios.

El presente trabajo de investigación es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas: leyendo, opinando, corrigiendo, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, por permitirme realizar los estudios profesionales a través de su Titulación de Ingeniería Agropecuaria y de manera especial a todos los docentes que aportaron en mi formación compartiendo sus conocimientos.

A mi director de tesis Dr. Luis Rodrigo Saa, por permitirme realizar este trabajo de investigación y formarme como profesional dentro de su excelente equipo de trabajo.

Al Dr. Daniel Capa por su valiosa ayuda y buena disponibilidad

.

Raúl

RESUMEN

Se realizó un estudio transversal para determinar la seroprevalencia y los factores de riesgo asociados a la infección por virus de diarrea viral bovina (BVDV) en vacas lecheras y doble propósito no vacunados en Ecuador. Un total de 2.367 muestras de suero de 346 rebaños. En cada rebaño se completó un cuestionario con variables relacionadas con la salud, medio ambiente y el manejo. Para determinar la seropositividad se aplicó un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas de tipo comercial. Se utilizó un modelo de regresión logística para determinar los factores de riesgo a nivel de cada rebaño. La seroprevalencia individual de BVDV en los rebaños no vacunados procedentes de Ecuador fue de 36,2% (857 / 2,367). La prevalencia en el rebaño fue del 74% (256/346) y la prevalencia intra-rebaño varió entre 11,1% y 100% (media = 51,6%). El modelo de regresión logística mostró que la densidad de las fincas ganaderas en la zona (más del 70%) y la altitud (superior a 2,338 m.snm.) son potenciales factores de riesgo asociados con la infección por BVDV.

Palabras clave: Virus de la diarrea viral bovina (BVDV), regresión logística, vacas lecheras, bovinos de doble propósito, factores de riesgo, Ecuador, seroprevalencia.

ABSTRACT

A cross-sectional study was carried out to determine the seroprevalence and risk factors associated with Bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in nonvaccinated dairy and dual-purpose cattle herds from Ecuador. A total of 2,367 serum samples from 346 herds were collected from June 2008 through February 2009. A questionnaire, which included variables related to cattle, health, management measures, and the environment, was filled out in each herd. A commercial indirect enzymelinked immunosorbent assay test was used to determine the seropositivity. A logistic regression model was used to determine risk factors at herd level. The individual seroprevalence for BVDV in non-vaccinated herds in Ecuador was 36.2% (857/2,367). The herd prevalence was 74% (256/346) and the intra-herd prevalence ranged between 11.1% and 100% (mean=51.6%). The logistic regression model showed that the density of cattle farms in the area (more than 70%) and the altitude (higher than 2,338 m above sea level) are potential risk factors associated with BVDV infection.

Keywords Bovine viral diarrhea virus (BVDV). Logistic regression. Dairy. Dual purpose. Risk factors. Ecuador. Seroprevalence.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA i

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS iii

DEDICATORIA iv

AGRADECIMIENTOS v

RESUMEN 1

ABSTRACT 2

INDICE DE CONTENIDOS 3

INTRODUCCIÓN 5

OBJETIVOS 8

MATERIALES Y MÉTODOS 9

1 Población en estudio. 10

2 Determinación del tamaño de la muestra. 11

3 Diseño del cuestionario epidemiológico y obtención de los datos. 12

3.1 Encuesta epidemiológica 12

4 Descripción de las variables 17

4.1 Variables de localización 17

4.2 Variables relacionadas con las características de las explotaciones. 18

4.3 Variables relacionadas con las instalaciones 19

4.4 Variables relacionadas con las posibilidades de contagio. 21

4.5 Variables relacionadas con la alimentación. 22

4.6 Variables relacionadas con la reproducción. 24

4.7 Variables relacionadas a la puesta en práctica de medidas sanitarias. 24

4.8 Variables relacionadas con los animales 26

4.9 Variables relacionadas con el sistema de producción. 27

5 Obtención y procesado de las muestras de sangre. 27

6 Análisis serológicos. 27

6.1 Virus de la Diarrea Vírica Bovina (VDVB). 27

7 Métodos y análisis estadísticos. 29

7.1 Eliminación de variables. 29

7.2 Clasificación y codificación. 30

7.3 Análisis estadísticos. 30

7.3.1 Análisis descriptivo o univariante. 30
7.3.2 Análisis bivariante. 30
7.3.3 Análisis multivariante. 31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 34
CONCLUSIONES 40
BIBLIOGRAFÍA 41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Provincias ecuatorianas incluidas en el estudio 10
Figura 2.- Fincas muestreadas en Ecuador…. ..... .11
Figura 3: Cuestionario epidemiológico para la recogida de datos por explotación. 14
Figura 4: Cuestionario para las variables recogidas de forma individual. 16

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1: Explotaciones y muestras analizadas por cantones y provincias. ---------- 16

INTRODUCCIÓN

El ganado bovino es susceptible de infectarse con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en todas las edades (Bhudevi, & Weinstock, 2003).

Este virus está extendido por todo el mundo. Los síntomas clínicos varían desde un carácter subclínico hasta una enfermedad de desenlace fatal llamada “enfermedad de las mucosas (EM)” (David, 2011). Generalmente, las infecciones agudas pueden producir una diarrea pasajera o neumonía, en forma de brotes que afectan a diferentes grupos de animales (Brock, 2005). Se han descrito formas agudas de la enfermedad con una mortalidad alta asociadas a menudo, aunque no siempre, a un síndrome hemorrágico; sin embargo, la mayor parte de las infecciones de los terneros jóvenes son leves y pasan clínicamente inadvertidas (Drew, Yapp, & Paton, 1999). El virus se difunde principalmente por contacto entre el ganado (Vaccine, Dean, & Leyh, 2010).

La transmisión vertical juega un papel importante en su epidemiología y patogenia (Vaccine, Dean, & Leyh, 2010).

Las infecciones del feto bovino pueden producir abortos, partos con terneros muertos, efectos teratogénicos o una infección persistente en el ternero neonato. Los animales con viremia persistente pueden nacer como terneros débiles o pueden tener la apariencia de terneros normales sanos que pasan clínicamente desapercibidos (Bolin, 1993). Algunos de estos animales pueden desarrollar posteriormente la enfermedad de las mucosas con anorexia, erosiones gastrointestinales y diarrea profusa, lo que les conduce invariablemente a la muerte (Donis, 2012). La enfermedad de las mucosas puede producirse solo en animales infectados persistentemente (Clarke, Brownlie, & Howard, 1997).

Es importante evitar el comercio de animales con viremia, considerando que el ganado serológicamente positivo sin viremia está “sano”, siempre que no esté grávido (David, 2011). El ganado grávido que es positivo a los anticuerpos y que gesta fetos IPI es transmisor importante del virus dentro de los rebaños. Alrededor del 15% de los animales con viremia persistente tienen anticuerpos frente a la proteína NS/2, (*virus hepatitis C*). Sin embargo, el ser seropositivo no equivale a “estar sano” (David, 2011).

Se cree que las infecciones latentes no se producen generalmente después de la recuperación de infecciones agudas, aunque el semen de animales con infección aguda y, ocasionalmente, de animales recuperados, puede ser sospechoso (Cornish, 2015).

Si conocemos el manejo del ganadero y los factores que aumentan el riesgo de infección por VDVB, se puede mejorar la capacidad de controlar y prevenir la transmisión al minimizar los efectos adversos de la infección por el VDVB en el rebaño nos proporcionará salud y productividad (Hamel, Wasylyshen, & Nayar, 2004).

En los países de América Latina es una de las principales fuentes de pérdidas debido a la falta de medidas preventivas, como vacunación y el desconocimiento de la verdadera prevalencia y los factores que lo determinan (Lindberg, & Alenius, 2011).

El VDVB es un pestivirus dentro de la familia Flaviviridae (Brock, 2005). Se presenta en dos formas: citopatogénico y no citopatogénico. Hay dos genotipos antigénicamente distintos (los tipos 1 y 2), y los aislamientos de virus dentro de estos grupos muestran una considerable diversidad biológica y antigénica (Entrican, Dand, & Netleton, 2013).

Los animales sanos con viremia persistente a causa de infecciones congénitas se pueden identificar fácilmente aislando el virus no citopatogénico en cultivos celulares de sangre o de suero. Es necesario usar un método de inmunomarcaje para detectar el crecimiento del virus en los cultivos, existen también métodos alternativos basados en la detección directa del antígeno vírico o de ARN vírico en leucocitos (Delamnoy J, 2005). Se debería confirmar la persistencia del virus mediante nuevo muestreo después de un intervalo de al menos 3 semanas. Generalmente, estos animales no tienen anticuerpos contra el VDVB o niveles muy bajos (Bolin, & Ridpath, 1992).

La viremia en casos agudos es pasajera y puede ser difícil de detectar. En los casos mortales de enfermedad hemorrágica, se puede aislar el virus de tejidos post mórtem (Brownlie, 2005). La confirmación de la enfermedad de la mucosa se puede hacer mediante aislamiento del biotipo citopatogénico del VDVB, particularmente de tejidos intestinales. También se puede detectar el virus no citopatogénico, especialmente en sangre (Brownlie, 1990).

La infección aguda con el VDVB se confirma mejor demostrando la seroconversión mediante el uso de muestras pareadas secuenciales de varios animales en el grupo (Kim, & Dubovi, 2003). El muestreo pareado (muestras de casos agudos y de convalecientes) debería hacerse con una separación mínima de 21 días, y las muestras deberían analizarse en paralelo.

El enzimoinmunoensayo (ELISA) y la prueba de neutralización del virus son las pruebas más utilizadas (Kenny, 2013).

No existe una vacuna estándar para DVB, pero se dispone de varias preparaciones comerciales (Grooms, and col, 2008).

La vacuna con virus vivo modificado no debería administrarse a ganado gestante (o a sus terneros lactantes) debido al riesgo de infección a través de la placenta. También existe el riesgo de inducir la enfermedad de las mucosas en animales infectados persistentemente. (Clarke, Brownlie, & Howard, 1997).

Generalmente, las vacunas con virus muertos requieren una vacunación de recuerdo (Leen, 2010).

La vacuna ideal debería poder prevenir la infección transplacentaria en vacas gestantes. (Loehr, 2008).

El VDVB supone un riesgo particularmente importante en la transferencia de embriones y la fabricación de productos biológicos para uso veterinario debido a la alta frecuencia de contaminación de los lotes de suero fetal bovino, utilizados como suplemento de los medios de cultivo. Las vacas sometidas a transferencia de embriones corren el riesgo de contraer la infección (Bielanski, Sapp, & Lutze., 1998).

En estudios previos, se han identificado como principales factores de riesgo: la edad, origen de la vaca, intercambio de visitas entre trabajadores agrícolas adyacentes, y no aislar los nuevos animales comprados antes de la adición al rebaño (Katz, & Hanson, 2007).

