



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“ANÁLISIS DE SEROPOSITIVIDAD A DIARREA VIRAL BOVINA (DVB), PARAINFLUENZA 3 (PI3), VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL BOVINO (VRSB), RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA (IBR) Y LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA (LEB) DEL HATO NACIONAL MEDIANTE EL DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN PANEL MÚLTIPLE DE INMUNODIAGNÓSTICO”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
ANA DELIA RODRIGUEZ CORTEZ

TUTOR:
DR. CARLOS G. GUTIÉRREZ AGUILAR FMVZ-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES FMVZ-UNAM
DR. DAVID ITZCÓATL MARTÍNEZ HERRERA FMVZ-UV

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MÉXICO

DICIEMBRE DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

"Análisis de seropositividad a diarrea viral bovina (DVB), parainfluenza 3 (PI3), virus respiratorio sincitial bovino (VRSB), rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), y leucosis enzoótica bovina (LEB) del hato nacional mediante el desarrollo y validación de un panel múltiple de inmunodiagnóstico" que presenté para obtener el grado de ---Doctorado--- es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Ana Delia Rodríguez Cortez

No. cta. 089082850

TABLA DE CONTENIDO

Indice general

Tabla de contenido	2
Agradecimientos	10
Dedicatorias	11
Resumen	12
Introducción	13
Capítulo 1. Revisión de literatura	23
Papel de las nuevas técnicas de diagnóstico	24
Organismos internacionales y nacionales responsables de la vigilancia epidemiológica	26
Situación de las enfermedades endémicas (DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB) en México y en el mundo	27
Pérdidas económicas	30
Características de las enfermedades	31
Diarrea Viral Bovina (DVB)	31
Estructura de los viriones	32
Genoma viral	32
Patogenia	35
Infección aguda	36
Infección intrauterina	36
Malformaciones	37
Patogénesis de la enfermedad de las mucosas (EM)	37
Animales persistentemente infectados (PI)	38
Inmunopatología	38
Control	39
Pruebas diagnósticas de DVB	40
Pruebas diagnósticas indirectas	41
Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR)	42
Estructura del virión	43
Genoma viral	45
Ciclo de replicación viral	45
Patogenia	47
Control	47
Pruebas diagnósticas	48
Leucosis Enzoótica Bovina (LEB)	49
Estructura del virión	49
Patogenia	51
Signos clínicos	52
Latencia	52
Transmisión	53
Pruebas diagnósticas	53
Control	54
Vacunas	54
Estrategias de control	55
Parainfluenza 3 (PI3) y Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB)	55

Estructura del virión	55
Replicación viral	58
Patogenia	59
Pruebas diagnósticas	60
Control	60
Programas de control de enfermedades	61
Capítulo 2. Metodología general	64
Banco de sueros	65
Desarrollo y validación de un ensayo pentaplex para la identificación de anticuerpos contra enfermedades virales comunes en bovinos	67
Estandarización de las concentraciones de reactivos en los inmunoensayos ELISA y Luminex®	78
Desarrollo de los ensayos en la plataforma Luminex® acoplamiento de esferas a antígenos virales	79
Conteo de microesferas posterior al acoplamiento	79
Verificación del acoplamiento	79
Resultados generales del ensayo pentaplex de Luminex®	80
Antígenos y lisados virales	80
Resultados de la estandarización de antígenos y lisados virales en ELISA	80
Resultados de acoplamiento	80
Ensayo múltiple pentaplex	80
Capítulo 3. Estudios de la seroprevalencia de diarrea viral bovina (DVB), parainfluenza 3 (PI3), virus respiratorio sincitial bovino (VRSB), rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y leucosis enzoótica bovina (LEB) en el hato nacional	82
Diseño muestral, regionalización del territorio nacional y cálculo del tamaño mínimo de muestra (TMM)	83
Estudio piloto	84
Selección de muestras de suero	86
Análisis estadístico	86
Resultados	88
Prevalencias generales	88
Análisis de correlación general	92
Análisis de seroprevalencias para DVB, de acuerdo con factores ambientales y manejos ganaderos	93
Análisis de seroprevalencias para IBR, de acuerdo con factores ambientales y manejos ganaderos	97
Análisis de prevalencias para LEB, de acuerdo con factores ambientales y manejos ganaderos	101
Análisis de prevalencias para PI3, de acuerdo con factores ambientales y manejos ganaderos	105
Análisis de prevalencias para VRSB, de acuerdo con factores ambientales y manejos ganaderos	109
Capítulo 4. Discusión general	114
Capítulo 5. Anexos	122
1. Metodología	123
2. Prevalencias zona norte	128
3. Prevalencias zona golfo	130
4. Prevalencias zona pacífico	132
5. Prevalencias zona centro	135
6. Prevalencias zona península	138
7. Odds Ratios	140

8. Resultados de seropositividad relacionado a cada zona ganadera	150
9. Resultados de seropositividad en el año 2012	153
Referencias	160

Indice de figuras

Figura 1	Esquema estructural del virión de la DVB	32
Figura 2	Mapa genómico del virus de la DVB	33
Figura 3	Ciclo de replicación viral de DVB y liberación de viriones	35
Figura 4	Representación esquemática del virión de alphaherpesvirus bovino tipo 1	44
Figura 5	Ciclo de replicación viral de BoAHV-1	47
Figura 6	Esquematación del virión del género Deltaretrovirus	50
Figura 7	Esquematación de los viriones de PI3 y VRSB	56
Figura 8	Genoma de los paramyxovirus	56
Figura 9	Genoma de los géneros Respirovirus (PI3) y Orthopneumovirus (VRSB)	57
Figura 10	Densidades ópticas de ensayo ELISA realizado para la estandarización de PI3, DVB y LEB	78
Figura 11	Densidades ópticas de ensayo ELISA realizado para la estandarización de VRSB e IBR	78
Figura 12	Mapa de climas de México, modificado con las zonas ganaderas: 1) norte, 2) golfo, 3) península, 4) pacífico y 5) centro	83
Figura 13	Representación gráfica de la distribución de los municipios incluidos en el muestreo para el análisis de seropositividad de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB	86
Figura 14	Mapa de la seroprevalencia general aparente para DVB en la república mexicana	89
Figura 15	Mapa de la seroprevalencia general aparente para IBR en la república mexicana	89
Figura 16	Mapa de la seroprevalencia general aparente para LEB en la república mexicana	90
Figura 17	Mapa de la seroprevalencia general aparente para PI3 en la república mexicana	90
Figura 18	Mapa de la seroprevalencia general aparente para VRSB en la república mexicana	91
Figura 19	Coeficientes de correlación de las seroprevalencias aparentes entre las enfermedades de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB	92
Figura 20	Mapa que representa por la intensidad de coloración la seropositividad estatal a DVB en las zonas ganaderas	93
Figura 21	Seropositividad a DVB en cada municipio muestreado	94
Figura 22	Mapa que representa por la intensidad de coloración la seropositividad estatal a IBR en las zonas ganaderas	97
Figura 23	Seropositividad a IBR en cada municipio muestreado	98
Figura 24	Mapa que representa por la intensidad de coloración la seropositividad estatal a LEB en las zonas ganaderas	101
Figura 25	Seropositividad a LEB en cada municipio muestreado	102
Figura 26	Mapa que representa por la intensidad de coloración la seropositividad estatal a PI3 en las zonas ganaderas	105

Figura 27	Seropositividad a PI3 en cada municipio muestreado	106
Figura 28	Mapa que representa por la intensidad de coloración la seropositividad estatal a VRSB en las zonas ganaderas	109
Figura 29	Seropositividad a VRSB en cada municipio muestreado	110
Figura 30	Coefficientes de correlación parcial de las prevalencias aparentes entre las enfermedades de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB	113

Indice de cuadros

Cuadro 1	Reportes de seroprevalencias estimadas de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB en diversos países	29
Cuadro 2	Reportes de prevalencias de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB en estudios nacionales	29
Cuadro 3	Resumen de las principales proteínas virales de flavivirus	34
Cuadro 4	Resumen de las principales proteínas virales de la familia Paraxymoviridae	59
Cuadro 5	Listado del número de muestras colectadas en cada estado de la república mexicana	66
Cuadro 6	Resultados de recuperación y verificación de esferas, posterior al acoplamiento de cada antígeno	80
Cuadro 7	Resultados del estudio piloto expresado en porcentajes de frecuencias relativas de seropositividad para las enfermedades de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB en cada zona ganadera	84
Cuadro 8	Tamaño mínimo de muestra calculado para cada enfermedad y para cada zona ganadera de la república mexicana	85
Cuadro 9	Número de muestras analizadas para determinar la seropositividad de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB en cada zona ganadera	85
Cuadro 10	Frecuencias de seropositividad para DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB en cada zona ganadera de la república mexicana	88
Cuadro 11	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de humedad	94
Cuadro 12	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de temperatura	95
Cuadro 13	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de clima	95
Cuadro 14	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de empadre	95
Cuadro 15	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de tipo de servicio	96
Cuadro 16	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de fin zootécnico	96
Cuadro 17	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de número de parto	96
Cuadro 18	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de sistema de pastoreo	96
Cuadro 19	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de temperatura	98

Cuadro 20	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de humedad	99
Cuadro 21	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de clima	99
Cuadro 22	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de fin zootécnico	100
Cuadro 23	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de tipo de servicio	100
Cuadro 24	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de número de parto	100
Cuadro 25	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de sistema de pastoreo	100
Cuadro 26	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de tipo de empadre	101
Cuadro 27	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de temperatura	102
Cuadro 28	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de humedad	103
Cuadro 29	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de clima	103
Cuadro 30	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de fin zootécnico	104
Cuadro 31	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de tipo de empadre	104
Cuadro 32	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de tipo de servicio	104
Cuadro 33	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de número de parto	104
Cuadro 34	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de sistema de pastoreo	105
Cuadro 35	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a PI3 para la variable de temperatura	106
Cuadro 36	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a PI3 para la variable de humedad	107
Cuadro 37	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a PI3 para la variable de clima	107
Cuadro 38	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a PI3 para la variable de fin zootécnico	107
Cuadro 39	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a PI3 para la variable de tipo de empadre	108
Cuadro 40	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a PI3 para la variable de número de parto	108
Cuadro 41	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a PI3 para la variable de sistema de pastoreo	108
Cuadro 42	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a VRSB para la variable de temperatura	110
Cuadro 43	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a VRSB para la variable de humedad	111
Cuadro 44	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a VRSB para la variable de clima	111

Cuadro 45	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a VRSB para la variable de fin zootécnico	111
Cuadro 46	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a VRSB para la variable de tipo de empadre	112
Cuadro 47	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a VRSB para la variable de número de parto	112
Cuadro 48	Prevalencia media aparente y riesgo relativo a VRSB para la variable de sistema de pastoreo	112
Cuadro 49	Antígenos recombinantes para LEB, DVB y PI3	124
Cuadro 50	Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza de DVB en los estados de la república que conforman la zona norte	128
Cuadro 51	Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza de IBR en los estados de la república que conforman la zona norte	128
Cuadro 52	Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza de LEB en los estados de la república que conforman la zona norte	129
Cuadro 53	Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza de PI3 en los estados de la república que conforman la zona norte	129
Cuadro 54	Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza de VRSB en los estados de la república que conforman la zona norte	129
Cuadro 55	Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza de DVB en los estados de la república que conforman la zona golfo	130
Cuadro 56	Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza de IBR en los estados de la república que conforman la zona golfo	130
Cuadro 57	Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza de LEB en los estados de la república que conforman la zona golfo	130
Cuadro 58	Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza de PI3 en los estados de la república que conforman la zona golfo	130
Cuadro 59	Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza de VRSB en los estados de la república que conforman la zona golfo	131
Cuadro 60	Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza de DVB en los estados de la república que conforman la zona pacífico	132
Cuadro 61	Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza de IBR en los estados de la república que conforman la zona pacífico	132
Cuadro 62	Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza de LEB en los estados de la república que conforman la zona pacífico	133
Cuadro 63	Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza de PI3 en los estados de la república pertenecientes a la zona pacífico	133
Cuadro 64	Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza de VRSB en los estados de la república pertenecientes a la zona pacífico	134
Cuadro 65	Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza de DVB en los estados de pertenecientes a la zona centro de la república mexicana	135
Cuadro 66	Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza de IBR en los estados de la república que conforman la zona centro	135
Cuadro 67	Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza de LEB en los estados de la república que conforman la zona centro	136
Cuadro 68	Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza de PI3 en los estados de la república mexicana que conforman la zona centro	136
Cuadro 69	Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza de VRSB en los estados de la república que conforman la zona centro	137

Cuadro 70	Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza de DVB en los estados de la república que conforman la zona península	138
Cuadro 71	Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza de IBR en los estados de la república que conforman la zona península	138
Cuadro 72	Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza de LEB en los estados de la república que conforman la zona península	138
Cuadro 73	Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza de PI3 en los estados de la república que conforman la zona península	138
Cuadro 74	Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza de VRSB en los estados de la república que conforman la zona península	139
Cuadro 75	Odds ratio para las variables temperatura y DVB	140
Cuadro 76	Odds ratio para las variables humedad y DVB	140
Cuadro 77	Odds ratio para las variables clima y DVB	140
Cuadro 78	Odds ratio para las variables fin zootécnico y DVB	141
Cuadro 79	Odds ratio para las variables tipo de empadre y DVB	141
Cuadro 80	Odds ratio para las variables tipo de servicio y DVB	141
Cuadro 81	Odds ratio para las variables número de parto y DVB	141
Cuadro 82	Odds ratio para las variables sistema de pastoreo y DVB	141
Cuadro 83	Odds ratio para las variables temperatura e IBR	142
Cuadro 84	Odds ratio para las variables humedad e IBR	142
Cuadro 85	Odds ratio para las variables clima e IBR	142
Cuadro 86	Odds ratio para las variables fin zootécnico e IBR	142
Cuadro 87	Odds ratio para las variables tipo de empadre e IBR	143
Cuadro 88	Odds ratio para las variables tipo de servicio e IBR	143
Cuadro 89	Odds ratio para las variables número de parto e IBR	143
Cuadro 90	Odds ratio para las variables sistema de pastoreo e IBR	143
Cuadro 91	Odds ratio para las variables temperatura y LEB	143
Cuadro 92	Odds ratio para las variables humedad y LEB	144
Cuadro 93	Odds ratio para las variables clima y LEB	144
Cuadro 94	Odds ratio para las variables fin zootécnico y LEB	144
Cuadro 95	Odds ratio para las variables tipo de empadre y LEB	144
Cuadro 96	Odds ratio para las variables tipo de servicio y LEB	145
Cuadro 97	Odds ratio para las variables número de parto y LEB	145
Cuadro 98	Odds ratio para las variables sistema de pastoreo y LEB	145
Cuadro 99	Odds ratio para las variables temperatura y PI3	145
Cuadro 100	Odds ratio para las variables humedad y PI3	146
Cuadro 101	Odds ratio para las variables clima y PI3	146
Cuadro 102	Odds ratio para las variables fin zootécnico y PI3	146
Cuadro 103	Odds ratio para las variables tipo de empadre y PI3	146
Cuadro 104	Odds ratio para las variables número de parto y PI3	147
Cuadro 105	Odds ratio para las variables sistema de pastoreo y PI3	147
Cuadro 106	Odds ratio para las variables temperatura y VRSB	147
Cuadro 107	Odds ratio para las variables humedad y VRSB	147
Cuadro 108	Odds ratio para las variables clima y VRSB	148
Cuadro 109	Odds ratio para las variables fin zootécnico y VRSB	148
Cuadro 110	Odds ratio para las variables tipo de empadre y VRSB	148
Cuadro 111	Odds ratio para las variables número de parto y VRSB	148
Cuadro 112	Odds ratio para las variables sistema de pastoreo y VRSB	149
Cuadro 113	Frecuencias de seropositividad para DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB en cada zona ganadera de la república mexicana según	153

la información proporcionada por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SENASICA) en el año 2012

Cuadro 114	Número de muestras analizadas por estado de la república mexicana	154
Cuadro 115	Porcentaje de prevalencias para DVB en el año 2012	155
Cuadro 116	Porcentaje de prevalencias para IBR en el año 2012	156
Cuadro 117	Porcentaje de prevalencias para LEB en el año 2012	157
Cuadro 118	Porcentaje de prevalencias para PI3 en el año 2012	158
Cuadro 119	Porcentaje de prevalencias para VRSB en el año 2012	159

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento a mi tutor, el Dr. Carlos G. Gutiérrez por sus enseñanzas, apoyo y dedicación durante los estudios de doctorado, por la ayuda en la preparación de los artículos y del presente documento. Sus comentarios, sugerencias y consejos fueron invaluable para mejorar mi trabajo y alcanzar los objetivos propuestos.

Quiero agradecer a los miembros de mi comité tutorial: Dr. Rogelio Alonso y Dr. David Martínez Herrera por el acompañamiento y guía durante todo el doctorado, por su tiempo y dedicación para el mejoramiento del presente documento. Sus observaciones y críticas constructivas me ayudaron a fortalecer mi investigación y a presentar un trabajo de calidad.

A los miembros del jurado: Dr. José Juan Martínez Maya, Dr. Juan Gay Gutiérrez, Dr. Orbelin Soberanis Ramos y Dr. Hugo Ramírez Álvarez por enriquecer el presente documento con sus valiosos comentarios, por su evaluación y retroalimentación que me permitieron profundizar algunos temas y demostrar la solidez de mis argumentos.

A las Dras. Arantza Lassala Iruete y Lucía Rangel Porta, por sus provechosos y preciados comentarios, por su dedicación y paciencia infinita durante la escritura del presente documento. No existen palabras que dimensionen lo agradecida que estoy con ambas durante la preparación de los artículos, de la tesis y presentaciones.

Al laboratorio de Genética molecular de la FMVZ de la UNAM agradezco la donación de los antígenos utilizados en el presente trabajo.

Agradezco al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SIVE) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria por facilitarme los datos sobre el registro de casos de las enfermedades estudiadas, durante los años 2012 a 2022.

A los Dres. Oscar Rico Chávez y Alejandro Zaldívar Gómez, por su valiosa ayuda en la elaboración de mapas, asesoría y desarrollo del análisis geoespacial de la presente tesis. Infinitas gracias por su disposición y su tiempo, por sus valiosas aportaciones en este proceso académico que me permitió crecer como profesionista y como persona.

A Mario Arturo Rodríguez Mendoza, por el apoyo durante el desarrollo de la fase experimental, por tus comentarios y aportaciones al presente documento.

A Belem Arias, Héctor D. Nájera Rivera y Enrique Medellín por su colaboración durante las extenuantes horas de lectura de las placas del ensayo epidemiológico. A Valentina García y Paloma Gutiérrez por su amable ayuda durante el acomodo y revisión de la base de datos.

Este trabajo fue apoyado por el proyecto 32239-1463-2-VIII-12 SAGARPA-UNAM.