La presente investigación pretende dar a conocer la situación actual de la DVB y su distribución geoespacial en el Ecuador, ejecutando para el análisis técnicas y herramientas de alta sensibilidad y especificidad como es el ELISA (Enzime Linked Immunosorbent Assay). Cabe indicar que la presente investigación es el primer y único reporte de la enfermedad en Ecuador a nivel internacional hasta el presente año (Saa, 2011).

OBJETIVOS

Para la presente investigación se plantean los siguientes objetivos

Objetivo general

- Estudiar la situación epidemiológica actual de la Diarrea Vírica Bovina (DVB) en bovinos de leche y doble propósito en Ecuador.

Objetivos específicos.

- Determinar de la seroprevalencia y dispersión (herd prevalence) del agente vírico implicado en el BVDV, en explotaciones lecheras de Ecuador.

- Estudio de las características zootécnicas, de infraestructura básica y manejo de las explotaciones lecheras como potenciales factores de riesgo asociados a la BVDV

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Población en estudio.

El estudio ha sido realizado en explotaciones bovinas de aptitud láctea y mixta situadas en las principales provincias productoras de leche bovina de Ecuador: (Figura 1). Las cuales agrupan el 62 % de las UPA´s (Unidades de Producción Agropecuaria) del país y producen más del 64% del total nacional de leche (INEC-MAG-SICA, 2001).

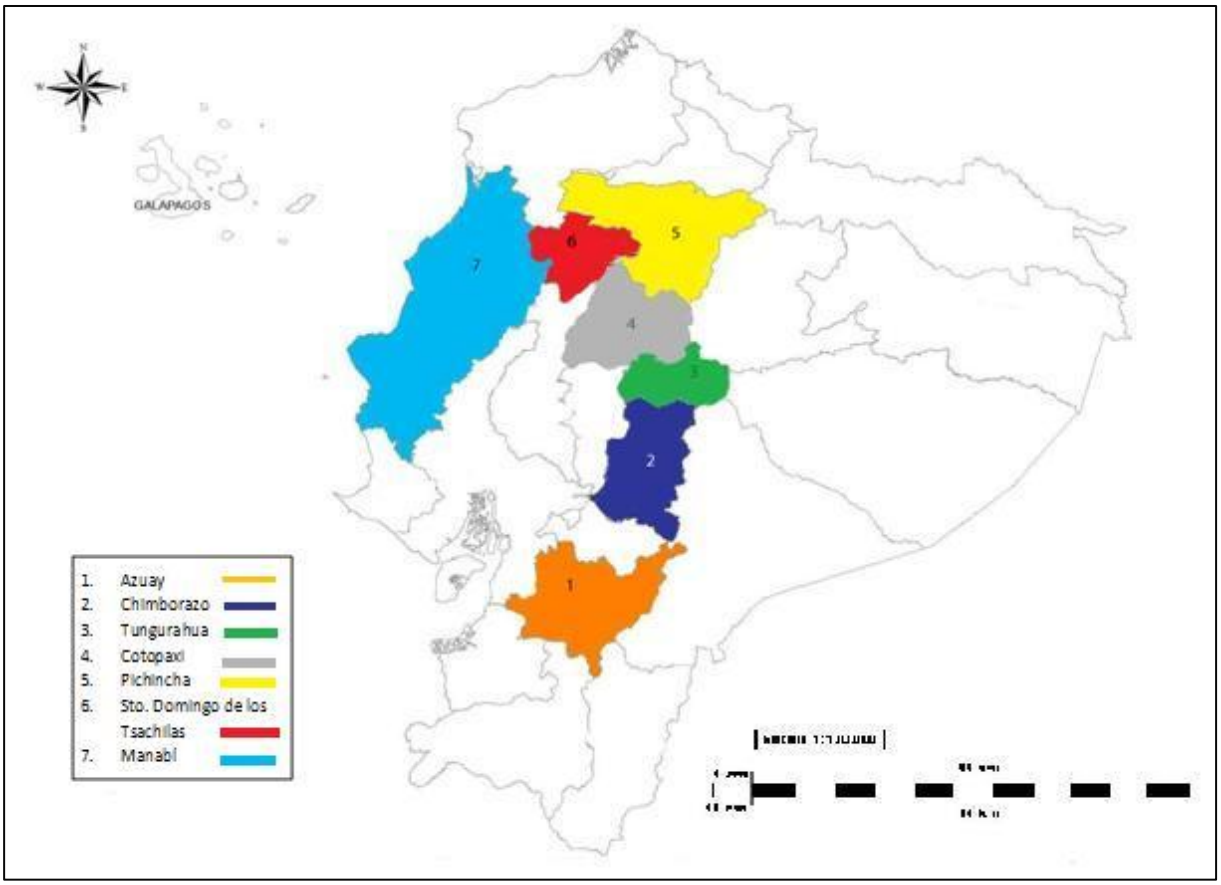

Figura 1.- Provincias ecuatorianas incluidas en el estudio

Fuente: (INEC-MAG-SICA, 2001)

Elaboración: Raúl Ramos

El muestreo se realizó en tres etapas: la primera mediante muestreo estratificado por provincias, con el objeto de que la muestra obtenida por provincia sea proporcional al censo total (Saa, 2011). En una segunda etapa, dentro ya de cada provincia, se realizó un muestreo por conglomerados, para ello, se dividió cada provincia en cuadrantes de cinco Km2, considerándose cada cuadrícula resultante como un conglomerado (Saa, 2011). A continuación, se eligieron de forma completamente aleatoria los cuadrantes o conglomerados de cada provincia en los que sería realizado el muestreo. Dentro de cada conglomerado se visitaron y tomaron muestras de todas las explotaciones delimitadas por el cuadrante. Finalmente, en cada explotación los individuos a muestrear se eligieron mediante

muestreo aleatorio simple, incluyendo todos los animales mayores de seis meses (Thrusfield, 2007). El período de muestreo se llevó a cabo entre los meses de junio de 2008 y febrero de 2009 (Saa, 2011).

En la figura 2 se representan las explotaciones estudiadas en las diferentes provincias ecuatorianas en las que tuvo lugar el muestreo. En estas provincias se concentra más del 70 % del ganado bovino de aptitud lechera y de doble aptitud de Ecuador (INEC-MAG-SICA, 2001).

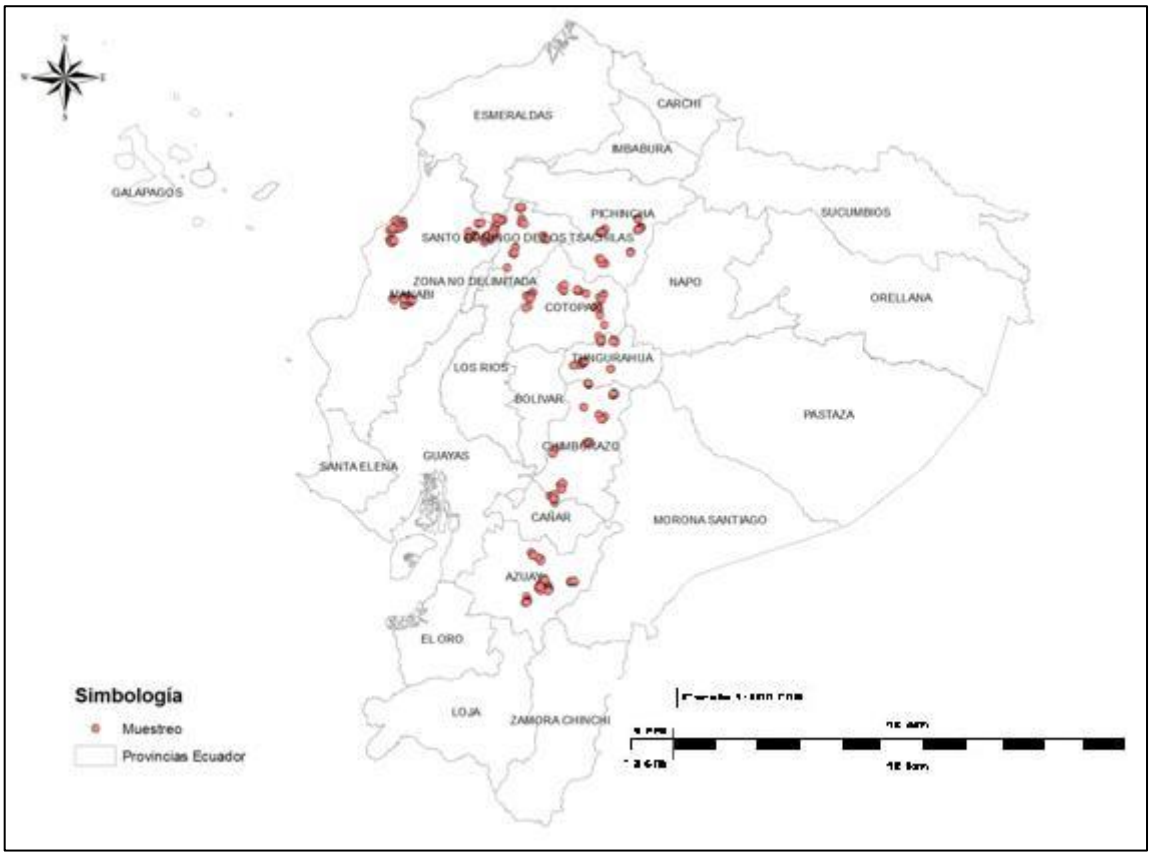

Figura 2.- Fincas muestreadas en Ecuador.

Fuente: (INEC-MAG-SICA, 2001)

Elaboración: Raúl Ramos

2 Determinación del tamaño de la muestra.

Para el cálculo del tamaño de la muestra se recurrió al programa informático de Epidemiología Veterinaria WinEpiscope 2.0 (http://www.winepi.net/sp/index.htm), de libre difusión y desarrollado por el Gobierno de Aragón en colaboración con la Universidad de Zaragoza, la Universidad de Wageningen y la Universidad de Edinburgo.

Según datos del INEC-MAG-SICA (2001) el censo total de bovinos en Ecuador se estimó en 4.486.020 unidades bovinas (UB) agrupadas en 806.856 Unidades de Producción Agropecuaria (UPA`s). Con objeto de obtener el tamaño de muestra preciso para el cálculo de la dispersión o prevalencia por explotaciones, usamos un valor de prevalencia esperada del 65%, menor de la descrita en otros países de Sudamérica, un error admitido del 5% y un nivel de confianza del 95%, se obtuvo un tamaño de muestra de 350 explotaciones. Finalmente, se tomaron muestras de 365 explotaciones. Dado que la menor dispersión obtenida ha sido del 74,5%, el tamaño de muestra es estadísticamente significativo (Saa, 2011).