Agradezco el apoyo que la DGAPA, UNAM proporcionó para mis estudios de posgrado mediante el programa PASPA.

DEDICATORIAS

A la memoria de mi abuelo Juan Cortés, de mis tíos Luis, Juan, Lalo e Hilario, quienes fueron las personas que más influyeron en mi existencia, gracias a sus enseñanzas, sus experiencias, anécdotas y valores. La vida tenía otros planes y nos obligó a tener un diálogo y proximidad internos, transitamos de estar con nosotros a estar dentro de nosotros, y pese a que su partida dolió y seguirá lastimando, sólo quiero dejar este documento como un pequeño tributo a su vida, es mi manera de intentar aproximar nuestros corazones, de dejarlo como testimonio de que persisten en mis acciones y en mis recuerdos.

También te lo dedico a ti Mamita linda, por tu inquebrantable paciencia, por tu infinito amor y desmesurado apoyo, no tengo más que agradecer el que estés a mi lado y saber que siempre puedo contar contigo.

A mi Papá, quien me ha motivado a perseguir las metas propuestas, has sido inspiración en momentos de flaqueza, gracias por tu impulso.

A Mayo, gracias por tu ayuda, por tu cariño, por tu apoyo y por ser mi compañero y cómplice de vida. Gracias por coincidir conmigo.

Y finalmente, quiero dedicarlo a mis “muchachos y muchachas”: Alfie, Santy, Fili, Bisha y Leia quienes hacen de los días y noches largas una verdadera aventura, los días difíciles fueron mucho más llevaderos con su compañía.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue establecer las seroprevalencias a diarrea viral bovina (DVB), parainfluenza 3 (PI3), virus respiratorio sincitial bovino (VRSB), rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y leucosis enzoótica bovina (LEB) del hato de cría nacional. Estas enfermedades son de distribución mundial y cada vez son más los países que están implementando medidas de control, erradicación y monitoreo, principalmente por razones comerciales. Un primer paso crucial para la implementación de programas de control de enfermedades es establecer el nivel endémico basal y delimitar las circunstancias físicas, biológicas y sociales que interactúan con el agente causal. En este estudio, validamos una metodología diagnóstica múltiple de uso masivo para las cinco enfermedades mencionadas y realizamos un diagnóstico situacional a nivel nacional. Para la detección de anticuerpos contra DVB, LEB y PI3, se utilizaron antígenos recombinantes, mientras que para VRSB e IBR se emplearon lisados virales. El análisis ROC del ensayo arrojó un área bajo la curva (AUC) de 0.981, lo que demuestra la eficacia de la prueba serológica quintuple con tecnología xMAP (Perfilado de Multi Analitos) de Luminex®. La sensibilidad y especificidad superaron el 90% para cada enfermedad, y los valores de verosimilitud positivos (LR+) fueron superiores a 10 y los de verosimilitud negativos (LR-) cercanos a 0 en todos los casos. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron menores al 20%, corroborando que el ensayo quintuple desarrollado es válido, sensible, específico, reproducible y repetible. Además, un ensayo de inhibición de la unión confirmó la selectividad de la prueba. Por lo tanto, el ensayo quintuple desarrollado cumple con las características necesarias para ser una opción de diagnóstico simultáneo para DVB, IBR, PI3, VRSB y LEB, proporcionando una herramienta útil para determinar el estado sanitario de los hatos bovinos. El análisis de seropositividad reveló que las cinco enfermedades se encuentran en niveles que van de mesoendémicos a hiperendémicos, con prevalencias generales de 51.5% para DVB, 33.9% para IBR, 43.3% para LEB, 47.2% para PI3 y 51.6% para VRSB. Estos hallazgos subrayan la importancia de iniciar con la vigilancia activa de estas enfermedades, con el objetivo de establecer programas de control o erradicación. Asimismo, es crucial evaluar los impactos económicos que su presencia puede tener en el hato bovino nacional.

INTRODUCCIÓN

La ganadería bovina en México se encuentra conformada por poco más de 36 millones de cabezas de ganado. De este total, el 93% (33.6 millones) lo conforman bovinos destinados a la producción de carne y el restante es ganado destinado a la producción de leche (SIAP-SAGARPA, 2022). La producción de los hatos ganaderos constituye una de las principales actividades económicas del sector primario en México, tanto para satisfacer el consumo nacional como para la exportación. De acuerdo a la SADER, la producción de carne bovina ha mantenido su crecimiento anual desde 2019 posicionando a México en el séptimo sitio a nivel mundial en producción y comercialización de carne de res (FAO, 2010). El principal consumidor de nuestras exportaciones son los Estados Unidos de América (EUA), recibiendo más del 80% de las transacciones comerciales provenientes de México. Para los EUA, estas operaciones representan el 20.2% de las importaciones de carne vacuna (Peel, 2022), y la principal fuente de becerros en pie con 1.1 millones de animales anualmente (Lara & Alvarado, 2020). A nivel de América Latina y el Caribe, México se encuentra entre los 6 países que juntos contribuyen con el 40% de exportaciones totales de carne bovina al mercado internacional (FAO, 2010). Adicionalmente, en los últimos años se ha observado una reducción del 30% en las importaciones de carne de res proveniente de EUA (Peel, 2022). Todo lo anterior evidencia la importancia de la ganadería para la autosuficiencia alimentaria y en el ámbito internacional (Peel, 2022). Es por ello que es de suma importancia proteger el sector ganadero de enfermedades que causen el deterioro en la salud y en la producción animal. Se considera que las enfermedades ocasionan aproximadamente el 20% de pérdidas en la producción (OIE, 2016; Rojas *et al.*, 2021). La OMSA (antes OIE, 2016) publicó los resultados de una encuesta realizada a 180 países miembros sobre el costo de los brotes de enfermedades entre los años 2000 a 2016. La encuesta mostró una deficiencia de datos sobre las pérdidas de producción causadas por enfermedades endémicas, y que, entre los países miembros, hay una gran variabilidad en la inversión realizada en los servicios veterinarios, programas de control de enfermedades, medidas de prevención y respuesta a brotes. Interesantemente, la encuesta no pudo generar datos útiles sobre las pérdidas en producción causadas por las enfermedades endémicas (OIE, 2016). Trabajos previos realizados en México han determinado la presencia ubicua de agentes infecciosos virales en los hatos ganaderos con altas prevalencias (Suzan *et al.*, 1983; De La Trinidad, 2010; Sarmiento-Silva *et al.*, 2012; Alvarado & Hernández, 2015; Abad Zavaleta *et al.*, 2016; Milián-Suazo *et al.*, 2016; Gutiérrez *et al.*, 2020), sin embargo, tampoco tenemos estimaciones sobre las consecuencias económicas de estas enfermedades. No obstante, en otros países se ha demostrado que las enfermedades endémicas son causa de pérdidas significativas en la producción bovina (Bowland &

Shewen, 2000; Erskine & Sordillo, 2009; Betancur *et al.*, 2010; Sacco *et al.*, 2014; Can *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2021;). El costo de las enfermedades endémicas en la salud y bienestar del ganado bovino, la merma en la productividad y los efectos comerciales asociados, han acentuado la importancia de la vigilancia epidemiológica a nivel mundial. De hecho, las restricciones a la movilización de animales, semen o embriones positivos a enfermedades endémicas, y la creación de nuevas legislaciones para restringir el comercio parecen ir en aumento (Berriatua *et al.*, 2005). El impacto comercial es efectivamente uno de los principales impulsores tanto para la sensibilización pública ante las enfermedades presentes en los animales, como para desarrollar un interés y discurso políticos que promuevan el establecimiento de estrategias para su manejo y control.

La endemia se define como la presencia constante de una enfermedad en una población por un largo periodo de tiempo (Cruz & Camargo, 2001). Dichas enfermedades suelen tener una prevalencia alta y estable, con baja mortalidad aparente. Sin embargo, pueden tener impacto considerable en el bienestar animal, la salud pública, el comercio internacional y la rentabilidad de los hatos. Los brotes de enfermedad son ligeros, que incluso pueden pasar desapercibidos o son tolerados por los productores (Carlake, 2011; EFSA, 2017a; DOF, 29-11-2018*). La consideración de enfermedad endémica obedece a decisiones políticas, relacionadas al nivel de atención gubernamental y a los recursos destinados para su atención, investigación y manejo. En estas decisiones se considera el nivel de prevalencia, el impacto en el bienestar animal y en la rentabilidad de la producción, así como la posibilidad de que la enfermedad pueda causar una epidemia de rápida propagación que conduzca al surgimiento de emergencias zoonosológicas (Carlake, 2011; EFSA, 2017a; Gary *et al.*, 2021), por lo que la vigilancia de las enfermedades consideradas de menor riesgo no debe descuidarse.

En la Unión Europea (UE) los registros normativos para los programas de control o erradicación se encuentran en el Reglamento 2016/429/EU, que establece las medidas sanitarias aplicables al semen, a los embriones y a la movilización de animales dentro de los países miembros. Sin embargo, debe aclararse que la obligatoriedad de los programas de erradicación depende de cada país. De igual modo, en el manual terrestre de la OMSA (OIE, 2018) se establecen normas más detalladas para el control internacional de rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y diarrea infecciosa bovina (DVB), y se mencionan los requisitos que un hato, zona o país debe cumplir para calificar y mantener la certificación de libre de una enfermedad, y las recomendaciones para la

* Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos.

importación de ganado, semen fresco o congelado y de ovocitos o embriones destinados a rebaños en zonas libres de alguna enfermedad.

En México, la normativa aplicable al control de enfermedades se encuentra en la NOM-017-SSA2-2012, en la que se establecen los lineamientos para la vigilancia epidemiológica con mayor relevancia en las enfermedades originadas en los animales e incluyen algunas enfermedades consideradas endémicas. Mientras que la NOM-032-SSA2-2010 menciona los lineamientos para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. SADER (antes SAGARPA) clasifica a las enfermedades endémicas transmisibles de acuerdo a sus efectos negativos en la producción pecuaria, la salud pública y el comercio internacional como: de notificación inmediata obligatoria (grupo 2, que por su importancia se encuentran incluidas en las acciones nacionales de sanidad animal), o de notificación mensual obligatoria (grupo 3, enfermedades consideradas de menor riesgo) (DOF, 29-11-2018^{*}). Dichas notificaciones se realizan ante el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en México (SIVE), y a pesar de que en el “acuerdo SIVE” (14-06-2021^{**}) se mencionan las acciones que deben realizarse para la vigilancia, monitoreo y control de enfermedades, la mayoría de las actividades desarrolladas son de carácter pasivo, con vigilancia epidemiológica activa solamente en el caso de las enfermedades consideradas como prioritarias o bajo campaña.

Algunas enfermedades de los bovinos que pertenecen al grupo 3, de acuerdo al Diario Oficial de la Federación, son diarrea viral bovina (DVB), rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y leucosis enzoótica del bovino (LEB) (DOF, 29-11-2018^{*}). Sin embargo, pese a que se establece la notificación periódica obligatoria, no existen informes que evidencien el monitoreo activo eficiente (SIVE, 2023). Por otro lado, las enfermedades causadas por los virus respiratorio sincitial bovino (VRSB) y parainfluenza tipo 3 (PI3) son enfermedades de las cuales se reconoce su presencia a nivel nacional, pero no están incluidas en los listados del Acuerdo. Las enfermedades mencionadas son de distribución mundial y se eligieron debido a que estudios en otros países han mostrado que ocasionan pérdidas significativas en la producción bovina. Debe considerarse además que en México no existen diagnósticos situacionales oficiales que informen el contexto epidemiológico de las enfermedades endémicas en el ganado bovino, ni estudios que evalúen el impacto económico de las mismas (Gómez-Romero *et al.*, 2021), y la poca participación de los involucrados en el reporte

^{*} Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos.

^{**} Acuerdo mediante el cual se dan a conocer las medidas aplicables en materia de epidemiología y de vigilancia epidemiológica en animales terrestres y el uso de la información del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en los Estados Unidos Mexicanos.

de las enfermedades sesga las estimaciones, lo que pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios diagnósticos, que demuestren el estatus sanitario de estas enfermedades en el país.

La DVB tiene la capacidad de infectar al ganado bovino de todas las edades, aun cuando afecta especialmente a animales jóvenes. Su importancia radica en que disminuye la producción y la reproducción en vacas lactantes, además de que puede producir abortos, reabsorciones fetales, momificaciones, malformaciones, lesiones en el sistema nervioso central y muerte perinatal (Trigo, 1987; Youngquist & Threlfall, 1997; Houe, 1999; Rondón, 2006; OIE, 2018a). La inmunosupresión causada por los viriones puede provocar infecciones concomitantes (Trigo, 1987; Youngquist & Threlfall, 1997; Rondón, 2006; OIE, 2018a). Otra característica es que los animales que sobreviven a la infección intrauterina durante el primer trimestre de gestación quedarán como animales denominados como persistentemente infectados (PI) constituyendo el principal reservorio del virus dentro de las poblaciones. Se sabe que estos animales pueden excretar grandes cantidades de virus en orina, heces, secreciones nasales en forma de aerosoles, leche (Houe, 1999) y semen (OIE, 2018a). Diversos estudios seroepidemiológicos reportan prevalencias mundiales que oscilan entre 14.6% y 98.7% (Bosco *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2021), con porcentajes de animales persistentemente infectados de 0.3 a 3% (Van Campen, 2010; Torres, 2020). En tanto que en México se ha reportado prevalencias de 21.1% (Sánchez, 2010) hasta 98% (Milián-Suazo *et al.*, 2016).

La IBR se caracteriza por manifestar signos clínicos en las vías respiratorias altas, con secreciones nasales, hiperemia del hocico y conjuntivitis, y comúnmente es asociada a fallas reproductivas en bovinos lecheros. Los signos de enfermedad general son depresión, fiebre, anorexia, abortos y reducción en la producción de leche. En la infección del tracto genital, el virus puede causar vulvovaginitis pustulosa y balanopostitis. A la necropsia se observa laringitis, rinitis y traqueítis. La mortalidad es baja y la mayoría de las infecciones siguen un curso subclínico, sin embargo, en caso de asociarse con infecciones bacterianas secundarias pueden conllevar a una enfermedad respiratoria más grave (OIE, 2022). Debido a la naturaleza de los herpesvirus, una vez que un animal es expuesto al virus queda como portador indefinidamente (OIE, 2018c). Las seroprevalencias reportadas varían desde 8.8% hasta 70.4%, en países como Argentina, Colombia, España e India (Espinosa, 2019), mientras que varios países europeos han realizado considerables esfuerzos de erradicación (OIE, 2022; EFSA, 2017a). En México se reportan regiones con seroprevalencias superiores al 70% (Muylkens *et al.*, 2007) pero existen reportes de seroprevalencia que van desde 13.66% hasta el 93% en los estados de Michoacán, Yucatán, Tamaulipas, Campeche y Chiapas (Espinosa, 2019).

La LEB es una enfermedad que afecta principalmente al tejido linfoide, específicamente a los linfocitos B, y se caracteriza por tumoraciones que causan linfomas malignos y linfosarcomas; lo que provoca pérdidas económicas de consideración en vacas lecheras debido a la disminución de la producción láctea y la viabilidad de las vaquillas de reemplazo (Erskine & Sordillo, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2020). El ganado puede infectarse a cualquier edad, incluida la fase embrionaria. Sin embargo, la presentación de las tumoraciones suele ocurrir después de períodos de incubación bastante largos, por lo que los animales mayores a 3 años son los más afectados con la presentación de lesiones (OIE, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2020). Las prevalencias varían entre 1.2% a 87% (Gnad *et al.* 2004; EFSA 2015), en tanto que en México se han estimado entre el 11 al 66% (Gutiérrez *et al.*, 2020).

La PI3 y el VRSB son agentes etiológicos que forman parte del complejo respiratorio bovino (Baker *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 1998; Sarmiento-Silva *et al.*, 2012). La infección por estos virus pueden producir cuadros clínicos respiratorios severos, principalmente en animales jóvenes (Baker *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 1998; Sarmiento-Silva *et al.*, 2012; Ferella *et al.*, 2017) y viejos. La transmisión puede ocurrir por contacto directo con secreciones o aerosoles, con animales recién introducidos a la granja, o por transmisión indirecta con animales no pertenecientes al hato (Molina *et al.*, 1998; Sarmiento-Silva *et al.*, 2012). Algunos de los principales factores de riesgo para la transmisión de estos virus incluyen el hacinamiento, prácticas de bioseguridad deficientes y movimiento del ganado. No existe evidencia que indique que los insectos desempeñen un papel en la transmisión viral (Baker *et al.*, 1997; Sarmiento-Silva *et al.*, 2012; Ferella *et al.*, 2017). La morbilidad para ambas infecciones es bastante alta, desde 60% hasta el 80%, inclusive se ha estimado que el 60% de las enfermedades respiratorias son producto del VRSB en el ganado lechero. Se considera un 5 a 20% de letalidad para ambas infecciones (Sarmiento-Silva *et al.*, 2012; Galván *et al.*, 2013; Ferella *et al.*, 2017). La prevalencia de PI3 se ha reportado entre el 50 a 93.3% (CABI 2021; Andrade & Chicaiza, 2015) y en México, los reportes previos indican prevalencias de 55.9% (Alvarado & Hernández, 2015).

El VRSB puede aislarse de animales asintomáticos y puede persistir durante varios meses. Se ha sugerido la existencia de terneros infectados de manera persistente, que podrían diseminar el virus. Sin embargo, los animales clínicamente enfermos son la fuente más probable de las infecciones recurrentes. La prevalencia se ha reportado entre 40 a 100% (Sacco *et al.*, 2014) y en México se han observado prevalencias de entre 52 a 90.8% (Sarmiento-Silva *et al.*, 2012).

Se considera que un brote de enfermedad puede afectar el 20% de las actividades comerciales del hato, considerando los costos directos (producidos de manera inmediata y tangible; como es el caso de aborto o muerte, la disminución de la producción, etc.) y los indirectos (no son

visibles de forma inmediata y su impacto es a largo plazo; por ejemplo gastos de medicación, mantenimiento de animales improproductivos o disminución de la calidad de los productos generados) (OIE, 2016; Rojas *et al.*, 2021).