De la misma manera, se empleó el programa informático para hallar el número de animales que era preciso muestrear en cada explotación para poder saber, con un nivel de confianza del 95%, si ésta se encontraba o no infectada. Basándonos en datos de estudios previos, usamos una prevalencia intrarrebaño del 35%, obteniendo un tamaño de muestra necesario por explotación de ocho animales, independientemente del tamaño de la misma (empleamos población infinita en la fórmula). Sólo se tomaron un menor número de muestras en aquellos casos en que en la explotación había menos de ocho individuos mayores de seis meses, tomándose muestras en estos casos de todos los animales de la explotación. Dado que la menor prevalencia intrarrebaño obtenida en nuestro estudio es de un 38,81%, el muestreo resulta estadísticamente significativo también desde este punto de vista (Saa, 2011).

El muestreo persigue un doble propósito; por un lado, obtener muestras de sangre de los bovinos para determinar la prevalencia y dispersión del virus ya descrito, y por otro, realizar una encuesta epidemiológica que nos permita determinar las variables asociadas con el estado de seropositividad.

Además con las encuestas epidemiológicas se podrían obtener datos adicionales de las distintas formas de crianza de los bovinos en Ecuador y de sus sistemas de explotación, de gran valor para futuras investigaciones y sobre todo en el desarrollo y aplicación de futuras medidas zoosanitarias correctoras (Saa, 2011).

3 Diseño del cuestionario epidemiológico y obtención de los datos.

3.1 Encuesta epidemiológica

El diseño del cuestionario se realizó siguiendo las recomendaciones de Toma y cols. (1996), quienes señalan que para la realización de una encuesta epidemiológica deben estar previamente definidos algunos parámetros. Considerando tales criterios para el diseño de la encuesta epidemiológica y de acuerdo con la bibliografía consultada, se incluyeron variables

de carácter exclusivamente descriptivo, así como todas aquellas que pudieran estar relacionadas con la presencia o ausencia de la infección por el virus de la DVB, tanto las relativas a las prevalencias como a la dispersión.

Así mismo, se empleó otro cuestionario para la información de los datos individuales, como la edad, el sexo o la raza del animal, que a continuación se exponen. Los cuestionarios se complementaron con los datos obtenidos a través del propietario y de la persona o personas encargadas del cuidado de los animales, evaluándose asimismo su estado clínico.

ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA

CARACTERÍSTICA UPAS

1. ID. (Número de Encuesta) _____2. Propietario:_____
3. Teléfono: _____4. Fecha de Visita: _____
5. Localidad: _____ 6. Cantón: _____
7 Provincia_____8. Coor.UTM: N S
9. Antigüedad de la explotación (años) _____
10. Aptitud: Lechera_____Doble propósito_____
11. Raza: 1 Criollo 2 Mestizo 3 Pura Sangre
12. Tamaño útil de la finca (Ha.) _____13.Tamaño total de la finca (Ha.)__
14. Número de animales _____ 15.Número. de terneros_____
16. No. de hembras en producción_____
17. Edad del desvieje (años)_____18. Pendientes (%) _____

INSTALACIONES

19. Instalaciones ganaderas_____
20. Ventilación 1 2 3
21. Limpieza 1 2 3
22. Sala de ordeño SI NO
23. Manga de Manejo SI NO
24. Establos SI NO
25. Tipo de Cama: _____
26. Cercas SI NO
27. División de Potreros SI NO

VARIABLES RELACIONADAS CON CONTAGIO/INTRODUCCIÓN

28. Distancia a granja más cercana (con vacas) (m)
29. Explotación bovina colindante (m)
30. Densidad explotaciones ganadera (%)
31. Asistencia a ferias ganaderas SI NO
32. Regreso de los animales a la granja tras la feria SI NO
33. Visitas a la granja: 1 Técnicos IA 2 Veterinarios 3 Otros_____
34. Se mezclan rebaños distintos (entre granjas) en los potreros. SI NO
35. Presencia de ovejas y/o cabras en los potreros SI NO
36. Presencia de rumiantes salvajes en los potreros SI NO

.../..

ALIMENTACIÓN

37. Origen de los animales: Compra _____ Nacidos en Granja _____

38. Toma de calostro SI NO 39. Edad destete (m) _____

40. Leche ó sustituto _____ 41.Uso de leches mamitis SI NO

42. Número de tomas _____43. Origen del agua: 1 pozo/ 2 quebrada/ 3 potable

44. Empleo de balanceado SI NO 45. Origen del pienso_____

46. Pastoreo SI NO 47. Suplementación de alimentación _____

48. Otros alimentos_____

REPRODUCCIÓN

49. Tipo de reproducción 1 Monta dirigida 2 IA 3 Monta Libre

50. Sincronización de partos SI NO

SANIDAD

51. Vacuna IBR Madres SI NO Vacuna DVB Madres SI NO Vacuna Brucelosis SI NO

52. Vacuna Triple SI NO 53. Vacunación de terneros SI NO 54. ¿De qué? _____

55. Revacunación SI NO

56. Desinfección cordón umbilical SI NO

57. Desparasitación adultos SI NO 58. Desparasitación de terneros SI NO

59. Mortalidad media terneros anual _____60. Mortalidad media adultos anual_____

61. Brote SRB (Semanas)_____62. Aislamiento de enfermos SI NO

65. % de diarreas (actual)_____64. % de abortos (actual) _____

65. Observaciones _____

Figura 3: Cuestionario epidemiológico para la recogida de datos por explotación.

Fuente: (Saa, 2011)

Elaboración: Raúl Ramos

Explotación		Fecha de muestreo		Provincia	Cantón/Localidad
Número de Muestra (Código)	Ternero	Raza	Sexo	Sistema de Explotación	Observaciones

Figura 4: Cuestionario para las variables recogidas de forma individual

Fuente: (Saa, 2011)

Elaboración: Raúl Ramos

Tabla 1: Explotaciones y muestras analizadas por cantones y provincias.

Provincia	Cantones	Explotaciones	Muestras
Azuay	Sig-Sig	7	35
	Cuenca	46	334
	Girón	5	33
	TOTAL	**58**	**402**
Chimborazo	Riobamba	3	20
	Chambo	6	46
	Penipe	6	36
	Guamote	4	25
	Pallatanga	4	27
	Chunchi	21	67
	TOTAL	**44**	**221**
Tungurahua	Ambato	17	98
	Píllaro	4	24
	Salcedo	3	19
	Quero	6	31
	Pelileo	3	18
	TOTAL	**33**	**190**
Cotopaxi	Sigchos	4	32
	Latacunga	22	176
	La Maná	9	51
	TOTAL	**38**	**259**

…/..

Tabla 1 (continuación)

Provincia	Cantones	Explotaciones	Muestras
Pichincha	Quito	31	227
	Mejía	7	44
	Cayambe	11	82
	San Miguel de los Bancos	2	13
	Pedro Moncayo	3	16
	TOTAL	**54**	**382**
Santo Domingo de los Tsachilas	Sto. Domingo	35	261
	TOTAL	**35**	**261**
Manabí	El Carmen	39	305
	Flavio Alfaro	1	8
	Jama	24	186
	Junín	1	8
	Pedernales	15	117
	Sucre	2	16
	Chone	21	155
	Bolivar	3	19
	TOTAL	**106**	**814**
TOTAL		**368**	**2529**

Fuente: (Saa, 2011)

Elaboración: Raúl Ramos

En la tabla 1 se expone el número de explotaciones y muestras obtenidas, por provincias y cantones. En total el muestreo fue realizado en 368 explotaciones, recogiéndose un total de 2529 muestras de sangre para los análisis serológicos.

4 Descripción de las variables

En este apartado se realizo la descripción de las variables incluidas en el cuestionario epidemiológico.

4.1 Variables de localización

Provincia.

Esta variable nos indica las provincias donde se tomó las muestras para el estudio: Azuay, Chimborazo, Tungurahua, Cotopaxi, Pichincha, Sto. Domingo de los Tsáchilas y Manabí.

Las siete provincias en las que se asienta el estudio son muy diferentes en cuanto a condiciones climáticas y orográficas (INEC-MAG-SICA, 2001).

Las muestras fueron recolectadas de diversos lugares y microclimas los mismos que van en una rango desde los cero metros hasta los 5600 (m s.n.m.). En la Provincia de Manabí encontramos las menores altitudes y en la Provincia de Chimborazo el lugar con la mayor altitud (5600 m s.n.m.) (INEC-MAG-SICA, 2001).

Cantón.

Los cantones, son cada una de las divisiones territoriales de las provincias, los mismos que a su vez están divididos por parroquias y en ellas se encuentran los sitios o comunidades (INEC-MAG-SICA, 2001).

4.2 Variables relacionadas con las características de las explotaciones.

En este apartado se incluye las variables que describen las diferentes características de las explotaciones muestreadas:

Antigüedad de la finca.

Esta variable se refiere a la antigüedad de las explotaciones (en años), es un factor importante conocer el tiempo que lleva la explotación ganadera por el tema de prevalencia de diferentes enfermedades, excepto aquellas en las que no tienen terreno propio y realizan un pastoreo en terrenos arrendados a otras fincas donde no tienen bovinos; inclusive se puede observar que algunos propietarios llevan sus animales pastando por las orillas de las carreteras (Jian-Gang, 2016).

Aptitud de la granja.

La aptitud de la granja toma en cuenta si está dedicada a la producción de leche ó si es de doble aptitud, es decir cuando producen leche y los terneros son destinados a la venta para la producción de carne sin considerar su sexo o inclusive realizan el engorde en la misma finca en terrenos irregulares y no aptos para la lechería (Daves, 2016).

Raza.

Para la raza de los bovinos tomamos los siguientes epígrafes: bovino criollo, aquellos que son propios de la zona y no tienen características definidas de una raza determinada; bovinos mestizos los que son resultado de cruces principalmente entre animales de raza y los bovinos pura sangre aquellos que son de las razas Holstein Friesan, Jersey, y Pardo Suiza (Saa, 2011).

Tamaño total de la finca.

A excepción de aquellos productores que no tienen un terreno fijo, las explotaciones fueron medidas en hectáreas totales, incluyendo zonas de topografía irregular y bosques protegidos

Tamaño útil de la finca.

El terreno útil de la explotación, solamente es aquel que es apto para la producción agropecuaria.

Número de animales.

En este apartado se indica el número total de animales presentes en la explotación.

Número de terneros.

En este ítem se contaron solamente los terneros que se encontraban en periodo de lactación que alcanza incluso los seis meses.

Número de hembras en producción.

En todas las explotaciones se tomó en cuenta solamente el número total de hembras en producción láctea.

Edad.

En todas las explotaciones se consideró la edad en meses del desvieje de los individuos.

Pendientes.

Tomando en cuenta la topografía de Ecuador se midió el porcentaje de pendientes (media por finca) mediante un clinómetro conociendo que 0% es un terreno plano muy apto para la lechería y un 90% un terreno perpendicular en donde solamente se mantiene vegetación endémica (INEC-MAG-SICA, 2001).

4.3 Variables relacionadas con las instalaciones

Las instalaciones son analizadas según los siguientes datos observados y tomados personalmente.

Las variables relacionadas tienen que ver con la presencia o ausencia de instalaciones ganaderas las mismas que fueron analizadas mediante la observación directa.

Ventilación.

La ventilación fue buena cuando existía contacto directo con el exterior ó grandes corrientes de aire, regular si es que no había acceso de corrientes de aire y mala si el espacio era cerrado y acumulaba contaminación (amoniaco); se debe indicar que en las fincas o

explotaciones que no tienen instalaciones se consideró la ventilación como buena al estar los animales al aire libre, aunque esto puede causar predisposición a enfermedades por los repentinos cambios climatológicos y no tener refugio.

Limpieza.

La limpieza mediante los siguientes parámetros: buena, regular y mala (1, 2, y 3), siendo buena cuando las instalaciones se encontraban limpias y desinfectadas; regular cuando solamente se limpiaban con agua quedando restos y mala cuando no se limpiaba.

Sala de ordeño.

Esta variable, indica la presencia o ausencia de sala de ordeño, y la maquinaria de ordeño (existen máquinas de ordeño portátiles por ello ordeñan en los potreros remolcando con tractor las ordeñadoras).

Establos.

En este epígrafe se determina la existencia de establos en donde descansan los animales tras el pastoreo. No se toma en cuenta el material de fabricación de este tipo de infraestructura, conociendo que en varias explotaciones solamente tenían corrales donde los animales descansaban en la noche.

Manga de manejo.

Esta variable hace referencia a la existencia o no de una manga de manejo que posibilite la realización de tratamientos y actividades de manejo de los individuos.

Tipo de cama.

La variable se refiere al material con el que recubren la superficie donde los animales descansan (potrero, tierra, cemento ó viruta); en los lugares donde no poseían instalaciones se consideró como tipo de cama el potrero porque es ahí el lugar donde descansan, comen y ordeñan los animales, llegando únicamente a los corrales cuando se realizan prácticas de vacunación, desparasitación o cualquier otro tipo de práctica sanitaria o zootécnica.

Cercas.

Mediante la observación directa se comprobó la existencia de cercado o vallado entre explotaciones.

División de potreros.

Al igual que la variable anterior se determinó si existe división interna de potreros.

Presencia de vados.

En este epígrafe se observó la existencia o no de vados, es decir sistemas de desinfección a la entrada de las explotaciones.

4.4 Variables relacionadas con las posibilidades de contagio.

En este ítem se agrupan aquellas variables que indican un contacto entre otros individuos de su misma especie, o bien aquellas que condicionan las posibilidades de dicho contacto incluyendo el origen de los bovinos, así como el contacto que pueden tener con otras especies animales posibles reservorios de los virus en estudio. Las variables a las que nos referimos son:

Distancia a granja más cercana.

Esta variable hace referencia a la distancia en metros de la granja de producción ganadera más cercana a la explotación muestreada.

Densidad de explotaciones ganaderas.

Para este punto consideramos una media, expresada en porcentaje, para determinar la densidad de explotaciones con bovinos en los conglomerados; es decir si el uso del suelo en un conglomerado es solamente para producción bovina, le asignamos un 100%; si por el contrario existen además granjas de producción agrícola se asignará una media dependiendo del número de ellas que existan en el conglomerado.

Última asistencia a ferias ganaderas.

La asistencia a ferias ganaderas de exposición y venta de animales es determinante en nuestro estudio ya que pueden condicionar el contacto de los bovinos con otros animales.

Retorno de animales de ferias ganaderas.

Si los animales regresan a la granja luego de la asistencia a la feria ganadera es un factor determínate ya que existe una gran posibilidad de un posible contagio de la enfermedad.

Visita a la explotación.

El epígrafe se refiere a las personas que dan asistencia técnica a los propietarios o realizan tratamientos a los animales, para lo cual se incluyó a técnicos, veterinarios, trabajadores agrícolas adyacentes.

Mezcla de rebaños.

En el caso de que no existiese cercado entre granjas puede que los animales estén en un sistema denominado al sogueo (atados por medio de cuerdas a una estaca) ó sueltos; se mezclen con los animales de diferentes fincas, pero también puede suceder que en aquellas fincas que tienen cercas puedan acceder animales de otras granjas a través de espacios ó cercas rotas por un inadecuado mantenimiento de las mismas.

En aquellos terrenos comunales o fincas que no tienen cercas, es más fácil que los animales se mezclen entre sí llegando inclusive a que la reproducción no tenga un control por parte de los administradores.

Presencia de ovejas.

En Ecuador es muy común que existan en la misma granja una variedad de animales que se crían conjuntamente con los bovinos.

Presencia de rumiantes salvajes.

Ecuador es un país con una biodiversidad, especialmente en mamíferos salvajes, siendo importante indicar la presencia o ausencia de rumiantes salvajes (*Mazama sp. Pudú sp*, etc., son conocidos como “venados”) en los pastizales.

Origen de los animales.

Para este epígrafe se determinó si el origen de los animales de reposición fue por medio de compra ó se utilizan los nacidos en la granja; de igual manera se consideró que algunos productores combinan las dos opciones, es decir ingresan animales comprados en otras explotaciones y se quedan con los animales que nacen la misma granja (Saa, 2011).

4.5 Variables relacionadas con la alimentación.

Bajo este ítem se incluyen todas aquellas variables relacionadas con la alimentación de los animales.

Ingesta de calostro.

La variable hace referencia a la vigilancia por parte de los cuidadores en la toma de calostro por parte de los terneros.

Edad al destete.

En Ecuador no está bien establecida la edad en meses que se realiza el destete, ya que la mayoría de los propietarios ordeñan manualmente manteniendo el ternero junto a la madre. Asimismo, las vacas pueden permanecer constantemente junto a los terneros, o ser introducidas dos veces al día para que mamen los terneros. En este sistema, los animales suelen alimentarse exclusivamente de leche, si bien puede complementarse su alimentación con pienso, grano o heno (Saa, 2011).

Alimentación del ternero.

En las explotaciones intensivas de producción láctea, los terneros suelen criarse con sustituto; sin embargo en Ecuador también se utiliza la leche cruda, para ello suelen dar directamente al ternero en un bote o dejan un cuarto de la ubre sin ordeñar para que se alimente el ternero mientras dure el periodo de lactación.

Uso de leche con mastitis.

La alimentación de los terneros con leches procedentes de vacas con mastitis resulta una práctica frecuente en las explotaciones estudiadas. Esta leche no puede destinarse al consumo, debido a que es rechazada por la industria por su alto contenido en bacterias, o por los residuos de tratamientos en los casos en que se hayan realizado.

Número de tomas de leche al día.

Lo habitual es que el ternero realice la toma directamente de un cuarto de la mama dejado por los propietarios a las crías después del ordeño (*ad libitum*) por lo general se realizan 2 ordeños al día.

Fuente de agua.

Sobre el origen del agua de bebida se consideró si la fuente fue de pozo, quebrada o riachuelo y agua potable. La disposición de agua por lo general es *ad libitum* ya que en la mayoría de conglomerados existen grandes cantidades de ríos y riachuelos.

Balanceado.

En esta variable se considera si los propietarios utilizan mezclas físicas para administrar a los bovinos como sobre alimentación.

Origen del balanceado.

En esta variable se determina la procedencia es decir, si este proviene de fábrica o de elaboración propia en la granja.

Pastoreo.

Esta variable se refiere a que si los animales pastan en los potreros o no lo hacen, lo que está determinado por el sistema de explotación.

Suplementación alimenticia.

En este apartado analizamos la incorporación esporádica de determinados alimentos con fines de completar el pastoreo. Entre estos alimentos se incluye: caña de azúcar picada, melaza y/o panela (jugo de caña deshidratado/azúcar morena en bloque); banano verde, subproductos (palmiste o subproducto de palmito y pasta de algodón; residuos de cosechas como brócoli, zanahoria y remolacha.

Otros alimentos.

En este epígrafe tomamos en cuenta la administración o suplementación con maíz, heno, henilaje y forrajes.

4.6 Variables relacionadas con la reproducción.

En este epígrafe se incluye los siguientes datos:

Tipo de reproducción.

En las explotaciones pueden utilizarse: monta dirigida, inseminación artificial (I.A.) ó monta libre.

Sincronización de partos.

Esta variable toma en cuenta si los propietarios utilizan algún método para la sincronización de celos en los reproductores.

4.7 Variables relacionadas a la puesta en práctica de medidas sanitarias.

Vacunación de madres.

Los animales muestreados pudieron ser vacunados frente a diversos agentes, datos de una importancia fundamental que quedaron recogidos en las siguientes variables:

- ***Vacunación tetravalente (madres).***
- ***Vacuna triple Madres (vacunadas frente a enfermedades clostridiales*** *Clostridium septicum, Clostridium chauvoei, Clostridium perfringens***).**

Resulta imprescindible conocer e identificar las vacunaciones realizadas frente a los agentes del SRB. Las fincas que sí vacunaron contra los principales virus productores del SRB lo realizan con vacunas tetravalentes, que incluyen VDVB, HVB1, VRSB.

Vacunación de terneros.

Los terneros pudieron ser vacunados frente a distintos agentes. El grupo de variables que se exponen a continuación se refieren a la vacunación de los terneros durante la fase de lactancia.

- ***Vacunación de los terneros.***
- ***Terneros vacunados frente a enfermedades clostridiales.***

Otro factor que debemos considerar es la manera de eliminación de los restos de las vacunas, ya que la mayoría no lo hacen correctamente, es decir las desechan en los potreros o en los lugares que realizaron la vacunación y/o desparasitación.

Revacunación.

La variable incluida en este grupo se refiere a la realización de las correspondientes revacunaciones, independientemente del agente.

Desinfección del cordón umbilical.

La desinfección del cordón umbilical se realiza para evitar la entrada de microorganismos por esta vía mientras el cordón cicatriza, por ello la importancia de este epígrafe en la encuesta epidemiológica.

Desparasitación de los animales adultos.

Esta variable se refiere a la utilización de antiparasitarios tanto aplicados por vía externa como interna (oralmente).

La desparasitación externa está orientada a la prevención, o infestación por “tupe”, “nuche” y/o garrapatas (*Dermatobia hominis, Rhipicephalus (Boophilus) microplus, Amblyoma sp*). con una periodicidad de un mes, utilizando avamectinas y cipermetrinas (Jian-Gang, 2016).

Desparasitación de terneros.

La desparasitación de los terneros es una práctica habitual desde edades muy tempranas, ya que los terneros pasan a los pastos, donde las posibilidades de infestación resultan muy elevadas.

Mortalidad de terneros.

Esta variable se refiere a la mortalidad total analizada en (%) presentada en la fase de lactancia, y no a la mortalidad específica ocasionada por la DVB.

Mortalidad de adultos.

Hace referencia a la mortalidad total (%) de individuos adultos a lo largo del año.