Se han calculado pérdidas económicas en Turquía asociadas a IBR de \$509 dólares por cada vaca que aborta y de \$379 dólares por el tratamiento de la infección (Can *et al.*, 2016). De igual forma, en Brasil se estimaron 258 779 abortos por año con pérdidas financieras de US \$48 402 244 dólares (Silva *et al.*, 2021). Mientras que en Estados Unidos de Norte América se calcularon pérdidas por \$80 millones de dólares por año para DVB, por concepto de costos por tratamientos, infertilidad, mortalidad embrionaria y mortandad (Richter *et al.*, 2017). Además, se estima que la leucosis causa \$6 400 dólares en pérdidas por cada 100 vacas debido por el decremento en la producción láctea, con pérdidas generales superiores a 7 millones de dólares en hatos de EUA con prevalencias de 50% (Erskine & Sordillo, 2009). En el caso de PI3 en Colombia, las restricciones comerciales y los gastos por atención a animales enfermos ascienden a cerca de \$1680 dólares (Betancur *et al.*, 2010), mientras que los costos de vacunación y tratamiento de las afecciones respiratorias, que son consideradas como las afecciones más comunes y costosas en el ganado bovino (Rojas *et al.*, 2021), incluidas PI3 y VRSB, se calculan costos de hasta en \$1 000 millones de dólares anuales (Sacco *et al.*, 2014). Lo que demuestra el impacto y la importancia de controlar las enfermedades endémicas, especialmente aquellas con altos niveles de prevalencia.

Los diferentes programas de control o erradicación establecen como paso inicial conocer la prevalencia de las enfermedades en las diferentes regiones. Las demás acciones varían de acuerdo al nivel de prevalencia e incluyen la identificación, aislamiento, segregación o eliminación de los animales positivos, aunado al establecimiento de programas de medicina preventiva y estrategias de vacunación (Iscaro *et al.*, 2021; Makoschey & Berga, 2021; van Campen, 2010). Para poder establecer dichos programas es necesario entonces estimar el nivel de endemia y dimensionar la presencia de las enfermedades en un territorio dado, lo cual se logra con los datos de la vigilancia epidemiológica (Carslake, 2011; Lane *et al.*, 2015). El nivel de endemia se clasifica como holoendemia cuando la población afectada supera el 75% de prevalencia, hiperendemia si se encuentra entre el 50 al 75%, mesoendemia cuando se afecta entre el 10 al 50% e hipoendemia cuando la prevalencia es menor al 10% (Cruz & Camargo, 2001; Hay *et al.*, 2004; González, 2020).

Los programas de erradicación de IBR en la UE, establecen que en condiciones de baja seroprevalencia del virus herpes bovino tipo 1 (BoHV-1) debe incluir medidas de bioseguridad, el empleo de la estrategia de prueba y matanza, en la que los animales seropositivos son sacrificados y no se emplea vacunación. En tanto que los hatos destinados a producir animales de reemplazo, la estrategia sugerida es la obtención de animales libres de IBR, con la simultánea eliminación

gradual de los animales seropositivos, repoblando los hatos con descendencia seronegativa. Países como Dinamarca, Finlandia, Noruega, Suecia, Austria, Suiza y algunas regiones italianas, han logrado con éxito la erradicación de la IBR en zonas con seroprevalencia media a alta siguiendo una estrategia de vacunación con la utilización de vacunas DIVA (se permite un máximo de 5% de animales seropositivos al antígeno deletado), seguida de eliminación de animales seropositivos. Mientras que Bélgica y los Países Bajos, han adoptado la vacunación como estrategia de control. Una estrategia similar para el control o erradicación de LEB ha sido la identificación y la eliminación prioritaria de los animales infectados, así como, el establecimiento de medidas estrictas de bioseguridad que eviten el ingreso del patógeno a la unidad productiva y la generación de fomites (EFSA, 2015).

Es importante mencionar que una vez alcanzada la meta de erradicación deben de realizarse programas de vigilancia epidemiológica, a fin de garantizar en su caso la detección temprana de la infección en hatos libres para prevenir la propagación de la infección a otros rebaños certificados. En EUA se implementaron los primeros programas de control de IBR durante las décadas de los 70's y 80's del siglo pasado, los cuales tuvieron un mayor impulso durante los 90's debido a las condiciones impuestas por la Unión Europea (UE) para la importación de animales, semen y embriones (EFSA, 2017; EFSA, 2017a).

A nivel mundial la tendencia actual se dirige a controlar o erradicar las enfermedades endémicas (Barlett *et al.*, 2020) para evitar la reemergencia de enfermedades (Berriatua *et al.*, 2005; Discontools, 2020), prevenir su propagación hacia otras poblaciones animales o humanas (National Research Council USA, 2009), disminuir el impacto económico en los sistemas productivos, evitar daños en el comercio internacional (por restricciones comerciales o cierres fronterizos. Berriatua *et al.*, 2005) y mantener el bienestar animal (Health for animals.org). Además, prevenir y controlar las enfermedades permite el crecimiento de las economías y contribuye con el reforzamiento en las comunidades locales, lo que conduce a garantizar el suministro de alimentos seguros y suficientes, provenientes de hatos con poblaciones animales sanas (OIE, 2015; Health for animals.org). Países como Australia, Estados Unidos de Norte América y Canadá están revisando su estado zoonosario actual, para priorizar las enfermedades presentes en su territorio. Específicamente, para el caso de DVB en Norte América se han implementado estrategias para el diagnóstico seroepidemiológico, la caracterización genética y la detección de animales persistentemente infectados (PI). Además, se han realizado estimaciones de las pérdidas económicas que ocasionan diferentes enfermedades y se han establecido medidas de control voluntario (Gómez-Romero *et al.*, 2021). Mientras que países europeos como Dinamarca, Noruega, Suecia, Islandia, Austria, Suiza, Alemania, Bélgica, Polonia, Irlanda y Escocia han tomado medidas para controlar la DVB y la IBR (Berriatua *et al.*, 2005;

Moennig & Becher, 2018) logrando con ello reducir su prevalencia (Bertolotti *et al.*, 2015, Wernike *et al.*, 2017, Wernike & Beer, 2019; van Roon *et al.*, 2020; Stokstad *et al.*, 2020, Santman-Berends *et al.*, 2021).

Así, en 1991 en Dinamarca se estableció un programa de erradicación para la DVB cuando la seropositividad era de 60 a 85% en 1991, y lograron erradicarla en sólo 9 años (Houe & Meyling, 1991). De manera similar, España, estableció un programa de control cuando la seroprevalencia máxima era del 16% en 1986 y por medio de la detección temprana de LEB alcanzó la erradicación en el 2010. En el caso de IBR, Austria, Dinamarca, Finlandia, Noruega, Suecia y Suiza iniciaron con un rango de prevalencias del 12% al 77.5% y lograron su erradicación en aproximadamente 20 años, mediante un programa de dos etapas, en el que en las zonas de alta prevalencia se realizó vacunación masiva y sistémica cada 6 meses, mientras que en las zonas de baja prevalencia no se utilizó la vacunación, sino la identificación y eliminación de los animales seropositivos. Durante ambas etapas, los monitoreos serológicos periódicos fueron fundamentales para el seguimiento del programa (EFSA, 2015; More *et al.*, 2017; Iscaro *et al.*, 2021; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2023). En los Estados Unidos, aunque no existen programas obligatorios a nivel nacional, hay programas regionales o estatales en los que se fomenta la vacunación contra IBR, DVB, PI3 y VRSB (Tennessee Agricultural Enhancement Program [TAEP]), o bien las pruebas para el diagnóstico de DVB y la eliminación de animales portadores persistentes (Wisconsin Wisconsin Department of Agriculture, Trade, and Consumer Protection [DATCP]).

Contrariamente, en países donde las enfermedades estudiadas son endémicas y no se realizan programas de control, las seroprevalencias reportadas son altas y con rangos muy amplios. Por ejemplo, India informa prevalencias de 12% a 65% para DVB (Kumar *et al.*, 2018), mientras que en Brasil llegan hasta el 90% (Almeida *et al.*, 2013). En el caso de IBR, las seroprevalencias en Europa tienen valores entre el 12 y el 45.7% (Raaperi *et al.*, 2014), mientras que Uruguay reporta el 37% en ganado productor de carne (Guarino *et al.*, 2008) y China el 35.8% (Houe & Meyling, 1991; Yan *et al.*, 2008). En cuanto a la prevalencia general de LEB en el continente americano, se estima entre el 10.4 y el 60.8% en hatos lecheros (Pulido *et al.*, 2017). En Japón la seroprevalencia alcanza el 69% en hatos cárnicos (More *et al.*, 2017). En el caso de PI3 y VRSB las estimaciones suelen realizarse de forma conjunta, con porcentajes de prevalencia entre el 40 a 100% para Suecia (Sacco *et al.*, 2014) y entre el 43 al 90% únicamente para VRSB, en corrales de engorda con brotes de infecciones respiratorias en Sudáfrica.

Los socios mercantiles más cercanos de México: Canadá y USA, a partir del año 2003 iniciaron con programas de monitoreo seroepidemiológico mediante muestreos masivos para realizar un diagnóstico situacional y la caracterización genética (Bartlett *et al.*, 2020), así como la

detección de animales persistentemente infectados (PI) para el caso de DVB (Ridpath, 2012). Lo anterior podría afectar los tratados comerciales que se tienen con ellos, en caso de no adoptar estrategias similares en nuestro país. Ejemplo de esto son los controles para tuberculosis, brucelosis y garrapata establecidos por los Estados Unidos, que han orillado a los Estados fronterizos de México a seguir los lineamientos pertinentes (NOM-041-ZOO-1995; DOF, 28-0-2015*; DOF, 10-09-2012**; DOF, 30-12-2022 ***y el requisito y protocolo de cuarentena para exportar ganado bovino), gracias a lo cual han podido exportar más de un millón de animales (SADER, 2020).

Normalmente se considera que las enfermedades endémicas pueden controlarse mediante el empleo de medidas preventivas básicas (DOF, 29-11-2018 ****). Sin embargo, gran parte de las medidas de prevención dependen de la vacunación estratégica y coordinada, una condición que parece ser limitada en México (SIVE, 14-06-2021 *****; Gómez-Romero *et al.*, 2021). Aunque, la implementación de programas de control representa una inversión para el país y para el productor, sin embargo, se estima que los beneficios superan a los costos.

La ausencia de datos epidemiológicos en el territorio nacional para las infecciones causadas por los virus de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB, condujo al propósito de este trabajo, para establecer un diagnóstico situacional que muestre la magnitud de la presencia de anticuerpos contra dichas enfermedades endémicas. Hipotetizamos que la prevalencia aparente de las cinco enfermedades se encontrará en rangos meso- a holoendémicos, debido a que según las investigaciones de Lassala *et al.* (2020) la vacunación en el ganado bovino mexicano para dichas enfermedades, no supera el 18% a nivel nacional. Aunado al hecho de que las vacunas utilizadas en México son formuladas con cepas de referencia de Estados Unidos de Norteamérica sin el conocimiento previo de las cepas circulantes en el territorio nacional (Gómez-Romero *et al.*, 2021), lo que puede no resultar idóneo para el control de las enfermedades en nuestro país. El primer objetivo fue, por lo tanto, desarrollar y validar un sistema diagnóstico múltiple, de alta eficiencia y de uso masivo,

* Acuerdo por el que se modifican y adicionan diversas disposiciones del similar por el que se establece la Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus spp.*

** Acuerdo por el que se establece la campaña nacional para el control de la garrapata *Boophilus spp.*

*** Acuerdo por el que se dan a conocer las Reglas de Operación del Programa de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, para el ejercicio fiscal 2023.

**** Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos.

***** Acuerdo mediante el cual se dan a conocer las medidas aplicables en materia de epidemiología y de vigilancia epidemiológica en animales terrestres y el uso de la información del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en los Estados Unidos Mexicanos.

aprovechando la plataforma xMAP de Luminex®, a fin de emplearlo como herramienta para generar datos epidemiológicos simultáneos de cinco enfermedades en el territorio mexicano. Se eligió la plataforma Luminex®, considerando sus características de uso de poca cantidad de muestra y la obtención de una gran cantidad de datos con menores tiempos de ensayo. Una vez establecida la prueba diagnóstica, el segundo objetivo fue determinar la seroprevalencia de las enfermedades a nivel nacional, y evaluar la correlación de estas, con factores como condiciones climatológicas y de producción, a fin de identificar los posibles factores de riesgo predisponentes para una mayor seropositividad.

La evaluación seroepidemiológica ilustra la necesidad de abordar estas enfermedades endémicas mediante un monitoreo activo, dada la alta prevalencia observada. A pesar de que nuestras muestras fueron recolectadas en 2011 y 2012, es importante señalar que no ha habido campañas nacionales significativas para controlar o erradicar las enfermedades examinadas desde esa fecha. Por tanto, podemos inferir que la prevalencia de estas enfermedades no ha disminuido y nuestros resultados podrían ser indicativos de la situación actual. Sin embargo, es esencial realizar estudios futuros para validar estos hallazgos.

Capítulo 1. Revisión de literatura

Papel de las nuevas técnicas de diagnóstico

Hasta el 2010, las pruebas de inmunodiagnóstico habían sido realizadas en formatos monoplex, es decir, la determinación de un solo agente etiológico a la vez. Sin duda alguna, dentro de estos ensayos serológicos, uno de los más ampliamente utilizados en los laboratorios, por su simplicidad, versatilidad, especificidad, precisión, sensibilidad y facilidad de realización ha sido desde los años 80's los ensayos de enzimoimmunoanálisis (ELISA) y sus variantes con uso de quimioluminiscencia (Chowdhury *et al.*, 2009). A pesar de lo anterior, los ensayos inmunoenzimáticos tienen las desventajas de requerir volúmenes de entre 50 a 200µl de muestra (Anderson *et al.*, 2011), emplear sustancias cancerígenas que requieren manejos cuidadosos y la eliminación adecuada de sus residuos (Grange *et al.*, 2014). De igual forma, al ser una técnica monoplex, la determinación de un solo analito a la vez incrementa los costos, hace poco eficiente el uso de muestras, y puede provocar el daño de la misma al someterla a repetidos ciclos de congelación-descongelación (Anderson *et al.*, 2011).

En contraste, la tendencia mundial de los últimos años ha sido el desarrollo de técnicas de detección múltiple, principalmente concebidas para mejoramiento de la eficiencia en el serodiagnóstico de enfermedades infecciosas (Bastarache *et al.*, 2011) con el desarrollo de métodos más ecológicos y seguros para los operadores.

Existen cuatro principales tecnologías de inmunodiagnóstico de tipo multiplex:

- El sistema **MesosScale Discovery** (MSD) es una técnica de detección electroquimioluminiscente que utiliza platos con electrodos fijos en el fondo del pozo. Cada electrodo está cubierto con un diferente anticuerpo de captura, permitiendo la detección de la concentración de cada analito en un electrodo particular, por medio de fotodetectores. La reacción antígeno-anticuerpo es evidenciada gracias a un segundo anticuerpo marcado con rutenio, el cual es carcinogénico y puede acumularse en los huesos (Chowdhury *et al.*, 2009; Bastarache *et al.*, 2011). Otra gran desventaja de este sistema es que se ha reportado que tiene una reproducibilidad limitada (Ravindran *et al.*, 2010).
- Las técnicas **Searchlight** y **FAST Quant** son plataformas que utilizan una placa negra de 96 pozos de fondo plano. Los diferentes anticuerpos de captura del ensayo se fijan al fondo del pozo dando la apariencia de un mosaico. La reacción inmunológica se detecta gracias a reactivos quimioluminiscentes que emiten intensidades acordes a la concentración relativa en cada sección específica para determinar la concentración de cada analito. Estos métodos tienen una elevada sensibilidad, pero tiene las desventajas de que requiere inmunorreactivos

de alta pureza y de que tiene baja confiabilidad y mucha variabilidad (Lash *et al.*, 2006; Cinquanta *et al.*, 2017).

- Por su parte, la tecnología **xMAP Luminex®** está basada en el uso de microesferas de poliestireno, de 5.6 µm de diámetro en su formato no magnético y de 6.45 µm en la versión magnética, que contienen en su interior una mezcla de dos fluoróforos que le confieren un código individual, llamado región. Por las combinaciones de dichos fluorocromos se han desarrollado hasta 100 diferentes regiones que le dan a cada esfera una identidad particular. Sobre la superficie de la esfera existen grupos carboxilo, a los que se les pueden acoplar antígenos o anticuerpos. La reacción antígeno-anticuerpo es evidenciada gracias al uso de la ficoeritrina (PE) (Anderson *et al.*, 2011; Angeloni *et al.*, 2022). El lector de este sistema funciona con el mismo principio que un citómetro de flujo, en el que un diodo láser emite una longitud de onda de 635 nm, la cual permitirá la identificación de la esfera y un segundo láser emite una luz a 523 nm, lo que excita al fluoróforo reportero PE (Graham *et al.*, 2019). Aunque la sensibilidad de esta técnica no es tan alta como la de los ensayos quimioluminiscentes, resulta ser más sensible que el sistema de ELISA (Bastarache *et al.*, 2011; Graham *et al.*, 2019). Adicionalmente, el Luminex® es altamente reproducible, lo cual hace posible que las determinaciones no requieran réplicas, lo que repercute en menores costos y tiempos de procesamiento. Además, y como ya se mencionó, esta es la única plataforma que no genera residuos contaminantes (Angeloni *et al.*, 2022).

Las técnicas de inmunodiagnóstico de uso masivo como el sistema múltiple de Luminex® tienen gran utilidad en los programas epidemiológicos ya que son la base del diagnóstico situacional para conocer la presencia de las enfermedades en ciertas zonas. Son el primer paso para establecer medidas de control o erradicación. Es así como algunos países europeos como Dinamarca, Noruega, Suecia, Islandia, Austria, Suiza, Alemania, Bélgica, Polonia, Irlanda y Escocia iniciaron con muestreos masivos como parte de sus acciones de control de la diarrea viral bovina (Berriatua *et al.*, 2005; Moennig & Becher, 2018); y algunos otros países como Australia comienzan a realizar actividades de revisión de su estado actual, con la finalidad de priorizar las enfermedades que se encuentran presentes en su territorio, con el propósito de poder tomar decisiones y establecer políticas y estrategias de manejo sobre sus enfermedades endémicas (Lane *et al.*, 2015). Esta tendencia de comenzar con diagnósticos situacionales obedece a razones comerciales, en las que, cada vez se establecerán mayores restricciones de movilización de animales o embriones positivos a enfermedades endémicas como la DVB y de igual forma se crearán nuevas legislaciones para restringir el comercio (Berriatua *et al.*, 2005).

En el continente americano, Estados Unidos de Norte América y Canadá han puesto en marcha estrategias para hacer diagnóstico seroepidemiológico, caracterización genética y detección de animales persistentemente infectados (PI); así mismo se han efectuado estimaciones de pérdidas económicas y se han establecido medidas de control voluntario (Gómez-Romero *et al.*, 2021).

Organismos internacionales y nacionales responsables de la vigilancia epidemiológica

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA antes OIE) es el referente sobre la normatividad internacional para ayudar a sus países miembro a hacer frente a 120 enfermedades que tienen el potencial de generar eventos epidemiológicos. México, como país miembro de la OMSA, tiene la responsabilidad de notificar la presencia de enfermedades, de monitorear las que se encuentran en su territorio, además de realizar actividades de control o erradicación (OIE, 2022). Para tal fin, publicó en 2018 un acuerdo en el que se establecieron 3 grupos de clasificación de las enfermedades, esto con el fin de priorizar las acciones de control, erradicación o monitoreo (DOF, 29-11-2018 *).