Brote de DVB.

Esta variable hace referencia a la observación de signos clínicos compatibles con DVB en el momento de la encuesta.

Separación de enfermos.

Analizamos la separación a otras zonas o infraestructura de los animales enfermos para evitar el contagio al resto de individuos del grupo, resultando una de las principales medidas de lucha sanitaria para controlar las infecciones y la presentación de nuevos casos clínicos.

Presencia de diarreas.

Esta variable nos indicará el porcentaje anual de diarreas que se presenta en los animales, pero se debe indicar que se toma en cuenta todos los casos de diarreas pero sin identificar su origen (diarreas inespecíficas), las cuales puede estar o no asociadas al VDVB o a cualquier otro agente etiológico como parásitos o protozoos que también son comunes en Ecuador.

Presencia de abortos.

El porcentaje anual de abortos también hace referencia a los casos inespecíficos que pueden o no estar relacionados con el VDVB puesto que también lo pueden provocar otros agentes como por ejemplo brucelosis; esto se determinará mediante los respectivos análisis estadísticos en el capítulo de resultados.

4.8 Variables relacionadas con los animales

Las variables incluidas en este apartado han sido: ***raza*** (criollo, mestizo, pura sangre), ***sexo*** (macho ó hembra) y ***edad*** (medida en meses):

La raza predominante en las explotaciones de Ecuador se denomina “raza criolla”, una variedad local cruce de razas europeas y asiáticas. Así mismo, existen otras razas que se emplean en producción láctea para mejorar la rusticidad, el rendimiento cárnico o las características de la leche, como las razas Holstein,y/o Jersey, y en el caso de la producción cárnica las razas de origen cebuino (Brahman, Nelore, Gir, etc.).

La reducida proporción de las distintas razas nos inclinó a realizar sólo tres categorías, según la raza de los animales: Criolla, mestiza, y pura sangre.

4.9 Variables relacionadas con el sistema de producción.

Las explotaciones extensivas son aquellas en que los animales pastan libremente en los potreros, y solamente las hembras reproductoras regresan a los establos para ser ordeñadas, y luego retornar a los potreros donde descansarán por la noche. En este sistema se utiliza dos tipos de ordeño: el mecánico y el manual, el primero puede ser estacionario ó portátil (INEC-MAG-SICA, 2001).

Las explotaciones intensivas son aquellas en las que los animales están confinados en establos y/ó corrales en donde son alimentadas, únicamente salen a los potreros cuando es necesario que realicen ejercicio (INEC-MAG-SICA, 2001).

Los sistemas semiintensivos o semiextensivos son aquellos que combinan los sistemas de producción intensivo y extensivo, es decir, los animales suelen permanecer en la mañana en los potreros pastando libremente y en la tarde regresan para ser ordeñados además de permanecer en los establos hasta el siguiente día en que serán ordeñados y llevados a los respectivos potreros (INEC-MAG-SICA, 2001).

5 Obtención y procesado de las muestras de sangre.

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción en la base de la cola, empleando tubos vacutainer de 10 ml con sus respectivas agujas. Tras la coagulación, se procedió a separar el suero. A continuación, el suero fue trasvasado en tubos de reacción marca Eppendorf, que fueron identificados en una plantilla mediante una clave numérica, y posteriormente se congelaron a -25 ºC hasta el momento de su procesado.

6 Análisis serológicos.

En todos los casos se emplearon pruebas inmunoenzimáticas comerciales ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para la determinación de anticuerpos.

6.1 Virus de la Diarrea Vírica Bovina (VDVB).

Para la determinación de la seropositividad frente a este agente se empleó un kit comercial de la empresa Ingenasa S.A. denominado Ingezim BVD Compac® (Prod Ref: 12.BVD.K3), se trata de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) de competición para la detección de anticuerpos específicos frente al virus de la Diarrea Viral Bovina en muestras de suero (Daves, 2016).

La prueba se realiza sobre un soporte sólido de poliestireno. Sobre cada pocillo se dispensan los sueros a evaluar de modo que, en el caso de que contengan anticuerpos

específicos frente al VDVB, se unen al antígeno de la placa “ocupando” los determinantes antigénicos específicos. En el caso de que en el suero los anticuerpos específicos no se hallen presentes, los determinantes antigénicos permanecen “libres” (Cornish, 2015).

A continuación, se añade en cada uno de los pocillos un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa específico para la proteína p80/p125 del virus, que ocuparán aquellos determinantes antigénicos que hayan permanecido libres tras la adición del suero (Cornish, 2015).

Después de eliminar mediante lavados los restos de material no adherido y tras añadir en cada pocillo el sustrato adecuado para la peroxidasa, se observará la aparición de una reacción coloreada allí donde los conjugados hayan encontrado determinante antigénico específicos sin ocupar por los anticuerpos del suero problema. En consecuencia, se observará una reacción coloreada en aquellos sueros que no contengan anticuerpos, mientras que en aquellos positivos frente al VDVB no se observará tal reacción (Cornish, 2015).

A continuación se detalla paso a paso el procedimiento de la técnica (Entrican, Dand, & Netleton, 2013).

1º. Previamente al inicio del ensayo, los reactivos se equilibran a temperatura ambiente (excepto el conjugado que debe mantenerse a 4 ^{o}C).

2º. Adición del suero problema: se dispensan 100 μl de las diluciones 1/10 de los sueros y de los controles en cada uno de los pocillos.

3º. Primera incubación: se tapa la placa y se incuba durante una hora a 37 ºC.

4º. Adición del conjugado: sin retirar los sueros, se añaden 50 μl de conjugado en cada pocillo. La placa se agita suavemente para que se mezclen bien los reactivos, evitando que se mezcle el contenido de los pocillos.

5º. Segunda incubación: se mantiene la placa durante una hora a temperatura ambiente.

6º. Lavados: cinco veces consecutivas, añadiendo 300 μl con el lavador automático.

7º. Adición del sustrato (TMB): se añaden 100 μl de sustrato en cada pocillo.

8º. Tercera incubación: la reacción se mantiene durante un período de 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

9º. Adición de la solución de frenado (ácido sulfúrico 3 N): este paso se realizó inmediatamente después del anterior y en el mismo orden, con objeto de frenar la reacción lo más simultáneamente posible.

10º. Lectura de la placa: a 450 nm.

En caso de reacción, se observa una coloración azul que se torna amarilla al adicionarse la solución de frenado. Se aprecia una reacción mayor (y, por tanto, mayor intensidad en la coloración), en aquellos casos en que las muestras de suero no contengan anticuerpos, según se describió en el fundamento de la técnica.

El test quedó validado, siguiendo las instrucciones del kit, debido a que la absorbancia del control positivo fue menor de 0,4 y la del control negativo fue superior a 0,8.

Para la interpretación de las absorbancias se emplearon los valores de absorbancia del control negativo, considerándose negativas aquellas muestras con un valor superior de absorbancia al 0,55 por la absorbancia del control negativo (0,55 $\times$ Abs control negativo: punto de corte negativo), y positivas aquellas muestras con absorbancia menor de 0,5 por la absorbancia del control negativo (0,5 $\times$ Abs control negativo: punto de corte positivo) (Saa, 2011).

Según los fabricantes del kit (INGENASA) los parámetros de validez interna de esta técnica son un 95,17 % de sensibilidad y un 92,31% de especificidad.

7 Métodos y análisis estadísticos.

Los datos epidemiológicos, tanto colectivos como individuales, obtenidos mediante las encuestas se introdujeron directamente en el programa estadístico SPSS® 15.0. Así mismo, los resultados de los análisis serológicos se incluyeron junto con las variables procedentes de la encuesta. De este modo se crearon dos bases de datos: una por individuos y otra por explotaciones, en la que se consideraron positivos aquellos colectivos en que al menos un animal es seropositivo.

7.1 Eliminación de variables.

Las variables incluidas con fines de identificar la explotación, tales como el nombre y dirección del propietario, la localidad o el cantón al que pertenece la explotación fueron eliminadas, así como aquellas variables dicotómicas en que una de las posibilidades superaba en frecuencia el 95 por ciento, ya que frecuencias excesivamente altas o bajas originan incorrecciones de tipo estadístico (kleinbaum & Klein, 2010). En este sentido fueron

eliminadas las variables *pastoreo*, ya que en todas las explotaciones los animales pastoreaban; sistema de explotación, ya que todas eran de tipo extensivo; y existencia de vado sanitario, ya que casi ninguna explotación lo poseía.

7.2 Clasificación y codificación.

Las variables se clasifican en numéricas si indican cantidad, y nominales si existen distintas categorías. A su vez, las variables nominales se subdividen en dicotómicas, cuando sólo existen dos respuestas posibles (tipo sí ó no), ordinales, cuando entre las categorías se puede establecer un orden, y nominales de más de dos categorías si no son dicotómicas ni existe un orden entre sus categorías (kleinbaum & Klein, 2010). Las variables nominales fueron codificadas en forma numérica con objeto de facilitar su tratamiento estadístico con el programa SPSS 15.0 mediante la asignación de un número a cada una de las categorías (primera categoría, 1, segunda, 2 y así sucesivamente). Por otra parte, a las variables dicotómicas se les asignó el valor 1 si la respuesta era afirmativa y 2 en caso contrario (Thrusfield, 2007).

7.3 Análisis estadísticos.

7.3.1 Análisis descriptivo o univariante.

En el caso de las variables nominales ó categóricas, se determinó la distribución de frecuencias de cada categoría; en las variables de diagnóstico serológico, mediante la distribución de frecuencias, se determina directamente la prevalencia de cada infección ó la dispersión en el caso de que la prevalencia se haya calculado por explotaciones (Thrusfield, 2007).

Para las variables numéricas se calcularon los principales estadísticos de tendencia central (media, mediana y moda) y de dispersión (varianza y desviación típica). A continuación se categorizaron las variables numéricas según la media, obteniéndose así, dos categorías dentro de cada variable (Thrusfield, 2007).

Para finalizar el análisis descriptivo de este tipo de variables, se determinó la distribución de frecuencias de cada una de las categorías (Thrusfield, 2007).

7.3.2 Análisis bivariante.

En primer lugar se exponen, para todas las variables, las tablas de contingencia entre cada una de las variables y el diagnóstico serológico del agente vírico. Sin embargo, como en el apartado anterior, los análisis difieren según el tipo de variable. Por están razón se

calcularon las variables nominales dicotómicas, con objeto de determinar si existía asociación, la Phi y su valor de p asociado, la Odds Ratio y sus límites de confianza (Thrusfield, 2007).

En el caso de las variables ordinales se determinaron la V de Cramer y su valor de p asociado, estadístico que revela la fuerza de la asociación entre dos variables y establece si alguna de las categorías difiere del resto (Thrusfield, 2007).

De igual manera en las variables nominales de más de dos categorías se determinó la V de Cramer y su *p* asociada. Aquellas variables que no mostraron significación estadística, con un nivel de confianza de un 95%, fueron suprimidas para el análisis multivariante.

7.3.3 Análisis multivariante.

El tipo de análisis adecuado para conocer las variables que determinan la seropositividad frente a cada agente consiste en una regresión logística binomial. El objetivo de la regresión logística es hallar el modelo más sencillo que mejor describa la relación existente entre un efecto (variable dependiente, en nuestro caso el diagnóstico serológico) y una serie de variables independientes (predictivas o explicativas) también llamadas covariables (kleinbaum & Klein, 2010).

Cuando el objetivo es obtener un modelo predictivo, se trata de encontrar el grupo de variables que predice mejor el efecto de interés en nuestro estudio. En el proceso de construcción del modelo, todas las variables tienen, “a priori”, el mismo peso, y el objetivo es obtener el modelo más sencillo que nos proporcione la mejor estimación de la probabilidad de que un animal resulte seropositivo frente al agente estudiado en nuestra zona (Leen, 2010).

El análisis multivariante proporciona modelos predictores del comportamiento de la variable dependiente según una serie de variables independientes asociadas significativamente con ella (kleinbaum & Klein, 2010).

Para el análisis multivariante, realizado mediante regresión logística binomial, se siguió un método por pasos hacia delante (forward stepwise), empleando como criterio de selección, para incluir o eliminar las variables del modelo, la significación del estadístico de Wald: una variable ingresa al modelo si el valor de su p asociada es menor de 0,01 y se elimina si este valor, una vez dentro, se incrementa por encima de 0,05 (kleinbaum & Klein, 2010). Factores que muestran un valor de p de <0,05 se examinaron más a fondo para las asociaciones utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (r) para evitar la colinealidad.

El modelo se inicia a partir de la variable que posea la mayor significación en el estadístico de Wald, e incluirá una nueva variable si ésta mejora la capacidad predictiva del modelo anterior. Esta operación se repite, mejorando el modelo en cada paso, interrumpiéndose la incorporación de nuevas variables en el momento en que la adición de una nueva no mejore la capacidad predictiva del modelo (Thrusfield, 2007).

Para este tipo de análisis sólo se han empleado aquellas variables asociadas de un modo significativo con la seropositividad del agente estudiado. Por lo tanto, se realizaron dos modelos ó análisis multivariantes, del virus estudiado, siendo la variable dependiente el resultado del análisis serológico y el resto de variables independientes.

Estimamos que el análisis adecuado para establecer las variables que determinan la seropositividad del agente vírico, consiste en una regresión logística binomial. El objetivo de la regresión logística es hallar el modelo más sencillo y que mejor describa la relación existente entre un efecto (variable dependiente, en nuestro caso el diagnóstico serológico), y una serie de variables independientes (predictivas o explicativas) también llamadas covariables. Cuando el objetivo es obtener un modelo predictivo, se trata de encontrar, a partir de un conjunto amplio de variables, el grupo de ellas que predice mejor el efecto de interés en nuestro estudio; serán, pues, las variables que se “ajusten” mejor a este efecto. En el proceso de construcción del modelo, todas las variables tienen, “a priori”, el mismo peso, y el objetivo es obtener el modelo más sencillo que nos proporcione la mejor estimación de la probabilidad de que un animal resulte seropositivo frente al agente en nuestra zona de estudio (Thrusfield, 2007).

Para la realización de la regresión logística han de seguirse una serie de pasos previos. Antes de proceder al análisis destinado a resolver nuestras hipótesis de estudio, debemos realizar un análisis descriptivo (univariante), seguidamente llevar a cabo una selección metódica de aquellas variables significativas en el análisis bivariante para, finalmente, construir el modelo multivariante (kleinbaum & Klein, 2010).

La fórmula de la regresión lineal simple viene dada por: $Y= a+bx$

Donde **Y** es el valor de la variable dependiente, **x** es el valor de la variable independiente, y **a** y **b** son dos constantes (la ordenada en el origen y la pendiente de la recta). Esta fórmula nos permite conocer los valores de **Y** conociendo los de **x**.

En la regresión logística el origen de la fórmula es el mismo, sin embargo, se han introducido logaritmos y en lugar de una sola variable **x**, existen varias. La fórmula en sí es:

$$p(Y) = 1 / (1+e^{-(b0+b1*X1+b2*X2+\ldots bn*Xn)})$$

En esta fórmula, p(Y) es la probabilidad de que ocurra Y, que en nuestro estudio sería la probabilidad de que un individuo fuese seropositivo, y vendría determinado por cada una de las variables independientes que se incluyan en el modelo (X_1, X_2... X_n) y por una serie de constantes asociadas a las variables independientes que vienen dadas por el modelo de regresión logística. Cada categoría de una variable incluida en el modelo posee una **b** distinta, que es igual al logaritmo neperiano de su Odds Ratio (b= lnOR).

En el presente estudio se decidió emplear para la construcción del modelo un método de selección de las variables paso a paso (stepwise selection) hacia delante, tomando como parámetro de selección el estadístico de Wald (Hosmer y Lemeshow, 1989). El modelo nos proporciona, además de la identificación de las variables definitivas asociadas al estado de seropositividad, la fuerza con que cada variable se relaciona realmente a la variable dependiente, eliminando el efecto de las variables contundentes. Por otra parte, el modelo señala el grado en que puede predecir tanto los individuos seropositivos como los seronegativos para el agente implicados en el VDVB, permitiéndonos además desarrollar un modelo matemático que prediga la probabilidad de estar infectado de un individuo según las condiciones en que se encuentre mediante la sustitución de los valores en la fórmula matemática señalada con anterioridad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado de este trabajo se obtuvo un artículo académico titulado **"Seroprevalencia y factores de riesgo asociados al virus de la diarrea vírica bovina (VDVB) en bovinos de leche y doble propósito en Ecuador"** Este artículo científico fue publicado y avalado en la revista internacional Tropical Animal Health Production 2012, el cual se anexa al presente trabajo.

Trop Anim Health Prod (2012) 44:645–649
DOI 10.1007/s11250-011-9948-4

ORIGINAL RESEARCH

Seroprevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador

Luis Rodrigo Saa · Anselmo Perea · Ignacio García-Bocanegra · Antonio José Arenas · Diego Vinicio Jara · Raul Ramos · Alfonso Carbonero

Accepted: 26 July 2011 / Published online: 7 August 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract A cross-sectional study was carried out to determine the seroprevalence and risk factors associated with Bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in non-vaccinated dairy and dual-purpose cattle herds from Ecuador. A total of 2,367 serum samples from 346 herds were collected from June 2008 through February 2009. A questionnaire, which included variables related to cattle, health, management measures, and the environment, was filled out in each herd. A commercial indirect enzyme-linked immunosorbent assay test was used to determine the seropositivity. A logistic regression model was used to determine risk factors at herd level. The individual seroprevalence for BVDV in non-vaccinated herds in Ecuador was 36.2% (857/2,367; $CI_{95\%}$, 34.3–38.1%). The herd prevalence was 74% (256/346; $CI_{95\%}$, 69.4–78.6%) and the intra-herd prevalence ranged between 11.1% and 100% (mean=51.6%). The logistic regression model showed that the density of cattle farms in the area (more than 70%; OR, 1.94; $CI_{95\%}$, 1.21–3.2) and the altitude (higher than 2,338 m above sea level; 2.33; $CI_{95\%}$, 1.4–3.9) are potential risk factors associated with BVDV infection.

L. R. Saa · D. V. Jara · R. Ramos
Centro de Investigación, Transferencia de Tecnología, Extensión y Servicios Agropecuarios, Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), San Cayetano Alto s/n 1101608, Loja, Ecuador

A. Perea · I. García-Bocanegra · A. J. Arenas · A. Carbonero (✉)
Department of Animal Health, Veterinary Faculty, University of Cordoba (UCO), Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Cordoba, Spain, Edificio de Sanidad Animal, Campus de Rabanales, Cordoba 14014, Spain
e-mail: salcamaa@uco.es

Keywords Bovine viral diarrhea virus (BVDV) · Logistic regression · Dairy · Dual purpose · Risk factors · Ecuador · Seroprevalence

Introduction

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is the aetiological agent of mucosal disease and of bovine viral diarrhea. Both diseases are important from a clinical and economical point of view (Kalaycioglu 2007; Laureyns et al. 2010). Reproductive diseases are the main disorders responsible for economic losses (Grooms 2004).

BVDV causes reproductive, digestive, respiratory, and systemic disorders in cattle as well as severe malformations in calves (Al-Afaleq et al. 2007). Animals infected during the fetal stage (persistently infected) and calves infected after the fetal stage is primarily responsible for BVDV transmission and dissemination in herds (Laureyns et al. 2010; Segura-Correa et al. 2010).

Knowledge of herd management and environmental factors which increase the risk of BVDV infection would improve the ability to control and prevent the transmission, minimizing the adverse effects of BVDV infection on herd health and productivity.

Although the disease is under control or has even been eradicated in some countries in Europe (Presi et al. 2011), in developing countries (most of them situated in tropical and subtropical areas) it is a major source of economic losses due to a lack of preventive measures, such as vaccination and a poor knowledge of the true prevalence and the factors that determine it.

In previous studies, age, cow origin, exchange of visits between adjacent farm workers, and not isolating newly purchased animals before addition to the herd have all been

described as factors associated with BVDV infection (Mainar-Jaime et al. 2001; Talafha et al. 2009).

The main objective of this research was to determine the seroprevalence of BVDV in dairy and mixed dairy–beef herds in Ecuador. This is the first report about BVDV prevalence in this country. In addition, risk factors associated with BVDV seropositivity were identified.

Material and methods

Study design

A cross-sectional study in dairy and dual purpose (dairy–beef) farms was performed in the main milk-producing provinces of Ecuador (Azuay, Manabí, Santo Domingo, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, and Chimborazo) from June 2008 to February 2009. The provinces included in the study produce more than 64% of the milk in Ecuador. Herds with a vaccination program against BVDV were excluded from the study.

In order to obtain the sample size for estimating the herd level prevalence, we assumed an expected prevalence of 70% (based on unpublished data in the area). A minimum sample size of 323 farms was obtained using 70% expected prevalence, an acceptable error of 5% and a confidence level of 95%.

Due to the lack of a detailed herd and cattle identification system in Ecuador, we used the following procedure for herd selection. In the first stage, we calculated a stratified sample size per province; this stratification was according to the proportion of herds present in each province with in respect to the total number of herds included in the study. In the second stage, each province was divided in blocks of 25 km^2. Blocks were randomly selected using random numbers software. Initially, it was unknown how many blocks had to be sampled per province as the number of herds per block was unknown. In consequence, following the order given by the software, all farms of the first block were visited (cluster sampling), then the second block, etc. until the total number of herds per province was obtained. Finally, 365 herds were visited from which 19 were excluded because they participated in a vaccination program against BVDV. Therefore, the study was comprised of 346 herds.