En el grupo uno se encuentran las enfermedades exóticas, es decir, aquellas que no tienen presencia en el territorio nacional, o que ya han sido erradicadas del país y que por su rápida diseminación pueden afectar a la población animal y que tienen un riesgo potencial de afectar notoriamente la salud pública. Son consideradas enfermedades de notificación inmediata obligatoria al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (DOF, 29-11-2018 *, SIVE, 14-06-2021 **).

El grupo dos está conformado por las enfermedades endémicas transmisibles que se encuentran en el país y que, debido a sus efectos negativos en la producción pecuaria, la salud pública, en el comercio internacional y por su importancia en acciones nacionales de sanidad animal, son consideradas de notificación inmediata obligatoria. Y en el grupo tres se encuentran las enfermedades endémicas, consideradas como de menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y para el comercio nacional e internacional, se

* Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos.

** Acuerdo mediante el cual se dan a conocer las medidas aplicables en materia de epidemiología y de vigilancia epidemiológica en animales terrestres y el uso de la información del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en los Estados Unidos Mexicanos.

consideran que pueden ser controlables a través de las buenas prácticas pecuarias, sin embargo, deben ser notificadas mensualmente de manera obligatoria (DOF, 29-11-2018*).

Existen otras dependencias internacionales como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), una agencia perteneciente a la Unión Europea, que asesora sobre los riesgos alimentarios existentes y emergentes que pueden afectar a la seguridad alimentaria, la salud animal y humana, que promueve la cooperación científica entre los países de la Comunidad Europea (CE), apoya las solicitudes para realizar la evaluación de riesgos, que ayuden con los temas relevantes que afecten a los estados miembro, así como promoción de los hallazgos mediante publicaciones científicas que proporcionan los métodos para alertar y detectar los problemas que afecten a la CE (EFSA, 2023).

En tanto que las dependencias nacionales la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) y su organismo desconcentrado del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, son las responsables de proteger la agricultura, acuicultura y ganadería de enfermedades y plagas de importancia, regulan, vigilan y certifican la gestión de riesgos en la salud y seguridad de los sistemas de producción de alimentos para garantizar su inocuidad, promoviendo la competitividad del sector agroalimentario en el ámbito internacional (SADER, 2023; SENASICA, 2023).

Situación de las enfermedades endémicas (DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB) en México y en el mundo

Algunas enfermedades de los bovinos como diarrea viral bovina, rinotraqueítis infecciosa bovina, leucosis enzoótica del bovino, enfermedad causada por el virus respiratorio sincitial bovino y parainfluenza tipo 3 pertenecen al grupo tres del acuerdo a lo publicado en el Diario Oficial de la Federación (DOF, 29-11-2018*). Pese a que se establece la notificación periódica obligatoria, actualmente en el SIVE no existen informes que evidencien el monitoreo activo eficiente.

El sistema internacional de información zoonosológica (WAHIS), interfase de información filial de la OMSA (antes OIE), reporta a estas afecciones como presentes en la mayoría de sus países miembros y les confiere el carácter de infecciones endémicas en la mayoría de los territorios miembros (WAHIS, 2020).

* Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos.

Los esfuerzos de diagnóstico para determinar los niveles de endemia de DVB, IBR, LEB, VRSB y PI3 en distintas regiones del mundo han sido limitados y se centran en análisis locales y con bajo número de muestras, que resultan en estimaciones poco reales, que limitan la implementación de programas para su control. Es por tanto necesario redirigir la estrategia hacia mejorar tanto las prácticas de manejo de los hatos, como el diagnóstico y la prevención (Zanella, 2016).

Con relación a la DVB, se observa una presencia constante en los hatos tal como lo muestran los datos reportados en Perú, en los que se llegan a informar prevalencias de hasta del 96% (Ståhl *et al.*, 2002), de 57% en EUA y 90% en Brasil, estos dos últimos países son los principales exportadores de carne a nivel mundial (Almeida *et al.*, 2013) (Cuadro 1). En México, existen muy pocos informes donde se informe la seropositividad a DVB, se han establecido prevalencias entre el 21.1% y el 76.2%. Sin embargo, la seropositividad proviene de trabajos con un pequeño número de hatos y animales estudiados, en limitados estados de la república (Sánchez & Rodríguez, 2012) (Cuadro 2). Para el caso de IBR, el diagnóstico de la seroprevalencia no es muy diferente, se han descrito niveles mundiales entre el 8.8% y 70.4% (Espinosa, 2019) (Cuadro 1). En México, los porcentajes oscilan entre el 34 y el 91.1% (Abad *et al.*, 2008; Ríos *et al.*, 2018) (Cuadro 2). La prevalencia de leucosis en el continente americano se estima entre el 10.4 y el 60.8%, de 0.08% en Europa (Pulido *et al.*, 2017) (Cuadro 1) y en México de hasta el 44.8% (Suzan *et al.*, 1983; Monroy *et al.*, 1987) (Cuadro 2). Existen pocos reportes en relación a la prevalencia de VRSB, pero se menciona que tienen una alta variabilidad, dependiente de la localización de los hatos, de la edad de los animales y de la densidad poblacional en las granjas. Los niveles de prevalencia de VRSB a nivel mundial oscilan entre el 40 y el 100% (Sacco *et al.*, 2014) (Cuadro 1); mientras que en México se sitúan entre el 52% y el 90.8% (Sarmiento-Silva *et al.*, 2012) (Cuadro 2). El VRSB se considera la principal causa de enfermedad respiratoria en los hatos a nivel mundial. Por último, la presencia de PI3 en los hatos a nivel mundial presenta prevalencias entre el 50 y el 90% (CABI, 2021) (Cuadro 1), llegando a alcanzar porcentajes de 55.9% en algunas zonas de México (Alvarado & Hernández, 2015) (Cuadro 2).

La alta variabilidad que se observa en las prevalencias de las cinco enfermedades mencionadas, el número limitado de reportes, la baja cobertura de los estudios y el reducido número de animales implicados en las evaluaciones de seropositividad, indican fallas en la caracterización y manejo de dichas infecciones, especialmente en México. Por ello, es necesario aportar herramientas que posibiliten la ejecución de un monitoreo más integral del estado sanitario del hato bovino nacional, para proponer estrategias de control exitosas, como las llevadas a cabo por varios países europeos para la erradicación de IBR, LEB o DVB (WAHIS, 2020).

Cuadro 1. Reportes de seroprevalencias estimadas de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB en diversos países

Enfermedad	País/Región	Seroprevalencia (%)	Referencia
DVB	India	12 a 65	Kumar, 2018
	Perú	96	Ståhl <i>et al.</i> , 2002
	EUA	57	Almeida <i>et al.</i> , 2013
	Brasil	20 a 90	Almeida <i>et al.</i> , 2013
	Bélgica	47.7	Sarrazin, 2013
	Irlanda	98.7	Cowlwy, 2012
	México	21.1 a 76.1	Sánchez & Rodríguez, 2012
IBR	Mundo	8.8 a 70.4	Espinosa, 2019
	México	34 a 91.1	Abad-Zavaleta <i>et al.</i> , 2016; Rosete <i>et al.</i> , 2018
LEB	América Latina	10.4 a 60.8	Pulido <i>et al.</i> , 2017
	Europa	0.08	Pulido <i>et al.</i> , 2017
	México	9.83 a 44.8	Suzan <i>et al.</i> , 1983; Monroy <i>et al.</i> , 1987
VRSB	Mundo	40 a 100	Sacco <i>et al.</i> , 2014
	México	52 a 90.8	Sarmiento-Silva <i>et al.</i> , 2012
PI3	Mundo	50 a 90	CABI, 2021
	México	55.9	Alvarado & Hernández, 2015

Cuadro 2. Reportes de prevalencias de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB en estudios nacionales

Enfermedad	Reportes de prevalencia (%)	Estado	n (animales/hatos/Municipios)	Referencia
DVB	41.23 - 50.67	Veracruz	140 animales (7 hatos)	Abad Zavaleta <i>et al.</i> , 2016
	31.4- 51.4	Puebla	401 animales (24 hatos)	Rosete <i>et al.</i> , 2018
	49.7- 54.6	Tabasco	401 animales (24 hatos)	Rosete <i>et al.</i> , 2018
	76.2	Veracruz	401 animales (24 hatos)	Rosete <i>et al.</i> , 2018
	56.5 - 73.4	2 Estados	132 animales	Suzan <i>et al.</i> , 1983
	69 – 98	10 Estados	4487 animales (182 hatos)	Milián-Suazo <i>et al.</i> , 2016
IBR	34 - 41.2	Puebla	10 hatos, 5 Mpios.	Ríos <i>et al.</i> , 2018
	83.1 - 91.1	Tabasco	4 hatos, 2 Mpios.	Ríos <i>et al.</i> , 2018
	50.6 - 79.9	Veracruz	359 animales (6 hatos) 3 Mpios.	Abad Zavaleta <i>et al.</i> , 2016
	76.32	Veracruz	140 animales (7 hatos)	De La Trinidad, 2010
	33 - 79.2	9 Estados	277 animales	Suzan <i>et al.</i> , 1983
	57 – 83	10 Estados	4487 animales (182 hatos)	Milián-Suazo <i>et al.</i> , 2016
VRSB	52 - 90.8	No mencionado	No mencionado	Sarmiento-Silva <i>et al.</i> , 2012
PI3	55.9	Cuencas lecheras	2488 animales	Alvarado & Hernández, 2015
	54.5	12 Estados	286 animales	Suzan <i>et al.</i> , 1983
LEB	9.83	Yucatán	83 animales	Monroy <i>et al.</i> , 1987
	13.3 - 44.8	9 Estados	1498 animales	Suzan <i>et al.</i> , 1983
	57.8/66	No mencionado	No mencionado	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2020

Pérdidas económicas

Las enfermedades endémicas tienen su mayor impacto en las cualidades productivas y económicas de los hatos, así pues, se han estimado pérdidas económicas de \$509 dólares por vaca infectada con IBR que resulta en aborto y de \$379 dólares por concepto de infección (Can *et al.*, 2016). De igual forma, en Brasil se analizaron las pérdidas causadas por IBR calcularon pérdidas financieras de US\$48 402 244 dólares por año, con un estimado de 258 779 abortos por año (Silva *et al.*, 2021).

Para DVB se calculan pérdidas por \$80 millones de dólares por año en Estados Unidos de Norte América, considerando los costos por tratamientos, infertilidad, mortalidad embrionaria y mortandad. En ese mismo país, se han considerado pérdidas de \$640 millones de dólares anuales por concepto de enfermedades respiratorias (Bowland & Shewen, 2000), mientras que en el caso de leucosis ascienden a más de \$6 400 dólares por cada 100 vacas en lactación, en hatos con prevalencias de 50%, también hay cálculos realizados por el decremento en la producción láctea y pérdidas generales por más de \$7 millones de dólares (Erskine & Sordillo, 2009). En México, un estudio hecho en 2018 estimaba pérdidas generales de más de \$1 000 000 de pesos por concepto de pérdidas en producción, gasto en diagnóstico, ampliación de días abiertos y pérdida de gestaciones (Montaño, 2018). Las restricciones comerciales y los gastos por atención a animales enfermos por PI3 son de unos \$1 680 dólares por tratamientos veterinarios (Betancur *et al.*, 2010). Mientras que para VRSB suelen ser más altas las pérdidas, consideradas hasta por \$1000 millones de dólares anuales, por efecto de vacunación y tratamiento de las afecciones respiratorias (Sacco *et al.*, 2014).

Además del impacto económico estas enfermedades tienen la característica de ser consideradas como endémicas, (Cruz & Camargo, 2001). El nivel de endemia se clasifica como holoendemia cuando la población afectada supera el 75% de prevalencia, hiperendemia si se encuentra entre el 50 al 75%, mesoendemia cuando se afecta entre el 10 al 50% e hipoendemia cuando la prevalencia es menor al 10% (Cruz & Camargo, 2001; Hay *et al.*, 2004; González, 2020).

En Estados Unidos de Norte América se calculan pérdidas para DVB por \$80 millones de dólares por año por concepto de costos por tratamientos, infertilidad, mortalidad embrionaria y mortandad. En el caso de leucosis, las pérdidas causadas por el decremento en la producción láctea asciende a más de \$6 400 dólares por cada 100 vacas en lactación (Erskine & Sordillo, 2009) y pérdidas generales por más de \$7 millones de dólares en hatos con prevalencias de 50% (Erskine & Sordillo, 2009). Y para PI3, las restricciones comerciales y los gastos por atención a animales enfermos ascienden a cerca de \$1680 dólares (Betancur *et al.*, 2010) y de hasta \$1000 millones de

dólares anuales, por efecto de vacunación y tratamiento de las afecciones respiratorias incluidas PI3 y VRSB (Sacco *et al.*, 2014).

Características de las enfermedades

DIARREA VIRAL BOVINA (DVB)

La DVB es una enfermedad que tiene la capacidad de infectar al ganado bovino de todas las edades, sin embargo afecta especialmente a animales jóvenes, en vacas lactantes afecta la producción y la reproducción, puede producir abortos, reabsorciones fetales, momificaciones, malformaciones, lesiones en el sistema nervioso central y muerte perinatal (Houe, 1999). Al tener una distribución mundial la posiciona como una enfermedad de gran impacto económico, sin embargo, en la actualidad ha habido esfuerzos por algunos gobiernos para erradicarla (OIE, 2018a). Diversos estudios seroepidemiológicos reportan prevalencias que oscilan entre 14.6% a un 98.7% (Bosco *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2021); porcentajes de animales persistentemente infectados de 0.5 al 2% (Torres, 2020). En tanto que en México se ha reportado prevalencias de 21.1% (Sánchez, 2010) hasta 98% (Milián-Suazo *et al.*, 2016).

La enfermedad causa considerables pérdidas económicas en ganado por mermas en la producción láctea o en la producción cárnica, inicialmente puede presentar cuadros clínicos digestivos y respiratorios, posteriormente puede afectar la actividad reproductiva, causando un mayor número de abortos, mayor mortalidad embrionaria, se pueden observar malformaciones o momificaciones fetales, becerros hidrocefálicos y mayor cantidad de vacas repetidoras de estros. Adicionalmente, la inmunosupresión causada por la infección viral puede favorecer infecciones concomitantes (Trigo, 1987; Youngquist & Threlfall, 1997; Rondón, 2006; OIE, 2018a).

Dependiendo del genoma de DVB, biotipo viral, susceptibilidad y ciertas características del individuo, se pueden presentar cuadros clínicos diversos, que pueden variar en severidad, causando desde presentaciones asintomáticas o subclínicas, pasando por la forma clínica fatal de enfermedad de las mucosas o causando efectos deletéreos sobre el feto (Rondón, 2006; OIE, 2018a). Otra característica, es que los animales que sobreviven a la infección intrauterina durante el primer trimestre de gestación quedan como animales denominados como persistentemente infectados (PI), constituyendo el principal reservorio del virus dentro de las poblaciones, se sabe que estos animales

pueden excretar grandes cantidades de virus en orina, heces, secreciones nasales en forma de aerosoles, leche (Houe, 1999) y semen (OIE, 2018a).

Estructura de los viriones

El virus de la DVB pertenece al género *Pestivirus*, de simetría icosaédrica, mide 40 a 60 nm de diámetro, tiene una cápside proteica rodeada por una envoltura de fosfolípidos adquiridos de su hospedador (Figura 1), además esta capa contiene glicoproteínas que son de gran ayuda durante el proceso de infección ya que son proteínas que interactúan con la célula infectada.

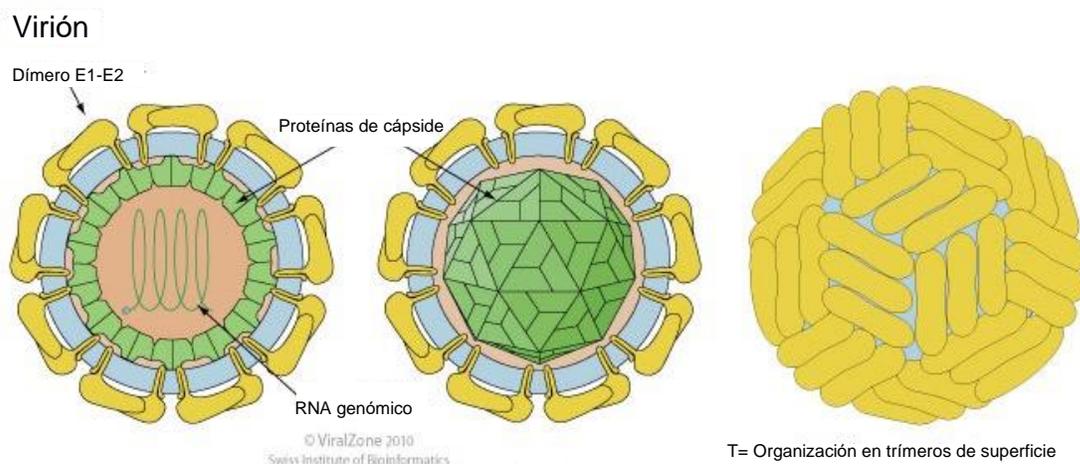


Figura 1. Esquema estructural del virión de la DVB (Tomado y modificado de ViralZone, 2010).

Genoma viral

El virus de la diarrea bovina, es ARN monocatenario de sentido positivo, género *Pestivirus*, familia *Flaviviridae* y orden *Amarillovirales*. La enfermedad se relaciona antigénica y genéticamente con el virus de la enfermedad de las fronteras de ovinos y la peste porcina clásica (PPC) (Rondón, 2006). Esta capacidad de los *Pestivirus* para poder cruzar barreras de especie, es decir que pueden infectar a otras especies diferentes del orden *Artiodactyla*, es una causa de interferencia en el diagnóstico serológico al intentar diagnosticar PPC cuando en realidad se están detectando anticuerpos contra el virus de DVB. En el caso de zoonosis se tiene poca evidencia que demuestre que existen infecciones humanas de carácter diarreico de pestivirus que estén serológicamente relacionado con el virus de la DVB (Rivera, 2008).

El genoma de los flavivirus es una molécula de cerca de 10.5 Kilobases (Kb), con aproximadamente 4000 aminoácidos, sus proteínas estructurales generalmente se codifican en el extremo 5', es el extremo considerado más relevante con secuencias altamente conservadas en los

pestivirus y en el otro extremo 3' se codifican las proteínas no estructurales (Can *et al.*, 2016) (Figura 2).