In each selected farm, individual cattle were randomly chosen by means of random number tables. Due to the possible presence of maternal antibodies, only cattle older than 6 months were eligible for selection so as to avoid false positive test results. The sample size within each herd was based on the detection of at least one positive animal for an assumed intraherd seroprevalence of 35% (based on preliminary studies) with a minimum of eight samples per herd. On farms with a herd size of up to eight animals, all animals older than 6 months were included.

Data collection

Epidemiological data were collected through a structured fill-in questionnaire obtained by a direct interview of two of the authors with the cattle farmer. In order to avoid ambiguous or lengthy answers, "close-ended" questions were used. The authors supported the answers given by the farmers with their own observations. The variables included were grouped by topics:

1. Cattle-related data: animal age, breed (Holstein, Creole, or mixed) and sex.
2. General data for the farm: age of the farm, herd type (dairy or dual purpose), number of cattle, number of cows, number of calves, total hectares of the farm, hectares used by cattle, date of the visit, average slope, altitude, and location of the farm.
3. Management measures: cleaning of facilities (good or bad), type of reproduction (natural or artificial insemination), synchronization of births (yes/no), culling (yes/no), and age at weaning (calves).
4. Feeding: feeding mastitic milk to calves (yes/no), feeding milk or milk replacer to calves, number of milk intakes, feeding of calves with concentrates (yes/no), grazing (yes/no), mineral supplementation (yes/no), and water source (stream/well/drinking).
5. Facilities: absence of facilities (yes/no), ventilation (good/bad), livestock chute (yes/no), milking parlor (yes/no), stables (yes/no), type of bedding (ground/concrete/wood chips), and perimeter fence (yes/no).
6. Introduction of the infection: participation in cattle markets (yes/no), possibility of returning from cattle markets (yes/no), types of visits to the farm (AI technicians, veterinarians, others), calves purchased from different herds (yes/no), presence of sheep (yes/no), presence of wild ruminants (yes/no), adjacent cattle farms (yes/no), origin of the replacement cows (external, same farm, mixed), distance to the nearest farm, contact with animals from other herds (yes/no), and density of cattle farms in the area (cluster).
7. Health: respiratory illness (during sampling) (yes/no), disinfection of the umbilical cord (yes/no), deworming of adults (yes/no), deworming of calves (yes/no), quarantine (yes/no), annual mortality of calves and adults, annual abortion and diarrhea rates, BHV-1 infection (serodiagnosis; yes/no), and BRSV infection (serodiagnosis; yes/no).

Results

Serum samples from 2,367 animals belonging to 346 farms were taken. The apparent individual seroprevalence of BVDV was 39.4% (932/2,367; $CI_{95\%}$, 37.4–41.3%) while the true individual prevalence of BVDV in dairy and dual purpose cows in Ecuador was 36.2% (95% CI, 34.3–38.1%). The herd prevalence was 74% (256/346; $CI_{95\%}$, 69.4–78.6%) and the intra-herd prevalence ranged between 11.1% and 100% (mean=51.6%; median, 50%).

Eight explanatory variables were associated with BVDV seropositivity in the univariable analysis ($p<0.05$; Table 1). The final regression logistic model included two variables identified as potential risk factors: the density of stocking farms (>70%) and the altitude of the farm (more than 2,338 m above sea level). All of them were statistically significant with a p value <0.05 (Table 2).

Discussion

To our knowledge, this is the first study on BVDV carried out in Ecuador. The individual and herd prevalence suggest that BVDV infection is widespread among dairy and dual purpose cattle in Ecuador. The herd level prevalence (74%) was lower than described in other countries in South America: 83% in Chile (Melendez and Donovan 2003), 96% in Peru (Stahl et al. 2002), 97.2% in Argentina (Carbonero et al. 2011), and 100% in Uruguay (Guarino et al. 2008) but higher than the 42% reported by Obando et al. (1999) in Venezuela.

The individual prevalence (36.2%) observed in our study is in accordance with data reported by Obando et al. (1999) in Venezuela (36%), but lower than those previously found in other South American countries such as Argentina, Uruguay, and Peru (46.6%, 69%, and 95%, respectively; Stahl et al. 2002; Guarino et al. 2008; Carbonero et al. 2011). In Costa Rica, lower prevalence was reported (Raizman et al. 2011). Variability in management systems, climate, and environmental factors among countries may explain these differences.

Only variables included in the logistic regression model will be discussed. The altitude (in the same way as other quantitative variables) was codified in two categories using the median value as a cut-off: farms located higher and lower than 2,338 m above sea level. The higher altitude acts as a risk factor (OR, 2.33; $CI_{95\%}$, 1.4–3.9).

There is a strong trend of cattle in farms situated at higher altitudes sharing the same pastures for feeding (64.5% of farms higher than 2,338 m share pastures but only 42.2% of farms in lower altitudes do). These two variables are strongly correlated (R of Pearson, 0.226; $p<0.01$). The use of common pastures was reported as a risk factor for BVDV infection by Mainar-Jaime et al. (2001).

Due to its latitude, there are no seasons in Ecuador, so temperature differences are mainly due to altitude. Cusack et al. (2007) reported moderate correlation between minimum daily temperature and the occurrence of bovine respiratory disease. Choi and Song (2011) found a higher frequency of BVDV infection of during the winter in the Republic of Korea. Higher altitudes correspond to colder areas, so results in this study are consistent with previously reported results.

Density of stocking was defined as the percentage of the area occupied by livestock farms compared to the total area in the quadrant. It was codified according to the median value of farms situated in areas with stocking farm density >70% and farms situated in areas with stocking farm density ≤70%. Higher densities act as a risk factor (OR, 1.94; $CI_{95\%}$, 1.21–3.2). Farms located in high-density areas will have more and closer neighboring farms. Therefore, transmission by a direct or an indirect route will be more likely. Density of stocking farms, as well as cattle population density, has been described as a risk factor for BVDV infection in previously published studies (Stahl et al. 2008; Talafha et al. 2009).

In conclusion, the individual and herd prevalence observed indicates widespread BVDV infection in cattle herds from Ecuador. The present study constituted an explanatory study, so cause and effect factors could not be definitive. However, the knowledge of some risk factors associated with BVDV infection allows us to determine which farms are more likely to be infected and therefore need to take effective biosecurity measures to control this viral infection.

Acknowledgments This study was supported by the Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), in Ecuador. We would like to thank the farmers who participated in this study.

References

Al-Afaleq, A.I., Abu-Elzein, E.M., Al-Khalyfah, M., 2007. Severe malformations in calves associated with bovine viral diarrhoea (BVD) virus infection in a dairy cattle herd. Tropical Animal Health and Production, 39, 463–466

Carbonero, A., Maldonado, A, Perea, A, Garcia-Bocanegra, I, Borge, C, Torralbo, A., Arenas-Montes, A., Arenas-Casas, A., 2011. Risk factors against bovine respiratory disease in suckling calves from Argentina. Archivos de Zootecnia, 60, 41–51

Choi, K.S., Song, M.C., 2011. Epidemiological observations of bovine viral diarrhea virus in Korean indigenous calves. Virus Genes, 42, 64–70

Cusack, P.M.V., McMeniman, N.P., Lean, I.J., 2007. Feedlot entry characteristics and climate: their relationship with cattle growth rate, bovine respiratory disease and mortality. Australian Veterinary Journal, 85, 311–316

Grooms, D.L., 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice, 20, 5–19

Table 1 Variables associated at herd level ($p<0.05$) with BVDV infection in dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador

Variables[a]	No of farms (%)	OR	CI
Creole bred	238 (68.8)	0.5	0.3–0.9
Crossbred	100 (28.9)	1.89	1.1–3.4
Natural mating	275 (79.5)	0.35	0.2–0.7
Artificial insemination	65 (18.8)	2.94	1.3–6.4
Ground floor	145 (41.9)	0.57	0.4–0.9
Bordering cattle farms	150 (43.4)	1.65	1.1–2.7
Density of stocking farms (>70%)	170 (49.1)	1.75	1.1–2.9
Altitude of the farm (>2,338 m)	173 (50)	2.53	1.5–4.2

[a] Yes where there are no brackets

Sample collection and serological examination

Blood samples (10 ml) of each animal were collected by puncturing the tail vessel using sterile tubes without anticoagulant (Vacutainer®, Becton Dickinson). Samples were kept at 4°C and centrifuged at 400×*g* for 15 min. The serum was separated and stored at −20°C until analysis.

The presence of antibodies to BVDV was tested using a competitive commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Ingezim BVD Compac®, Ingenasa Laboratory, Madrid, Spain). The sensitivity and specificity of the diagnostic test were 95.2% and 92.3%, respectively, according to the manufacturer.

Statistical analysis

The apparent prevalence (AP) of antibodies to BVDV was estimated using the ratio of positive results to the total number of cattle examined. The true prevalence was estimated from the AP, sensitivity, and specificity of the ELISA test (Thrusfield 2007). Herds with at least one animal testing positive for serology were considered positive herds to calculate herd prevalence. Intra-herd prevalence was calculated as the mean prevalence in positive herds.

In order to homogenize the scales of the explanatory variables, all quantitative variables were transformed to qualitative variables with two categories, taking the median as the cut-off point. For variables with more than two categories, dummy variables were created. The variable "season" was created based on the date of sampling along with the categories "dry" and "rainy". Regarding location, farms were classified according to their location in Andean provinces (Azuay, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, and Chimborazo) or coastal provinces (Manabi and Santo Domingo).

Associations between independent variables (factors extracted from the questionnaire) and the BVDV serological status at herd level were tested by means of odds ratio. A farm was considered positive when at least one animal tested positive in the serological analysis. Factors showing a p value of <0.05 were further scrutinized for associations by using the Pearson correlation coefficient (r) to avoid collinearity problems. If r was larger than 0.4, the variable most clearly linked to BVDV infection was retained.