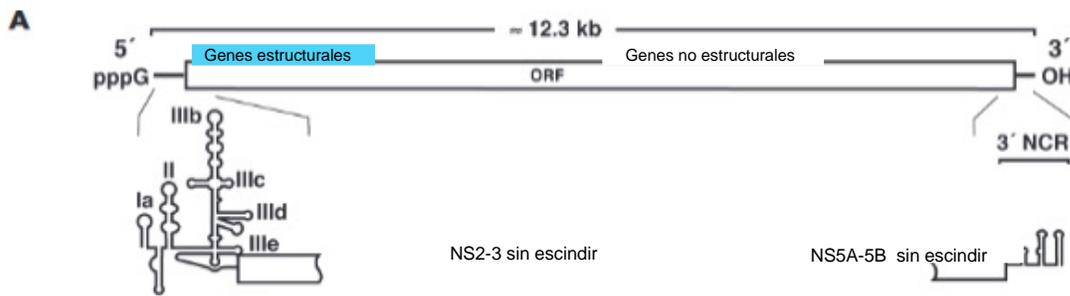


Figura 2. Mapa genómico del virus de la DVB (Tomado y modificado de Lindenbach, 2007).

La poliproteína es co y post-traduccionalmente procesada por endoproteasas virales y celulares dando lugar a entre 11 y 12 proteínas que pueden ser estructurales o no estructurales (Torres, 2020), se muestra un breve resumen de las más importantes en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Resumen de las principales proteínas virales de flavivirus

Proteína	Características	Actividad	Inmunogenicidad
Estructurales			
Npro	Autoproteasa Autocatálisis postraducciona para liberarse de la cápside	Bloquea actividad de IRF-3, esencial para activar el promotor IFN- λ 1 Bloquea interferón	
Proteína C	Proteína de cápside 14 KDa Procesada por Npro en su extremo amino terminal antes del ensamblaje del virión	Empaqueta RNA genómico viral Favorece envoltura del virión	No actividad inmunogénica alta No se forman anticuerpos contra proteína C
Emns	E0 = envoltura 48 KDa Procesada por peptidasa señal de célula hospedera Secretada por exocitosis	Actividad ribonucleasa extracelular Desconocida. No se conoce mucho su función	
E1	Glicoproteína de envoltura	Anclaje a membrana celular de célula huésped	No anticuerpos neutralizantes
E2	Glicoproteína 41 a 48 KDa 370 aa ectodominio N terminal y C terminal (30 aa funcionan anclaje a célula hospedera)	En conjunto con E1 forma un complejo que permite la entrada de viriones a la célula hospedera Heterodímero importante para infectividad	Alta producción de anticuerpos neutralizantes
No estructurales			
P7	Pequeña proteína hidrofóbica 6 a 7 KDa	Forma complejo E2-p7 necesario para infectividad en cultivos celulares Funciones desconocidas se atribuye acción para facilitar liberación de viriones Interactúa con proteínas de cápside para el proceso de gemación	
NS2-3	Altamente conservada Eficiencia regulada por chaperona NS2 Cistein proteasa, hidrofoba de tamaño variable 14 KDa NS3 Nterminal serin proteasa C terminal actúa como helicasa y ATPasa	Necesaria para replicación viral Actividad en replicación viral de pestivirus Se le atribuyen los efectos de la citopatogenicidad viral	No inmunogénica Alta actividad inmunogénica
NS4A	Proteína hidrofoba	Cofactor para actividad proteolítica NS3 Necesaria para corte NS4B/NS5A	No inmunogénica
NS4B	Proteína hidrofoba	Necesaria para corte NS4A/NS5B Replicación Cambio de patogénesis viral	No inmunogénica
NS5A	Proteínas hidrofílicas Altamente variables	Importante para replicación de proteína Eef1a (factor 1 traduccional de elongación)	
NS5B	Proteínas hidrofílicas Altamente variables	Polimerasa dependiente de RNA Ensamblaje de proteínas no estructurales, complejos funcionales de replicación y síntesis de RNA viral	

Modificado de Lindenbach, 2007 y López, 2014.

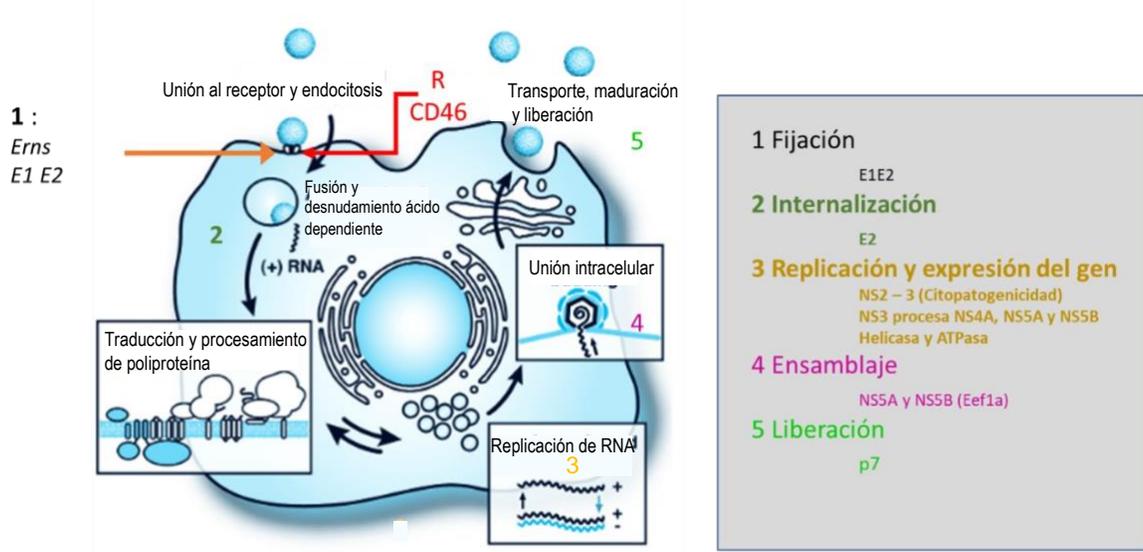


Figura 3. Ciclo de replicación viral de DVB y liberación de viriones (Modificado de Lindebach, 2007).

Existen dos biotipos del virus de la DVB diferenciables por sus características en cultivos celulares y por el reordenamiento genómico del gen no estructural p125/p80, el biotipo citopatogénico (CP) y el no citopatogénico (NCP) (Rivera, 2008; Rondón, 2006) donde en unos no se obtiene el efecto visible en células (NCP) y en otros se producen efectos visibles (CP) en forma de vacuolización citoplasmática mediante un mecanismo piroptótico (Rondón, 2006).

Se han encontrado 2 genotipos basados en su secuencia genética DVB-I (pestivirus A) y DVB-II (pestivirus B) (Murphy *et al.*, 1999; Becher *et al.*, 2003; Rondón, 2006), y se ha postulado como un tercer genotipo a los virus “HoBi-like” (pestivirus H) se han descrito un mínimo de 9 pestivirus atípicos que son patógenos virales de bovino que produce una enfermedad similar a las infecciones causadas por DVB-I y DVB-II y se desconoce si estos pestivirus atípicos han emergido de *novo*, o si siempre han existido en el ganado (Schirrmeier *et al.*, 2004; Ståhl *et al.*, 2007; Ståhl *et al.*, 2010). Actualmente el grupo de virus “HoBi-like” ha sido detectado en Sudamérica, Europa y Asia, no existen reportes concretos que demuestren su presencia o ausencia en Norteamérica (Ridpath, 2012; Torres, 2020).

Patogenia

Las presentaciones clínicas dependen del genotipo viral y del biotipo viral que afecte a los individuos, características del hospedero y susceptibilidad. Se han propuesto cuatro presentaciones principales: la infección aguda, infección intrauterina, infección persistente y enfermedad de las mucosas (Rondón, 2006; Torres, 2020).

El virus puede ingresar al organismo del animal vía aerosoles o secreciones al estar en contacto las mucosas de boca o la nariz, los viriones tienen tropismo por las células de actividad mitótica considerable, como las células epiteliales de las criptas (predilección por tonsilas palatinas) o en linfocitos, monocitos o macrófagos donde se replican con facilidad. Se menciona que el biotipo CP puede replicarse preferentemente en la mucosa nasal en títulos más altos que el biotipo NCP, resultando este hecho en una eficiente diseminación en animales susceptibles (Rondón, 2006).

La replicación viral inicia con la fusión de la envoltura viral (membrana endosomal - dependiente de pH) con la membrana plasmática y penetración en la célula, al parecer por endocitosis mediada por un receptor celular específico de superficie (CD46) y con ayuda de la proteína de envoltura E2 (Lindenbach, 2007) (Figura 3).

Infección aguda

Se estima que un 70 a 90% de los animales cursa esta infección de manera imperceptible, siendo especialmente susceptibles los animales jóvenes de entre 6 y 24 meses de edad. Es causada en su mayoría, por virus de la DVB no citopático. Afecta el sistema respiratorio y digestivo, resultado en la difusión activa del virus y es común que ocurran infecciones secundarias. Se ha mencionado que el subtipo I b y d (virus DVB genotipo I subtipos b y d) inducen enfermedad respiratoria primaria severa y se le atribuye un efecto de sinergia con el virus sincitial respiratorio bovino (VRSB) (Fulton *et al.*, 2002; Rondón, 2006), sin embargo Alkheraif en 2018 hipotetizó que el virus de DVB-2 puede aumentar la virulencia y modular la respuesta inmune, causando el aumento de la replicación de VRSB y coinfectando con DVB. En el caso de manifestarse clínicamente, se observa una ligera depresión, fiebre y leucopenia transitoria que se refleja en inmunosupresión, acompañada de viremia durante la primera semana post infección, en ocasiones se presentan cuadros digestivos y respiratorios leves. Los individuos adquieren esta infección comúnmente de forma horizontal y la fuente de infección son los animales PI (Torres, 2020).

Infección intrauterina

La transmisión de DVB en vacas seronegativas que reciben semen contaminado proveniente de toros PI seroconvierten quince días después de la inseminación o monta. Los toros con infecciones agudas eliminan los virus en el semen posterior al periodo de viremia, como consecuencia de la replicación local en vesículas seminales y próstata. Esta infección puede producir ooforitis prolongada, lo que conlleva a una disfunción ovárica y, por ende, repercute en alteración del medioambiente uterino durante la fecundación, con la consecuente afección directa de los gametos, puede incrementar el intervalo entre ciclos ovulatorios, afecta directamente la

esteroidogénesis de los folículos preovulatorios y una consecuente supresión del pico de LH y aumento del nivel de cortisol (Ramírez *et al.*, 1999).

En cuanto al embrión bovino, se sabe que es susceptible a infección con el virus de la DVB posterior a las 2 semanas de incubación cuando ocurre la emergencia desde la zona pelúcida, esto es porque la zona pelúcida (ZP) actúa como barrera física para impedir que los ovocitos sean infectados por los virus, sin embargo, dicha estructura no garantiza que los ovocitos se encuentren libres del virus, pues se han propuesto dos rutas de acceso al ovocito, una a través del acceso a la reserva de folículos primordiales, pues allí el ovocito es metabólicamente activo y no ha completado la deposición glicoproteica requerida para formar la zona pelúcida. La segunda ruta es a través de las células del cumulus, susceptibles a infección, aunado a que el tamaño de los poros de la ZP permite la entrada del 96% de los virus de DVB (40-60nm) y el *Herpesvirus bovino tipo-1* (180-200nm) y probablemente comienza a ser susceptible a la infección después de la implantación a los días 19-20 post-concepción y/o al desarrollo de cotiledones fetales alrededor del día 30 (Rondón, 2006).

Malformaciones

El virus de la DVB es capaz de cruzar la placenta, así como la barrera hematoencefálica fetal, produciendo diversas lesiones en el sistema nervioso central (principalmente cerebelo); la severidad en las lesiones observadas se incrementa conforme aumenta la edad del feto en el momento de la infección. Se han reportado deformaciones esqueléticas en miembros posteriores, o anteriores doblados, mandíbulas con braquignatismo, alopecia y anomalías en las cabezas (Rondón, 2006; Zárate *et.al.*, 2022).

La patogenicidad puede corresponder al proceso descrito en el año de 1991 para la enfermedad de la frontera que ocurre en ovinos. Determinando que se afecta la glándula tiroidea fetal que resulta en niveles hormonales bajos de T3 (triyodotironina) y T4 (tiroxina); dicha deficiencia afecta, adversamente, la concentración de una enzima esencial para la mielinización, la 2', 3'-nucleótido cíclico -3'-fosfodiesterasa, que afecta los procesos en los oligodendrocitos (Rondón, 2006).

Patogénesis de la enfermedad de las mucosas (EM)

En los bovinos la EM se presenta cuando los animales PI son superinfectados con una cepa NCP y una cepa CP de origen exógeno o producto de cambios genéticos o producto de la recombinación del ARN de las cepas NCP residentes a través de la inserción de secuencias

celulares o reordenamientos genómicos, esto ocurre en animales de 6 a 24 meses de edad en una forma esporádica. Es una condición mortal generalmente de presentación aguda con un cuadro clínico caracterizado por diarreas sanguinolentas, fiebres, ulceraciones orales y la muerte a las 2 o 3 semanas posteriores a la manifestación de signos. Las lesiones encontradas a la necropsia van desde úlceras en mucosas del esófago, rumen, abomaso, intestino delgado y grueso, depleción de bazo, linfonodos y timo (Rondón, 2006; Torres, 2020).

Animales persistentemente infectados (PI)

La infección fetal con el virus de la DVB NCP durante el primer trimestre de gestación, puede resultar en el nacimiento de ganado inmunotolerante a la DVB con una infección persistente inaparente; esto ocurre debido a que antes del día 125 de la preñez, el sistema inmune fetal no ha madurado y por lo cual no reconoce al virus como un agente extraño y a que la mayor expansión de órganos linfoides fetales y las poblaciones leucocitarias ocurren en el tercer trimestre de gestación. Solo el biotipo NCP ha sido reportado capaz de establecer una infección persistente en el feto. Se ha sugerido que la capacidad del virus de la DVB NCP y del virus DVB CP para establecer la infección persistente se debe a las diferencias en la habilidad de inducir interferón (IFN) (Rondón, 2006). Estos animales constituyen una fuente importante de infección vertical y horizontal ya que los persistentemente infectados presentan altos títulos virales en la mayoría de los tejidos, por lo que el virus estará presente en todos los fluidos y secreciones del animal como la saliva, orina, semen, leche y calostro (OIE, 2018a).

Inmunopatología

Se conoce que un aspecto importante de la infección del virus DVB es la afinidad del virus por el sistema inmunológico, es por ello que la inmunosupresión es una de sus características principales. El virus parece inducir respuestas mediadas por células T y B; existiendo una distinción entre respuestas humorales y mediadas por células, lo que sugiere la existencia de subpoblaciones de linfocitos T ayudadores 1 (Th1) y Th2 en la regulación de la respuesta inmune específica dirigida contra el virus de la DVB. Esto puede deberse a la alteración de la función de las células presentadoras de antígeno (APC: antigen presenting cells), lo que conduce a una capacidad reducida de la habilidad para estimular respuestas de las células T (Rondón, 2006).

Estudios *in vitro* con el virus de DVB, han demostrado que la infección de monocitos o macrófagos causa la síntesis de citoquinas que pueden ser responsables de la reducida habilidad para estimular respuestas de células T a antígenos específicos y mitógenos; por tanto, es posible

que la inmunotolerancia al virus sea una consecuencia de la infección de las células APC (Rondón, 2006).

Se ha demostrado que el biotipo NCP induce una respuesta primaria de anticuerpos significativamente más rápida y superior que su biotipo homólogo CP, indicando que la respuesta de anticuerpos es dependiente del biotipo de la cepa involucrada. De igual forma, se ha especulado que el biotipo puede jugar un papel importante en el tropismo y en la distribución del virus en los tejidos durante el curso de la infección, de tal suerte que se ha sugerido que el biotipo CP está restringido al tejido linfoide asociado al intestino, mientras el NCP se distribuye en el tracto respiratorio, células sanguíneas y órganos asociados con el tejido hematopoyético y que tales diferencias se limitan a mecanismos regulatorios similares a los ejercidos por las células Th1 y Th2 (Rondón, 2006).

La inmunización con vacunas de virus activos o inactivados desencadena la producción de anticuerpos contra numerosas proteínas virales, relacionando algunas proteínas como inmunodominantes (E2 y NS3). Se podría hipotetizar que las diferencias en el modo de interacción de los biotipos del VDVB con las células del hospedero, independiente del tropismo tisular, son el origen de la variación en la frecuencia de células que respondan específicamente a la proteína NS3, esto aunado a que los mecanismos de defensa son efectivos contra el biotipo CP y no contra el NCP. Las otras glicoproteínas, E1 y ERNS, no desencadenan la producción de anticuerpos que neutralicen eficientemente el virus (Rondón, 2006).

Control

No existen tratamientos específicos y totalmente exitosos para el abordaje de la infección, así que los mecanismos de control radican en realizar estudios de monitoreo constantes de la seropositividad de animales (Houe, 1999), para segregar a las hembras gestantes y reunir las con otros animales sanos con la finalidad de evitar el contacto con el virus entre los 125 y 150 días de gestación, limitar la diseminación vertical es importante por lo que estos animales deberán ser detectados y en la medida de lo posible, eliminados. Sin embargo, la detección de estos animales se deberá realizar por medio de pruebas moleculares o serológicas, la captura de antígeno, para detectar los PI (Houe, 1999; Weinstock *et al.*, 2001; Espinosa, 2019). De la misma forma es necesario hacer un estudio de detección de DVB antes del transporte de los animales, e incluso se recomienda vacunarlos para evitar que se enfermen en el trayecto, evitar factores de riesgo a través de instauración de medidas de bioseguridad que permitan evitar el ingreso del virus al hato como establecimiento de cuarentenas, comercio de animales vivos sin historial médico, el transporte de

animales a ferias, malas prácticas de higiene, el tránsito de trabajadores en varios hatos donde se desconoce el estado de salud de los animales y evitar el comercio de embriones importados (Houe, 1999; Espinosa, 2019). No atender las medidas anteriores podría ser un factor que perpetúe la presencia de las infecciones en los hatos.

Se deben evitar fuentes de infección de algunos biológicos que pueden contener al virus, como es el caso del suero fetal bovino o semen; de igual forma se deben evitar los huéspedes intermediarios (principalmente fauna silvestre), que entren en contacto con los animales que se tienen en la unidad de producción (Espinosa, 2019; Torres, 2020).

La vacunación es la primera medida para controlar las pérdidas reproductivas causadas por virus; con este método se busca lograr varios objetivos, como son:

- 1) Prevenir las enfermedades agudas
- 2) Prevenir las enfermedades reproductivas
- 3) Prevenir la presencia de animales PI

En México existen vacunas de virus activo e inactivo. La mayoría de estas vacunas contienen virus citopático y no citopático de los genotipos I y II. Sin embargo, dado que los laboratorios no especifican las cepas empleadas en la elaboración de las vacunas, existe la posibilidad de recombinación entre cepas vacunales y cepas de campo lo que supone un riesgo continuo de infección en los animales (Torres, 2020).

Pruebas diagnósticas de DVB

Una de las principales herramientas para el control de la enfermedad reside en el monitoreo y detección de animales positivos, esto con el objetivo de generar programas de manejo de los hatos más efectivos, ya sea para detectar casos individuales de animales infectados o para reportar la prevalencia en un hato o región, es de importancia el poder detectar los antígenos virales, el genoma viral o a los anticuerpos específicos, lo cual dependerá de la técnica diagnóstica empleada.

Algunas de las técnicas autorizadas para el diagnóstico son el aislamiento viral, la detección de antígeno (que incluye el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (OIE, 2018c), la inmunohistoquímica [IHC]), la hibridación *in situ* y la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa (RT-PCR). Estas técnicas son implementadas en su mayoría de manera individual pero también se pueden utilizar como métodos de monitoreo del hato, utilizando mezclas de sueros en formas de *pools*, que contengan una muestra representativa de los animales para identificar si

están o no infectados. Como ejemplo está la utilización de muestras de leche de 50 animales para detectar la presencia de anticuerpos contra el virus mediante inmunoensayos (Houe, 1999; OIE, 2018c).

La prueba de referencia es el aislamiento viral en cultivos celulares, por ser 100% específica y relativamente sensible (OIE, 2018c). Consiste en la replicación e identificación del virus a partir de muestras de individuos que son sospechosos a la infección, previamente asegurando que los reactivos utilizados estén libres de virus o de anticuerpos neutralizantes, para ello se puede utilizar la inactivación de los reactivos por irradiación gamma (Goyal & Ridpath, 2008; OIE, 2023). La técnica diagnóstica es costosa, además de que se requieren varios días o semanas para la obtención de resultados.

La detección de antígenos virales en muestras de tejidos se realiza mediante el empleo de anticuerpos monoclonales o policlonales conjugados y por medio de la técnica de inmunohistoquímica, tiene un valor diagnóstico especial por la utilidad de identificar a los animales PI o para aquellos que cursan cuadros clínicos agudos. La obtención de muestras de piel y muescas de oreja resulta ser práctica para evaluar y diagnosticar animales vivos. La prueba tiene una especificidad y sensibilidad de 97% (OIE, 2018c).

Sus desventajas radican principalmente en el tiempo y costo por el uso de múltiples reactivos y de anticuerpos altamente específicos contra antígenos virales (Carlier & Santos, 2008).

Los inmunoensayos tipo ELISA son útiles para la detección de anticuerpos o de antígenos, algunas pruebas comerciales utilizan anticuerpos de captura dirigidos contra la proteína no estructural NS2-3 altamente conservada en las cepas de DVB (Sandvik, 1999). Las muestras de suero pueden ser utilizadas en la detección de antígenos, sin embargo, en los animales PI o en los que tienen cuadros clínicos agudos son difícilmente detectados, ya que en estos animales la viremia persiste en sangre por un periodo corto de tiempo (Goyal & Ridpath, 2008), este tipo de ensayos reportan una alta sensibilidad y especificidad de 97,9% y 99.7% respectivamente (Lértora, 2003).

La presencia de RNA viral se puede detectar por medio de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa (RT-PCR), es un método de alta sensibilidad, y pueden emplearse muestras de plasma o leche de manera individual o bien a partir de un conjunto de muestras (López, 2014).

Pruebas diagnósticas indirectas

Seroneutralización: identifica la capacidad de los anticuerpos presentes en el suero para inhibir o neutralizar el efecto de una determinada cepa. El suero problema se diluye de forma seriada y se incuba con virus citopático, posteriormente se adicionan células susceptibles de bovino y se

incubación durante 4 días. Es una prueba sensible y específica, pero no detecta bajas tasas de anticuerpos como en el caso de animales virémicos inmunocompetentes. Algunos inconvenientes son el alto costo relacionado con el mantenimiento de cultivos celulares, así como la adquisición de medios de enriquecimiento (Sandvik, 1999; Marini, 2008). La demora en la obtención de los resultados y la preparación de stocks virales que en general son de bajo título, son otros de los inconvenientes que presenta esta prueba (Marzocca, 2003).

Análisis inmunoenzimático indirecto: también conocido como ELISA indirecto, se basa en la detección de los anticuerpos presentes en muestras séricas a través de la fijación de antígeno a una fase sólida (Crowther, 2001), este capta los anticuerpos específicos presentes en el suero problema, posteriormente se detecta la presencia de estos complejos antígeno-anticuerpo a través de un segundo anticuerpo (anti-Ig) específico de especie, unido a una enzima que al reaccionar con su sustrato que es cromogénico (Sandvik, 1999) desencadena una reacción que emite una coloración, la reacción enzimática es frenada e interpretada cuantitativamente por espectrofotometría. Es un método versátil, simple, sensible y cuantificable (Crowther, 2001), facilita el análisis de grandes poblaciones, los resultados son confiables y se obtienen en pocas horas, este sistema suele encontrarse de forma comercial, siendo IDEXX®BVDV p80yBio-XDiagnostics (BIO K 004) un ejemplo de ellos. Las muestras empleadas pueden ser suero o leche (Sandvik, 1999; Lértora, 2003). La especificidad de este sistema está dada por la elección del antígeno viral, mismo que puede tratarse de la partícula viral purificada, extractos de cultivos celulares infectados con DVB o proteínas recombinantes. En general el método inmunoenzimático ELISA indirecto presenta una alta especificidad diagnóstica de 99.7% y una sensibilidad diagnóstica de 97.9% (Vizcaíno-Salazar, 2017). Una de las limitantes de este método consiste en la imposibilidad de diagnosticar animales persistentemente infectados, al igual que el resto de las pruebas que emplean muestras séricas.

RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA (IBR)

El virus causante de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) están comúnmente asociados a falla reproductiva en bovinos en la industria lechera. Es una enfermedad de distribución mundial, se estiman seroprevalencias de entre el 8.8% y 70.4% en países como Argentina, Colombia, España e India (Espinosa, 2019); pero con considerables esfuerzos de erradicación en varios países europeos y otros disponen de programas activos de erradicación (OIE, 2022), en tanto que en México se reportan regiones con seroprevalencias superiores al 70% (Muyilkens *et al.*, 2007) y en general, existen reportes de seroprevalencias que van desde 13.66% hasta el 93% en los estados de Michoacán, Yucatán, Tamaulipas, Campeche y Chiapas (Espinosa, 2019). Es una enfermedad

con gran impacto económico ya que se tiene efectos negativos sobre parámetros productivos y reproductivos, que generan pérdidas económicas considerables (Muylkens *et al.*, 2007) estimadas en Estados Unidos de Norte América en 640 millones de dólares anuales (Bowland & Shewen, 2000) por causa en el decremento de la producción láctea, restricciones comerciales, atención a animales enfermos y por el manejo para controlar o combatir la infección (Bowland & Shewen, 2000; Muylkens *et al.*, 2007).

Forma parte del complejo respiratorio y complejo abortivo bovino, es conocida también como vulvovaginitis pustular infecciosa (VPI), es una infección que se caracteriza por manifestar signos clínicos de las vías respiratorias altas, como secreción nasal (moco) purulenta, hiperemia del hocico (enfermedad de la nariz roja) y conjuntivitis. Los signos de enfermedad general son depresión, fiebre, anorexia, abortos y reducción de la producción de leche. En la infección del tracto genital, el virus puede causar vulvovaginitis pustulosa y balanopostitis. A la necropsia se observa laringitis, rinitis y traqueítis. La mortalidad es baja y la mayoría de las infecciones siguen un curso subclínico. En caso de infecciones bacterianas secundarias, estas pueden conllevar una enfermedad respiratoria más grave, y el HVBo-1 podría intervenir en enfermedades multifactoriales como la “fiebre del transporte” (OIE, 2022).

La enfermedad de IBR es causada por un virus de la familia *Orthoherpesviridae*, género *Varicellovirus*, subfamilia *Alphaherpesviridae*, se conocen dos genotipos BoHV-1.1, BoHV-1.2, que a su vez se diferencian en los subtipos BoHV-1.2 a y 1.2 b (Zhou *et al.*, 2020; Walker *et al.*, 2022). La mayoría de los aislados de vías respiratorias y de casos de abortos son cepas BoHV-1,1; en tanto que las cepas BoHV-1,2 se han aislado de lesiones encontradas en órganos genitales. Debido a la naturaleza de los herpesvirus, una vez que un animal es expuesto al virus queda como portador indefinidamente, por lo que se considera como portador a todo animal que tiene anticuerpos y posible excretor intermitente del virus (OIE, 2018c; Walker *et al.*, 2022).

Estructura del virión

El alphaherpesvirus bovino tipo 1 (BoAHV-1) es un virus esférico de 150 a 200 nm de diámetro con DNA lineal de doble cadena, con cápside icosaédrica, tegumento y envoltura como se muestra en la Figura 4 (Fauquet *et al.*, 2005).

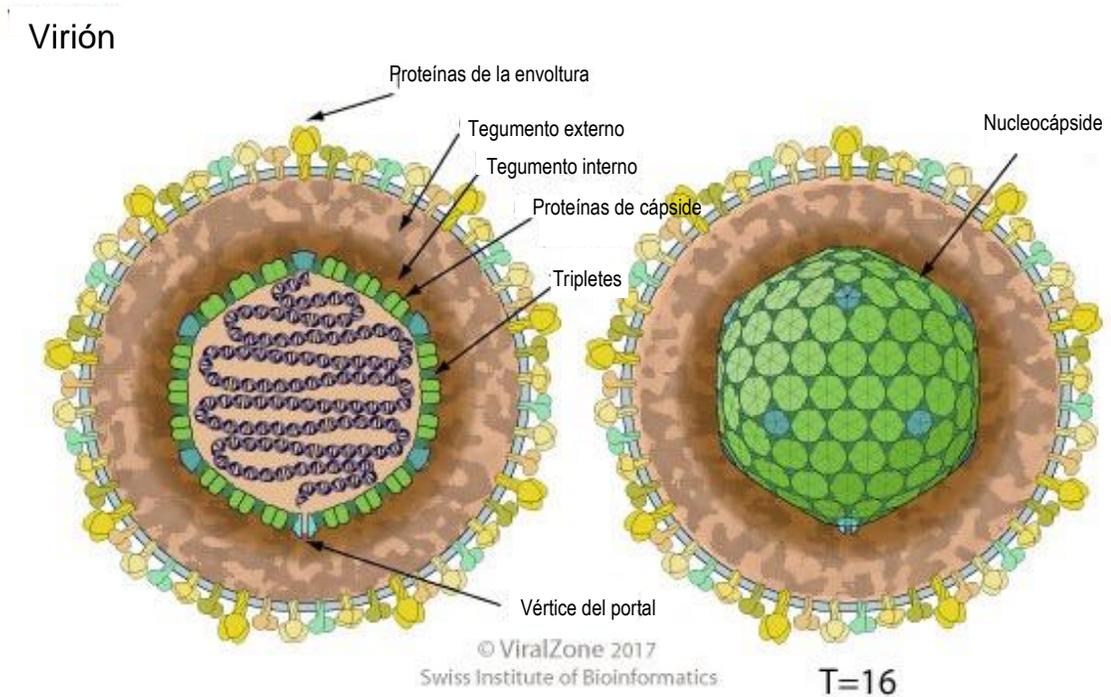


Figura 4. Representación esquemática del virión de alphaherpesvirus bovino tipo 1 (Tomado y modificado de <https://viralzone.expasy.org/179>).

El genoma vírico codifica unas 70 proteínas de las cuales, 33 son conocidas como proteínas estructurales, siendo las principales la glicoproteína B (gB) conocida por su importancia durante la adhesión y fusión del virus a las células (Nájera, 2020), otras son las glicoproteína C (gC) y glicoproteína D (gD); existen otras glicoproteínas adicionales: gE, gI, gH, gL, gG, gK y gM, tiene más de 15 no estructurales, además de diferentes enzimas y proteínas reguladoras (Schwyzer & Ackermann, 1996; OIE, 2018c).

Las glicoproteínas virales están en la superficie del virión, tienen un papel importante en los procesos de patogenia e inmunidad. La gB, gC y gD son las proteínas más inmunogénicas capaces de producir anticuerpos neutralizantes. Se ha descrito que la gB y gD no presentan diferencias antigénicas en relación con el genotipo, por lo que son las proteínas más conservadas entre los orthoherpesvirus (Levings, 2015). Sin embargo, la glicoproteína C presenta mayor variabilidad, por lo que un cambio en la secuencia de aminoácidos es suficiente para la diferenciación del genotipo (Rijsewijk *et al.*, 1999). La gB es considerada como inmunodominante e inmunogénica, por lo que se ha utilizado para profilaxis y diagnóstico (Nájera, 2020).

El BoAHV-1 presenta un ciclo de replicación lítico en las células epiteliales, produce muerte celular y por lo tanto, produce un efecto citopático (Nájera, 2020).

Genoma viral

El genoma de BoHV-1 está compuesto de una molécula larga de DNA dispuesta como clase D de un tamaño de 135.3k pares de bases. Su genoma comprende dos secuencias únicas, larga (UL) y corta (US). La secuencia US sirve como unión entre la parte de repetición interna (IR) y la parte de repetición terminal (TR) para generar secuencias repetidas del genoma vírico. Durante la replicación del ADN, tanto la UL como las regiones de US pueden intercambiarse, generando cuatro isómeros del genoma viral dentro del ADN (Espinosa, 2019).

La infección de las células es iniciada por un proceso de tres pasos. La primera interacción implica la fijación del virus entre el gB y/o el gC a las estructuras de la superficie de la célula similares del azúcar del sulfato de heparán. Esto es seguido por la unión estable de BoAHV-1 gD a los receptores específicos celulares. Después de esta alta interacción de la afinidad entre gD y los receptores de la célula, la penetración subsecuente del virus ocurre por la fusión del virión con la membrana de la célula. Este proceso crucial requiere por lo menos la implicación de cuatro glicoproteínas BoAHV-1: gD, gB y el heterodímero formado por gH y gL. Una vez que han entrado en el citosol de una célula, las partículas del virus deben ser transportadas usando el complejo del motor de Dinan asociado a los microtúbulos hacia los poros del núcleo para permitir la liberación viral del DNA (Espinosa, 2019).

Ciclo de replicación viral

1. La unión de las glicoproteínas virales gC y gB a los receptores del huésped (proteoglicanos (HSPG)) media la endocitosis del virus en la célula huésped. La gC no es esencial para la entrada del virión a la célula y la gB es capaz de realizar la adhesión de manera correcta para su posterior fusión con la membrana celular (Viral Zone, 2009; Nájera, 2020).

2. Fusión con la membrana plasmática para liberar el núcleo y las proteínas del tegumento en el citoplasma del hospedador. Es importante en este punto la interacción gD con sus receptores (Nectina-1 y receptor de entrada de los herpesvirus (HVEM)). El complejo glicoproteína H/glicoproteína L (gH/gL) es necesario para la fusión y entrada del virión a la célula interactuando con el receptor de integrina de la membrana celular. Al interactuar con sus receptores, la gD desencadena una señal de activación hacia la gB, que en conjunto con el complejo gH/gL generan cambios conformacionales, lo que permite el acercamiento del virión con la célula para llevar a cabo la fusión. La envoltura viral queda unida a la membrana celular, por lo que las glicoproteínas permanecen en la superficie y permiten el paso de la nucleocápside con el tegumento al interior. Algunas proteínas del tegumento son necesarias para el transporte al núcleo, las proteínas UL34, UL36, UL37 y VP26 interactúan con la dineína, la cual es responsable del movimiento de la periferia

de la célula hacia el centrosoma, cerca del núcleo, a través de los microtúbulos (Viral Zone, 2009; Nájera, 2020).

3. La cápside se transporta al poro nuclear donde se libera el ADN viral en el núcleo. Una vez que el virión alcanzó el núcleo, las proteínas VP1/2 (UL36) y UL25 del tegumento interactúan con el complejo del poro nuclear con las nucleoporinas Nup214, Nup 358, hCG1 e importina β (Viral Zone, 2009; Nájera, 2020).

4. Se transcriben genes inmediatos que promueven la transcripción de genes tempranos y protegen al virus contra la inmunidad innata del huésped.

5. Transcripción de ARNm viral temprano por la polimerasa II del huésped, que codifica proteínas involucradas en la replicación del ADN viral. UL41, también conocida como proteína de apagado del hospedador (vhs), es responsable de la detención de la producción de proteínas en las células infectadas al degradar el mRNA celular (Viral Zone, 2009; Nájera, 2020).

6. Ocurre amplificación del genoma circular por replicación bidireccional (ViralZone, 2009).

7. Síntesis de copias concatémicos lineales de ADN viral mediante círculo rodante (ViralZone, 2009).

8. Transcripción de ARNm tardíos por la polimerasa II del huésped, que codifica proteínas estructurales (ViralZone, 2009).

9. Ensamblaje del virus y (ViralZone, 2009).

10. Gemación a través de la laminilla interna de la membrana nuclear que ha sido modificada por la inserción de glicoproteínas del virus herpes, a través del Golgi y liberación final en la membrana plasmática. La salida del genoma de la cápside se efectúa cuando se realiza un corte proteolítico a la proteína principal del tegumento (VP1/2), que desencadena un cambio conformacional en la cápside, permitiendo la apertura del complejo del poro por otro corte proteolítico en la proteína UL6 (Viral Zone, 2009; Nájera, 2020) (Figura 5).

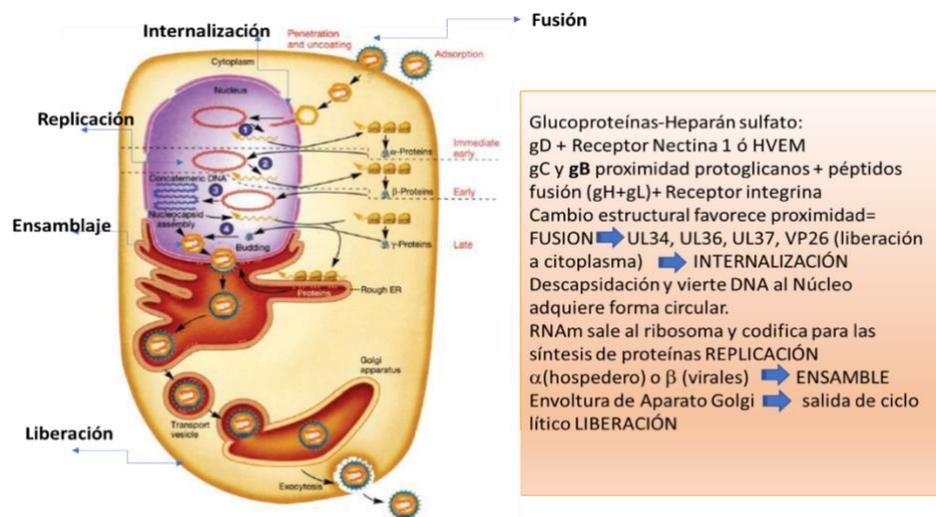


Figura 5. Ciclo de replicación viral de BoAHV-1 (Adaptado de ViralZone, 2009; Docsity: IPN, Microbiología, 2019).