With variables selected in the univariable analysis as potential risk factors, a multiple logistic regression model was obtained according to the method described by Kleinbaum and Klein (2010).The logistic regression analysis was performed using a non-automatic forward selection of variables. The model refitted until the p values were statistically significant ($p<0.05$) or the variables were confounders (i.e., removal of the confounder results in a change of more than 25% in one or more estimates of the other variables). Next, all pairwise interactions that were biologically plausible were evaluated. The statistical analysis was performed using SPSS v15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Table 2 Variables included in the multivariate logistic regression model (95% confidence level) for BVDV infection at herd level in 346 cattle herds from Ecuador (2008–2009)

Variables	Category	% BVDV seropositive	β	p	OR	$CI_{95\%}$
Altitude of the farm above sea level	>2,338 m	82.7	0.85	0.002	2.33	1.4–3.9
	≤2,338 m	65.3	•	•	•	•
Density of stocking farms	>70%	79.4	0.66	0.011	1.94	1.21–3.2
	≤70%	68.8	•	•	•	•
Constant			−4.86	<0.001	0.008	

Guarino, H., Núñez, A., Repiso, M.V., Gil, A., Dargatz, D.A., 2008. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay, Preventive Veterinary Medicine, 85, 34–40

Kalaycioglu, A.T., 2007. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) diversity and vaccination. A review. Veterinary Quarterly, 29, 60–67

Kleinbaum, D.G., Klein, M., 2010.Logistic regression. A self-learning text, 3rd ed. (Springer, New York)

Laureyns, J., Ribbens, S., de Kruif, A., 2010. Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle, Veterinary Journal,184, 21–26

Mainar-Jaime, R.C., Berzal-Herranz, B., Arias, P., Rojo-Vazquez, F.A., 2001. Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral-diarrhoea virus (BVDV) infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from the Asturias region, Preventive Veterinary Medicine, 52, 63–73

Melendez, P., Donovan, A., 2003. Herd-level ELISA seroprevalence of bovine viral diarrhea antibodies in bulk-tank milk in Chilean dairy herds, Preventive Veterinary Medicine, 60, 237–241

Obando, R.C., Hidalgo, M., Merza, M., Montoya, A., Klingeborn, B., Moreno-López, J., 1999. Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State), Preventive Veterinary Medicine, 41, 271–278

Presi, P., Struchen, R., Knight-Jones, T., Scholl, S., Heim, D., 2011. Bovine viral diarrhea (BVD) eradication in Switzerland—experiences of the first two years,Preventive Veterinary Medicine, 99, 112–121

Raizman, E.A., Pogranichniy, R., Negron, M., Schnur, M., Tobar-Lopez, D.E., 2011.Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea virus type 1 and type 2 in non-vaccinated cattle herds in the Pacific Region of Central Costa Rica, Tropical Animal Health and Production, 43, 773–778

Segura-Correa, J.C., Solorio-Rivera, J.L., Sánchez-Gil, L.G., 2010. Seroconversion to bovine viral diarrhoea virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in dairy herds of Michoacan, Mexico, Tropical Animal Health and Production, 42, 233–238

Stahl, H., Rivera, I., Vagsholm, J., Moreno-López, J., 2002. Bulk milk testing for antibody seroprevalence to BVDV and BHV-1 in a rural region of Perú, Preventive Veterinary Medicine, 56, 193–202

Stahl, K., Lindberg, A., Rivera, H., Ortiz, C., Moreno-López, J., 2008. Self-clearance from BVDV infections—a frequent finding in dairy herds in an endemically infected region in Peru, Preventive Veterinary Medicine, 83, 285–296

Talafha, A.Q., Hirche, S.M., Ababneh, M.M., Al-Majali, A.M., Ababneh M.M., 2009. Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhea virus infection in dairy herds in Jordan, Tropical Animal Health and Production, 41, 499–506

Thrusfield, M., 2007. Veterinary epidemiology, third edition (Blackwell Publishing: New York, USA)

CONCLUSIONES

1. La dispersión del agente del VDVB estudiado en este trabajo en las explotaciones bovinas de aptitud lechera y mixta de Ecuador resulta muy elevada, siendo del 74,5%.
2. La prevalencia intrarrebaño obtenida para la Diarrea Vírica Bovina nos muestra el 38,8%, indicándonos una baja diseminación en Ecuador.
3. La prevalencia real del virus investigado en este estudio, no difiere significativamente de la señalada por otros estudios recientes realizados en países latinoamericanos; esta prevalencia oscila entre un 37,8 por ciento.
4. El análisis descriptivo de las variables define las características generales de las explotaciones lecheras y de aptitud mixta de Ecuador, relacionadas con el hospedador, los factores medioambientales, de instalaciones y de manejo, incluyendo además el grado de aplicación de las diferentes medidas sanitarias y de bioseguridad propias del sistema de producción.
5. El modelo de regresión logística construido para la dispersión del Virus de la Diarrea Vírica Bovina, posee una seguridad del 76,4%, actuando como variables significativas el mes de muestreo (temporada invernal considerada en Ecuador los meses de Diciembre, Enero, Febrero), la densidad de explotaciones y las instalaciones ganaderas. Por su parte, el modelo elaborado según la prevalencia individual del VDVB posee un valor predictivo del 66,7% y contiene diez variables, entre ellas, la edad del animal, la manga de manejo, la densidad de explotaciones, la vacunación tetravalente (madres) y la distancia a explotación más cercana.
6. Las variables contenidas en los modelos predictivos determinados, permiten de forma inmediata implementar toda una serie de medidas sanitarias, zootécnicas, y especialmente de bioseguridad, de carácter tanto defensivo como ofensivo, orientadas a la optimización del control del virus de la Diarrea Viral Bovina en explotaciones bovinas de Ecuador.

BIBLIOGRAFÍA

Baker J.C. (1995). *The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. Vet. Clin. North. Am. – Food Animal Practice.*

Bhudevi. & Weinstock. (2003). *Detection of bovine viral diarrhea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real time RT-PCR (Taqman). J. Virol. Methods.*

Bielanski, Sapp, & Lutze. (1998). *Association of bovine embryos produced by in vitro fertilization with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhea virus type II. Theriogenol.*

Bolin S.R. (1995). *The pathogenesis of mucosal disease. Vet. Clin. North. Am.*

Bolin. & Ridpath. (1992). *Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. Am. J. Vet. Res.*

Bolin. (1993). *Immunogens of bovine viral diarrhea virus. Vet.*

Booth P.J., Stevens D.A., Collins M.E. & Brownlie J. (1995). *Detection of bovine viral diarrhoea virus antigen and RNA in oviduct and granulosa cells of persistently infected cattle. J. Reprod. Fertil.*

Brock. (2005). *Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. Vet. Clin. North.*

Brownlie J., Clarke M.C. & Howard C.J. (2004). *Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. Vet. Rec.*

Brownlie J., Clarke M.C., Hooper L.B. & Bell G.D. . (1995). *Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. Vet. Rec.*

Brownlie. (2005). *Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea/mucosal disease complex in cattle. In.*

Brownlie. (1990). *The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. Rev. sci. tech. Off. int.*

Bruschke C.M., Vanoirschot J.M. & Vanrijn P.A. (1999). *An experimental multivalent bovine virus diarrhea virus E2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep. Vaccine.*

Carman S., Vandreumel T., Ridpath J., Hazlett M., Aalves D., Dubovi E., Tremblay R., Bolin S., Godkin A. & Anderson N. (1998). *Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993–1995. J. Vet. Diagn. Invest.*

Clarke., Brownlie. & Howard. (1997). *Isolation of cytopathic and non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus from tissues of infected animals. In: Pestivirus Infections of Ruminants, Harkness J.W., ed. Commission of the European Communities, Brussels, Belgium, EUR10238.*

Cornish, V. C. (2015). *Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigencapture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. J. Vet. Diagn. Invest.*

Cortese V.S., W. K. (2008). *Clinical and immunologic responses of vaccinated and unvaccinated calves to infection with a virulent type-II isolate of bovine viral diarrhea virus. J. Am. Vet. Med. Assoc.*

Daves. (2016). Seroprevalence of Bovine Viral Diarrhea. Virus Infection and Associated Risk Factors in Cattle in Selangor, Malaysia. *VETERINARY MEDICINE* .

David. Crauwshaw., G. H. (2011). *Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. Vet. Rec.*

Delamnoy J. (2005). *"Estrategias de diagnóstico y control de BVD"* (Vol. 5). Noticias del Lab. Azul.

Desport M., Collins M.E. & Browline J. (2009). *Detection of bovine virus diarrhoea virus RNA by in situ hybridisation with digoxigenin-labelled riboprobes. Intervirology.*

Donis R. (2008). *"Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the Vet. Clin. North Am.: Food Animal Practice* (Vol. 11).

Donis. (2012). *Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. Vet Clin. North. Am.*

Drew T.W., S. T. (2002). *BVD virus genotype 2 detected in British cattle. Vet. Rec.*

Drew., Yapp. & Paton. (1999). *The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. Vet. Microbiol.*

Dubovi E,. (2009). *"Epidemiology of bovine viral diarrhea disease in beef catle". The Compendium Collection Veterinari* (Vol. 1).

Edwards S. (2000). The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.

Entrican, Dand. & Netleton. (2013). *A double monoclonal antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. Vet. Microbiol.*

Fray M.D., M. G. (2002). *Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus. Reproduction.*

Grooms. and col. (2008). *"Deteccion of bovine viral diarrhea in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhea virus". J. Vet. Diag. Invest.* (Vol. 10).

Hamel, Wasylyshen. & Nayar. (2004). *Rapid detection of bovine viral diarrhea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay. J. Clin. Microbiol.*

Hamers C., V. E. (2002). *Virus neutralising antibodies against 22 bovine viral diarrhoea virus isolates in vaccinated calves. Vet. J.*

Hose H. (2001). *"Epidemiology of bovine viral diarrhea". Vet. Clin. North Am.: Food Animal Practice* (Vol. 11).

INEC-MAG-SICA. (2001). *III Censo Nacional Agropecuario Ecuador-Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, Ministerio de Agricultura y el Servicio de Información y Censo Agropecuario.*

Jian-Gang. (2016). Seroprevalence and risk factors of bovine viral diarrhoea virus. *Springer Science+Business Media Dordrecht 2016* .

Katz. & Hanson. (2007). *Competitive and blocking enzyme-linked immunoassay for detection of fetal bovine serum antibodies to bovine viral diarrhea virus.* J. Virol. Methods.

Kenny. (2013). *"Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections". Vet. Clin. North Am.: Food Animal Practice* (Vol. 1).

Kim. & Dubovi. (2003). *A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. Biologicals.*

Kirkland P and Mc Gowan M. (2009). *"Impacto de la infección con el virus BVD en el periparto bovino".* Córdoba, Argentina.

kleinbaum, D., & Klein, M. (2010). *Logistic regression. A self-learning text, 3rd ed. (Springer, New York).*

Leen. (2010). *"Inimunology of bovine viral dearrhea virus"* (Vol. 11). Vet. Clin. North Am.: Food Animal Practice.

Lindberg. & Alenius. (2011). *Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations.* Vet. Microbiol.

Loehr, F. M. (2008). *Experimental induction of mucosal disease: consequences of superinfection of persistently infected cattle with different strains of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus.* Arch. Virol.

Microbiol., Bolin S.R. (1993). *Immunogens of bovine viral diarrhea virus. Vet.*

R. Harasawa. (2002). *Adventitious pestivirus RNA in live virus vaccines against bovine and swine diseases. Vaccine.*

Saa. (2011). Seroprevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in non-vaccinated dairyand dual purpose cattle herds in Ecuador.

Thrusfield. (2007). *Veterinary Epidemiology. Third Edition. Blackwell Publishing. Estados Unidos.*

Vaccine., Dean. & Leyh. (2010). *Cross-protective efficacy of a bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 1 vaccine against BVDV type 2 challenge.*