Patogenia

El virus puede infectar al animal mediante aerosoles o por contacto directo, mediante monta natural o inseminación artificial; se replica en las células del epitelio respiratorio o en la mucosa vaginal o prepucial; desde donde alcanza los ganglios trigémico o sacros, en los que se mantiene durante toda la vida del animal en estado latente (OIE, 2018c; Muylkens *et al.*, 2007; Nájera, 2020).

Los signos clínicos pueden variar dependiendo de la vía de infección, así como del genotipo presente. Los animales infectados por vía aerógena o por contacto directo presentan fiebre entre los 4 y 5 días post-infección, tos, descarga mucosa nasal, anorexia y dificultad para respirar; si la infección se da entre los 4 y 8 meses de gestación, puede generar aborto. Por otro lado, cuando la infección es por vía genital, se observa balanopostitis o vulvovaginitis (Muylkens *et al.*, 2007). El genotipo 1.1 tiene manifestaciones respiratorias y abortos, el genotipo 1.2a se asocia con vulvovaginitis o balanopostitis y el genotipo 1.2b se ha asociado con ambas manifestaciones, sin embargo, no se ha relacionado con abortos (Fulton *et al.*, 2015). También se reporta un alargamiento y congestión del bazo, decoloración de riñones; hemorragias, congestión y necrosis del cerebro y en la placenta podemos observar edema y congestión (Espinosa, 2019).

Control

La eliminación de esta enfermedad es un importante obstáculo para muchos países para poder comerciar con los mercados internacionales; desafortunadamente muchos países no tienen información con respecto a la situación de la enfermedad y esto se da con mayor frecuencia en los

países tropicales, donde los registros de la producción son escasos. La IBR causa pérdidas significativas en la industria ganadera, desde disminución en la producción de carne y leche hasta la pérdida de becerros (Espinosa, 2019).

Varios países implementaron sistemas de control para BoAHV-1 en los años ochenta. En la actualidad varios países europeos han implementado a sus programas de erradicación obligatoria o voluntaria el uso de vacunas marcadoras. El primer problema para eliminar a los portadores es la falta de signos clínicos para poder detectar a los animales infectados haciendo que la infección se mantenga en los hatos aun cuando los virus mantienen su replicación en los ganglios del sistema nervioso central. Se menciona que una vez que los animales sean detectados como portadores, estos deben ser eliminados para evitar la diseminación. Las razones importantes del uso de la vacunación son la protección del feto y el evitar los abortos, logrando así un estado de salud de los animales, debido a que la erradicación de los animales enfermos ocasiona una pérdida de dinero y no siempre es posible realizarla. Además, la protección en campo nunca será completa, pero al vacunar se logra un decremento de los casos de aborto cercano al 50% y de infecciones fetales de casi 85% (Espinosa, 2019).

Se ha referido que las hembras de reemplazo deben vacunarse contra IBR treinta días antes del periodo de empadre; esto con la finalidad de generar protección inmunológica. Se recomienda el uso de vacunas multivalentes para los reemplazos como para animales de la UP o el uso de vacunas tipo DIVA, están basadas en la glicoproteína E del virus y han demostrado ser una estrategia de prevención segura y eficaz contra el ingreso de IBR a los hatos, incluso en países con alta incidencia de la enfermedad (EFSA, 2017; OIE, 2018; Iscaro *et al.*, 2021). Para identificar rápidamente que UP están infectadas, la estrategia recomendada por ser rápida y económica es el muestreo del tanque de leche. En la actualidad existen kits de diagnóstico que ha aprobado la Unión Europea para la detección de anticuerpos en tanque de leche en donde se contengan como máximo 50 animales (Espinosa, 2019).

Pruebas diagnósticas

Las pruebas serológicas utilizadas para la detección de anticuerpos contra BoAHV-1 son la neutralización del virus (VNT) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas indirecto (ELISA indirecto). El ELISA indirecto es utilizado con mayor frecuencia debido a que sus resultados son obtenidos de forma rápida y permite evaluar grandes cantidades de muestras. Por otra parte, como el virus se mantiene latente en el organismo, la identificación de animales positivos y aparentemente sanos proporciona un indicador útil del estado de la infección en un hato. El diagnóstico del aborto causado por BoAHV-1 se basa generalmente en la presencia de lesiones histológicas compatibles

(HCL), el aislamiento del virus (VI), inmunohistoquímica (CIS) y la detección del genoma viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El VI puede dar un diagnóstico positivo en uno de cada 3 casos de aborto debido a que el aislamiento es obstaculizado con frecuencia por la autólisis fetal. CIS se ha utilizado para detectar BoAHV-1 en tejidos con sensibilidad similar a la del VI. La prueba de PCR es más rápida, más fácil de realizar y la prueba de elección para la detección rápida de BoAHV-1 en el tejido fetal. ELISA es considerada la prueba serodiagnóstica más rápida, confiable, barata, simple y se adapta bien para el diagnóstico de diversas infecciones virales (OIE, 2004).

LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA (LEB)

La leucosis bovina enzoótica es causada por el virus de la leucemia bovina (VLE), una enfermedad que afecta principalmente al tejido linfoide, específicamente a los linfocitos B, y se caracteriza por presentar tumoraciones en el bovino causando linfomas malignos y linfosarcomas, lo que causa pérdidas económicas de consideración en vacas lecheras debido a la disminución de la producción láctea y la viabilidad de las vaquillas de reemplazo (Erskine & Sordillo, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2020). El ganado puede infectarse a cualquier edad, incluida la fase embrionaria, sin embargo, la presentación de las tumoraciones suele presentarse después de períodos de incubación bastante largos, por lo que los animales mayores a 3 años son los más afectados con la presentación de lesiones. De la misma manera, son más frecuentes los linfosarcomas en el ganado lechero debido a las condiciones de manejo y puede pasar desapercibida cuando los índices de infección son relativamente bajos (OIE, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2020). También se ha registrado la infección natural en búfalos acuáticos y capibaras (OIE, 2018). Está relacionado desde el punto de vista estructural y funcional con los virus de los primates tipos 1, 2 y 3 que infectan a los linfocitos T (VLTS-1, -2, -3) y los virus de los humanos tipos 1 y 2 que infectan a los linfocitos T (VLTH-1 y -2) (OIE, 2018).

La enfermedad se distribuye mundialmente, en México se han estimado prevalencias que oscilan entre el 11 al 66% (Gutiérrez *et al.*, 2020), pero no se han conducido estudios para analizar su presencia en la República Mexicana (Espinosa, 2019).

Estructura del virión

El virus de la leucemia bovina pertenece al género *Deltaretrovirus* de la familia *Retroviridae*, son viriones envueltos de forma esférica pleomórfica, de 80 a 100nm de diámetro. Tiene un genoma lineal de ARN de cadena sencilla (ssRNA) en sentido positivo, con un extremo cap 5' y una cola de poli A en el extremo 3'. Hay dos repeticiones terminales largas (LTR) de aproximadamente 550-750

nt de largo en los extremos 5' y 3'. El genoma viral codifica la nucleoproteína p12, la proteína p24 de la cápside, la glicoproteína transmembranal gp30, la glicoproteína de la envoltura gp51, y varias enzimas, entre las que se incluye la transcriptasa inversa. El ADN proviral que se genera tras la transcripción inversa del genoma vírico, se integra al azar en el ADN de la célula hospedadora, donde persiste sin una expresión constante para generar progenie vírica (OIE, 2018) (Figura 6).

Deltaretrovirus

Virión

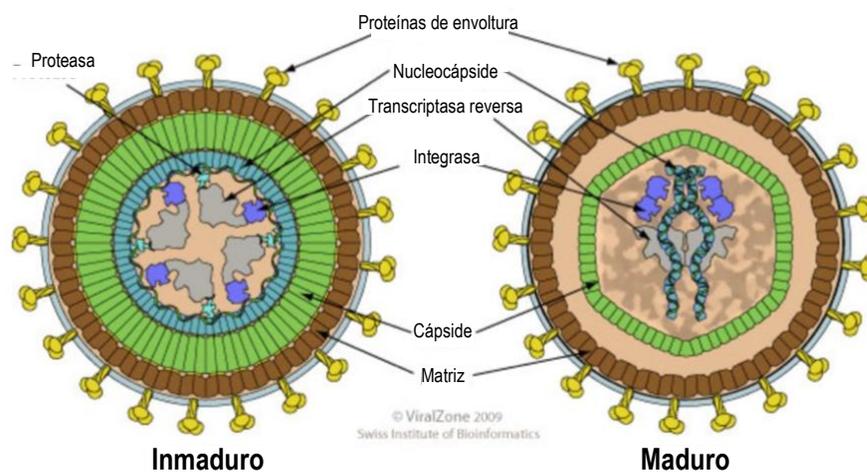


Figura 6. Esquematación del virión del género *Deltaretrovirus* (Tomado y modificado de ViralZone, 2009).

El provirus integrado utiliza los elementos promotores en el 5' LTR para dirigir la transcripción, originando ARNm de longitud completa que servirá como ARN genómico que se empaquetará como viriones o se usará como plantilla para la síntesis de proteínas estructurales y enzimas derivadas de la expresión de los genes *gag*, *pol* y *env*; a su vez Env se escinde en las proteínas de envoltura SU y TM, la proteína de envoltura contiene una glicoproteína de gran importancia inmunogénica, la LEBgp51, usada para el diagnóstico de la infección. Las proteínas no estructurales de la región pX son Tax, Rex, y en menos abundancia R3 y G4. Estas proteínas no estructurales tienen fundamental importancia en la interacción del virus con la célula hospedadora, modulando la expresión de genes virales y celulares, la replicación viral y la patogénesis (Gutiérrez *et al.*, 2020).

Replicación ciclo lítico:

1. El virus se adhiere a los receptores de la célula a través de la glicoproteína SU. En tanto que la glicoproteína TM es la encargada de la fusión con la membrana celular. La mayoría de las células B infectadas expresan el marcador CD5.
2. Ocurre la internalización y la desencapsidación.
3. El genoma de ssRNA (+) se copia en una molécula de dsDNA lineal mediante la transcriptasa inversa.
4. Entrada del dsDNA viral al núcleo, cuando la membrana nuclear se disgrega durante la mitosis.
5. El dsDNA viral se integra covalente y aleatoriamente en el genoma de la célula mediante la integrasa viral formando un provirus. Esto conduce a un pico de carga proviral hacia las 4-8 semanas post-infección, por medio de expansión clonal, en tanto que, una vez que el animal infectado desarrolla la respuesta inmune específica, las células infectadas en esta etapa inicial son eliminadas masivamente por el sistema inmune, y la carga proviral desciende significativamente.
6. La transcripción de provirus por Pol II produce ARN víricos empalmados y no empalmados.
7. La traducción de ARN virales completamente empalmados produce proteínas Tax y Rex.
8. Rex media la exportación nuclear de los ARN empalmados de forma incompleta.
9. La traducción de ARN virales sin empalmar produce poliproteínas Env, Gag, Gag-Pro y Gag-Pro-Pol.
10. Ensamblaje del virión en la membrana celular del huésped y empaquetamiento del genoma del ARN viral.
11. Emergen a través de la membrana plasmática y liberación de viriones.
12. Procesamiento proteolítico de las poliproteínas precursoras por proteasa viral y maduración de los viriones (ViralZone, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2020).

Patogenia

El LEB puede afectar las células del sistema inmune en muchos niveles, especialmente en la proliferación, apoptosis, expresión de receptores y citoquinas, afectando el crecimiento, la diferenciación y la sensibilidad de las células, así como, podría regular la potencia y la duración de las reacciones inmunológicas. Debido a esto, la infección con este virus predispone a la infección de otros patógenos (Gutiérrez *et al.*, 2020).

La infección es asintomática en la mayoría de los casos (30 a 70%), mientras que en 0.1-10% de los animales desarrolla un incremento permanente y estable de linfocitos B en sangre periférica, conocido como linfocitosis persistente (LP) y algunos animales desarrollan enfermedad

tumoral. La LP se considera una condición benigna que resulta de la acumulación de linfocitos B no transformados, debido a un desbalance entre la proliferación y la muerte celular. Este curso de la enfermedad, considerado como subagudo a crónico, se inicia cuando las vacas paren y comprometen la siguiente lactancia (OIE, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2020).

La condición patológica (linfoma o linfosarcoma multicéntrico) resulta de la acumulación de linfocitos transformados por el virus en uno o más órganos, luego de un periodo de latencia prolongado que puede durar entre 1 y 8 años. El linfosarcoma puede comprometer diversos órganos, especialmente el abomaso, corazón, linfonodos viscerales y periféricos, bazo, útero y riñones. Esta condición es más frecuente en animales de 4-8 años, y muy raro en animales menores de 2 años.

El curso hiperagudo ocurre en el 5-10% de los casos, donde los animales mueren sin signos clínicos previos, se ha observado que esta presentación puede ocurrir si se afectan las glándulas adrenales, o a consecuencia de una hemorragia interna por la ruptura del bazo o de una úlcera abomasal perforada, evolucionando irremediablemente a la fatalidad.

Signos clínicos

Produce linfocitosis persistente y la generación de tumores; dependiendo de la localización de estos pueden generar, inapetencia, pérdida de peso, fiebre, debilidad general y manifestaciones neurológicas, puede afectar el corazón, bazo, intestino, hígado, etc. Estos signos no son específicos de ninguna enfermedad. Los linfonodos superficiales pueden verse inflamados y se pueden palpar bajo la piel o por examen rectal (OIE, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2020).

Latencia

La latencia viral es la capacidad de un virus de permanecer inactivo dentro de las células del hospedero, puede establecer una infección oculta de por vida. Dependiendo del virus, el desencadenante de la latencia es muy variable, pero el contexto de la célula huésped siempre es determinante. La latencia puede detenerse con la reactivación del genoma viral, a menudo promovida por señales celulares de estrés (ViralZone, 2009).

El genoma viral puede permanecer latente como episoma o integrado en el cromosoma del hospedero. Este último permite la replicación del genoma viral durante la división de la célula huésped. La latencia del virus generalmente se mantiene mediante unos pocos genes virales que mantienen el genoma viral en silencio y escapan del sistema inmunológico del huésped (ViralZone, 2009).

Transmisión

Normalmente el LEB no se encuentra en el animal infectado como virus libre sino integrado como provirus al genoma del hospedador. Por lo tanto, los fluidos que contienen linfocitos infectados como sangre, leche u otra secreción pueden, al entrar en contacto con las membranas mucosas o tejidos lesionados, o al ser directamente inoculados, transmitir la infección viral a animales susceptibles. La principal vía de transmisión del LEB es horizontal, ya sea en forma natural o iatrogénica. Las intervenciones humanas asociadas a prácticas médico-veterinarias y de manejo como: descornados, castraciones, extracciones de sangre, palpaciones rectales y aplicaciones de medicamentos pueden, si se realizan sin la correcta desinfección del instrumental utilizado, causar el contacto de sangre entre animales. Probablemente esta sea la principal causa de la amplia diseminación del virus en la mayoría de los hatos (OIE, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2020).

Otra posible vía de transmisión horizontal del LEB es a través de insectos hematófagos, que pueden actuar como vectores mecánicos, especialmente en zonas de climas cálidos (García & Herrera, 2016; Kohara *et al.*, 2018). La transmisión vertical prenatal ocurre a tasas bajas (3-8%), principalmente por infección transplacentaria después de establecida la competencia inmunitaria (tercer mes de gestación) o durante el pasaje por el canal de parto. La transmisión vertical postnatal en terneros alimentados con leche o calostro proveniente de madres infectadas es poco frecuente. Sin embargo, los terneros nacidos de madres no infectadas son susceptibles a la infección si se los alimenta con leche de vacas infectadas. El virus de LEB raramente se detecta en el semen de toros infectados. La transmisión del LEB a través del semen no ha sido demostrada ni por medio de la inseminación artificial ni por servicio natural (OIE, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2020).

Recientemente, la preocupación sobre el potencial zoonótico del LEB ha reemergido, a raíz de publicaciones que sugieren una asociación entre el LEB y el cáncer de mama humano (Buehring *et al.*, 2015). Un estudio reciente reporta la detección de secuencias del LEB y anticuerpos anti-LEB en un alto porcentaje de muestras de sangre humana, pero no se encuentra correlación entre la presencia del genoma y los anticuerpos específicos. Sin embargo, la evidencia de esta asociación es controversial y no hay evidencia clara, pese a ello, y siendo el LEB un retrovirus emparentado con el virus de la leucemia de células T de humanos (HTLV), es necesario considerar el potencial riesgo de transformarse en una zoonosis (OIE, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2020).

Pruebas diagnósticas

En el diagnóstico de la leucosis bovina es importante diferenciar la leucosis o linfosarcoma de la LP, en la infección por el LEB. El diagnóstico de los tumores es el primer indicio de la presencia de la infección en un hato y el diagnóstico de la infección permitiría orientar su control. La LP se

define como un incremento de tres desviaciones estándar en el recuento absoluto de linfocitos, el recuento linfocitario fue la base para clasificar animales sin leucosis, sospechosos o linfocíticos (Gutiérrez *et al.*, 2020).

El diagnóstico de linfosarcoma se lleva a cabo a través del examen clínico o hallazgos de la necropsia, confirmado por análisis histopatológico de los órganos afectados, sin embargo, este método no permite distinguir entre el linfoma esporádico y aquellos inducidos por LEB, por lo que debe complementarse con PCR o serología. De igual manera, también puede diagnosticarse en forma indirecta, a través de la detección de anticuerpos específicos en suero o leche, con pruebas como la inmunodifusión en gel de agar (IDGA), radioinmunoprecipitación (RIP) o ensayos ELISA, dichas técnicas utilizan como antígenos a las proteínas más inmunogénicas del virus, la proteína principal de la cápside de 24kDa (p24) y la glicoproteína de la envoltura viral de 51kDa (gp51), además de que es factible usar *pools* de muestras en el caso de ELISA para realizar monitoreos más económicos. O bien, la infección puede ser diagnosticada por métodos directos que identifican la presencia del virus o sus antígenos mediante cultivos *in vitro* de los leucocitos de sangre periférica y que pueden detectarse los transcritos, proteínas y partículas virales, por métodos moleculares, inmunológicos o microscopía electrónica, con la gran desventaja de ser imprácticas para el diagnóstico de rutina debido a los costos y laboriosidad, por lo que su uso está restringido al campo de la investigación científica, sin embargo, tienen la gran ventaja de poder usarse con alta eficiencia en animales en los primeros estadios de la infección, en animales muy jóvenes (menor a 6 meses), en el caso de diagnósticos sospechosos y para diferenciar casos clínicos de linfomas esporádicos y enzoóticos. Se han usado diversas variantes de PCR con resultados eficientes y altamente sensibles al amplificar regiones de los genes *pol* y *env* (OIE, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2020).

Control

Aún no existe ningún tipo de tratamiento disponible de forma práctica, pero se han evaluado tratamientos de forma experimental, como la administración de compuestos capaces de revertir la latencia del LEB para hacer que el virus se exprese, de tal forma que al ocurrir la expresión viral en las células infectadas se permite que estas puedan ser reconocidas y eliminadas por parte del sistema inmunitario. Los inhibidores de la acetilación de histonas (iAH) como el ácido valproico (VPA) y el antibiótico tricostatina A (TSA) han demostrado tener la capacidad de activar la expresión de virus latentes, pero debe considerarse la posibilidad de que los animales tratados pueden permanecer como persistentemente infectados y ser fuente de infección viral, y la posibilidad de revertir efectos tras la interrupción del tratamiento (Rodríguez *et al.*, 2011).

Vacunas

No existen vacunas disponibles, las respuestas inmunitaria humoral e inmunitaria mediada por células son deficientes para la eliminación de células infectadas que portan el virus latente. Inicialmente, se probó una vacuna que contenía un provirus defectuoso compuesta por células infectadas, que indujo la producción de anticuerpos neutralizantes en ovejas vacunadas, pero el provirus podía transmitirse por el contacto entre células, representando un riesgo de transmisión de la infección (OIE, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2020).

Las vacunas de virus inactivado resultaron poco eficientes al desafío con una dosis baja de virus infectante. Por otro lado, las vacunas de subunidades virales produjeron una respuesta inmunitaria humoral y también fallaron en prevenir la infección del ganado vacunado (Gutiérrez *et al.*, 2020).

Las vacunas recombinantes de subunidades (Env) que utilizan vectores virales como el virus vaccinia no previno la infección con el LEB, pero redujo significativamente la diseminación del virus entre los linfocitos en los animales vacunados. No se encontró correlación con anticuerpos neutralizantes en el suero de los animales, sugiriendo que la respuesta mediada por células cumplía un rol más importante en limitar la multiplicación viral (Gutiérrez *et al.*, 2020).

Es necesario enfatizar la precaución de utilizar vacunas retrovirales activas atenuadas, ya que la característica de incorporación de los retrovirus en el genoma del hospedero y la alteración en la función de genes represores de tumores hacen incompatible el uso de estos inmunógenos (Gutiérrez *et al.*, 2020).

Estrategias de control

La estrategia de control y erradicación del LEB más eficiente es la identificación y eliminación de los animales infectados. Como primera medida se debe hacer el diagnóstico de la situación inicial por medio de una prueba serológica a todos los animales mayores de seis meses a fin de clasificar al hato como "libre" o "infectado". Para certificar un hato como "libre de LEB" se deberá repetir el examen serológico a la totalidad de los animales después de 60-90 días, y se recertificará anualmente previo análisis serológico negativo de todos los animales mayores de 15 meses (Kuczewski *et al.*, 2021; Irimia *et al.*, 2021).

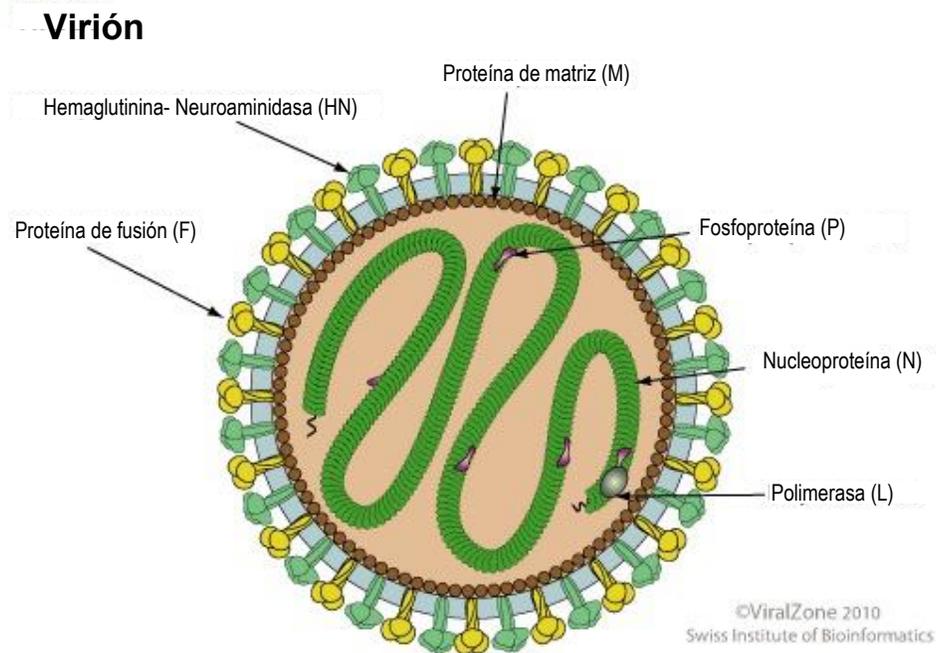
PARAINFLUENZA 3 (PI3) Y VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL BOVINO (VRSB)

PI3 pertenece a la familia *Paramyxoviridae* y el VRSB a la familia *Pneumoviridae*, ambos virus producen cuadros clínicos con afecciones respiratorias severas, principalmente en animales

jóvenes. El virus de PI3 se encuentra en el género *Respirovirus* y el VRSB en el género *Orthopneumovirus*.

Estructura del virión

Son virus de forma esférica, envueltos y diámetro de 150 a 250 nm, el genoma viral es ARN lineal monocatenario de sentido negativo y no segmentado, tamaño de 15 Kb que codifica 8 proteínas (Sarmiento-Silva *et al.*, 2012; Galván *et al.*, 2013) (Figura 7, Figura 8 y Figura 9).



Envuelto, esférico y diámetro aproximado de 150nm

Figura 7. Esquematización de los viriones de PI3 y VRSB (Tomado y modificado de Galván-Morales, 2013).

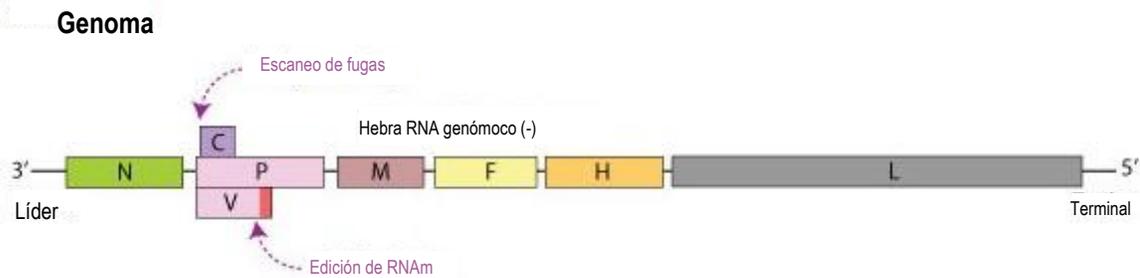


Figura 8. Genoma de los paramyxovirus (Tomado y modificado de ViralZone, 2007).



Figura 9. Genoma de los géneros *Respirovirus* (PI3) y *Orthopneumovirus* (VRSB) (Tomado y modificado de Galván Morales, 2013).

El VRSB y el virus de PI3 han sido reconocidos como las principales causas de enfermedades respiratorias en terneros jóvenes (Baker *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 1998; Sarmiento-Silva *et al.*, 2012; Ferella *et al.*, 2017), pero se ha observado una mayor prevalencia entre los animales más viejos, son virus que forman parte del complejo respiratorio bovino (Baker *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 1998; Sarmiento-Silva *et al.*, 2012). La transmisión puede ocurrir por contacto directo con secreciones o aerosoles, por contacto con animales recién introducidos a la granja, por transmisión indirecta con animales no pertenecientes al hato. En tanto que la transmisión aérea no es importante para la propagación local y la transmisión entre hatos (Molina *et al.*, 1998; Sarmiento-Silva *et al.*, 2012). Algunos de los principales factores de riesgo para la transmisión de estos virus incluyen el hacinamiento y prácticas de bioseguridad deficientes, aumentada por el movimiento del ganado; no existe evidencia que indique que los insectos desempeñen un papel en la transmisión viral (Baker *et al.*, 1997; Sarmiento-Silva *et al.*, 2012; Ferella *et al.*, 2017).

La morbilidad para ambas enfermedades es bastante alta, desde el 60% hasta el 80%, se ha estimado que el 60% de las enfermedades respiratorias es producto del VRSB en el ganado lechero. Se considera un 5 a 20% de letalidad para ambas infecciones (Sarmiento-Silva *et al.*, 2012; Galván *et al.*, 2013; Ferella *et al.*, 2017). En el caso de PI3 es capaz de infectar el aparato respiratorio tanto de bovinos como de ovinos, sin embargo, los virus de PI3 aislados de bovinos y ovinos no son idénticos, pero si muestran antigenicidad cruzada (Molina *et al.*, 1998).

Los mecanismos responsables de la supervivencia del virus dentro de una población determinada no se comprenden completamente, se ha propuesto la cronicidad como un mecanismo que podría desempeñar un papel en la propagación de la infección (Sarmiento-Silva *et al.*, 2012).

El VRSB puede aislarse de animales asintomáticos y puede persistir durante varios meses una posibilidad es la existencia de terneros infectados de manera persistente, que podrían comenzar a diseminar el virus en condiciones específicas. Puede ocurrir una infección latente entre los rebaños, lo que proporciona una posible explicación de la aparición de brotes en terneros relativamente aislados. Sin embargo, algunos informes han sugerido que la infección subclínica en el ganado no es un mecanismo plausible para la persistencia del VRSB en los rebaños lecheros. Desde otra perspectiva, se cree que los animales clínicamente enfermos son las fuentes más probables de infección y, por lo tanto, la explicación más probable de las infecciones recurrentes es la reintroducción del virus en el rebaño antes de que se produzca un nuevo brote. Se han identificado cuatro subgrupos antigénicos (A, B, AB, sin tipificar) para el VRSB, sin embargo, es posible que sólo representen variantes de un único grupo antigénico principal (Sullender, 2000; Silva *et al.*, 2012).

Replicación viral

En las células del hospedero, el virus se adhiere a los receptores de ácido siálico de la superficie con las glicoproteínas HN, H o G. En el caso de VRSB (orthopneumovirus) se desconoce el receptor. Al fusionarse a la membrana plasmática utiliza la proteína F, de esta manera penetra a la célula, en este proceso de adsorción deja la capa lipídica que se funde con la membrana celular. La nucleoproteína (NP) tiene 489 a 883 aminoácidos con 2 dominios, la porción amino terminal está altamente conservada y la porción carboxilo terminal lo es menos. La NP funciona en la encapsidación de ARN, durante la transcripción y la replicación se asocia con la P-L polimerasa; y es probable que interaccione con la proteína M durante el ensamblaje del virus. La fosfoproteína (P) es una proteína variable en longitud dentro de los virus de esta familia, está compuesta por dos dominios el N-terminal y el C-terminal, separados por una región hipervariable. Esta proteína se caracteriza por presentar un alto nivel de fosforilación, desempeña un papel importante en la síntesis de ARN y junto con la proteína L forman la polimerasa viral (P-L); en conjunto con la NP, forman un complejo que activa la encapsidación del ARN llamado complejo ribonucleoproteico (CRNP). Existen otras proteínas accesorias no esenciales del gen P, proteínas C, V, D, W, I y SH (Sarmiento-Silva *et al.*, 2012; Galván *et al.*, 2013) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resumen de las principales proteínas virales de la familia *Paraxymoviridae*

Proteína estructural	Designación	Localización	Función
Hemaglutinina-neuraminidasa	HN	Envoltura	Fijación a receptores en la célula huésped, actividad hemaglutinina y neuroaminidasa
Proteína de Fusión	F	Envoltura	Fusión, penetración hemólisis
Proteína de Matriz	M	Cara interna de envoltura	Ensamblaje
Nucleoproteína	NP	Nucleocápside	Complejos con el genoma de ARN
Fosfoproteína	P	Nucleocápside	Parte del complejo ARN polimerasa
Proteína grande	L	Nucleocápside	Parte del complejo ARN polimerasa
Proteínas accesorias del gen P	C, V, D, W, I y SH		P/D Desensamblaje/modulación I, D, SH función desconocida, se cree que SH refuerza la fusión C abundante no conservada ensamblaje viral, inhibe función de INF α/β (inhibe o incrementa apoptosis)

Adaptado de: Sarmiento-Silva, 2012; y Galván Morales, 2013.

Algunos otros virus de la misma familia *Paramixoviridae* (*Respirovirus*/PI3) codifican en un mecanismo de repetición del ARN para producir las proteínas P, V y a otras nombradas W/I/D a través de un fenómeno denominado leaky scanning, escaneo con fugas, es un fenómeno en el que el ribosoma a veces omite un triplete de codones de iniciación débil en el ARNm al inicio de la traducción. La subunidad ribosómica 40S continúa escaneando hasta un codón de iniciación adicional, es entonces cuando el codón de iniciación débil puede codificar varias proteínas diferentes y proteínas mediante edición de ARNm (Galván *et al.*, 2013).

Y durante la etapa final del ciclo de replicación, la asociación de la nucleocápside con la proteína de la matriz media la integración de la envoltura (membrana lipídica) y el virus es liberado por gemación desde la membrana celular, a través del complejo ESCRT (Sistema de complejos de clasificación endosómica requeridos para el transporte) (Votteler & Sundquist, 2013; Meng & Lever, 2021).

Patogenia

Ambos virus PI3 y VRSB pueden producir 3 manifestaciones clínicas: proceso agudo, forma subaguda o forma leve y subclínica.

La forma subaguda, es una infección discreta del aparato respiratorio de los bovinos y ovinos, consistente en fiebre, rinorrea serosa, conjuntivitis y una bronquiolitis y alveolitis,

generalmente cursan con infecciones leves de auto resolución en 2 o 3 días, sin embargo, la mayoría de las infecciones de PI3, VRSB o ambos interactúan con infecciones bacterianas secundarias, debidas al efecto inmunosupresor, complicando los cuadros clínicos iniciales y evolucionando de manifestaciones clínicas leves a manifestaciones de signos más intensos, con transcurso de enfermedad aguda con signos como fiebre intensa, anorexia, cansancio, disnea, lagrimeo, secreción nasal, taquipnea, tos intensa y conduciendo a la muerte de los animales 3 a 5 días después (Baker *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 1998; Ferella *et al.*, 2017).

Los animales adultos con infección subclínica generalmente no manifiestan cuadros clínicos definidos y son autolimitantes, sin embargo, son la principal fuente de infección para los otros animales (Baker *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 1998).

Pruebas diagnósticas

Puede realizarse el aislamiento viral con la identificación directa por microscopía electrónica, la detección indirecta por medio de inmunofluorescencia IF, o por la observación de efectos citopáticos en los cultivos de células, sin embargo se trata de técnicas laboriosas, tardadas (los efectos citopáticos pueden demorar 1 mes en observar daño celular) y costosas; además, los paramyxovirus tienen la característica de tener dificultad para el aislamiento, ya que los cultivos son lábiles con la consecuente baja sensibilidad. Las técnicas serológicas son de utilidad, puede realizarse seroneutralización, ensayos ELISA, fijación del complemento (FC) o aprovechando la característica de los paramyxovirus, la inhibición de la hemoaglutinación (IHA) (Wellemans, 1977).

Control

Si bien no existe una única medida para realizar el control absoluto de la presentación de las enfermedades, para disminuir la gravedad de las infecciones o para prevenirlas, algunos mecanismos de control de las infecciones de PI3 y VRSB en los bovinos incluyen la detección de los animales seropositivos utilizando pruebas de tamizaje, o bien, evidenciando a los animales enfermos al observar la signología clínica. Otro método de control es la inmunización con vacunas de virus activo, ya que generan respuesta inmunitaria rápida y estimulan una fuerte respuesta celular, sin embargo, la elección adecuada del tipo de vacunas dependerá del estado inmunológico de los animales, de la edad, de la eficacia y de la seguridad de las mismas. Se puede realizar el mejoramiento de la ventilación en las instalaciones, limpieza y desinfección, verificación de la calidad del agua, medidas de bioseguridad y respeto de las cuarentenas (Betancur *et al.*, 2010; Makoschey & Berge, 2021).

PROGRAMAS DE CONTROL DE ENFERMEDADES

Las emergencias zoonitarias son situaciones de crisis que pueden producirse por enfermedades transfronterizas, por la propagación de enfermedades emergentes o reemergentes, por desastres naturales, o bien debidas al aumento de la incidencia de las enfermedades endémicas, que cambian de patrón con evolución hacia epidémicas, inclusive llegando a quedar fuera de control. Las repercusiones posibles más importantes suelen ser las pérdidas económicas y en el caso de enfermedades zoonóticas pueden comprometer la salud pública (Gary *et al.*, 2021).

Es por ello que es importante conocer y tener la capacidad de actuación ante estos panoramas y más aún cuando la FAO menciona que en muchos países existe una inadecuada preparación, limitada capacidad de respuesta, así como coordinación internacional deficiente, y es por ello que, aunque no se pueden dar recomendaciones precisas del actuar ante diferentes emergencias sanitarias, FAO emite directrices generales con el objetivo de poder prevenir la propagación o introducción de enfermedades, a fin de garantizar la integridad alimentaria e inocuidad de los alimentos (Samudio & De Gracia, 2019; Gary *et al.*, 2021).

La FAO (Samudio & De Gracia, 2019) ha establecido cuatro etapas en la gestión de enfermedades en las situaciones de crisis, las que ha denominado como:

Fase de tiempos de paz en la que el objetivo es prevenir la introducción o propagación de patógenos, así como evitar que las enfermedades endémicas superen ciertos umbrales previamente conocidos. En esta etapa las actividades principales que se conducen son los análisis de riesgo para identificar aquellos factores que puedan predisponer a la presentación de enfermedad y en consecuencia evitarlos a través de medidas preventivas. Así mismo, en esta etapa son importantes las pruebas diagnósticas para utilizarlas en la detección temprana de enfermedades.

Durante la *fase de alerta*, gracias al monitoreo constante se pueden detectar cambios en el comportamiento de las enfermedades y en consecuencia se preparan los planes de acción contra la emergencia mediante implementación de medidas de control como cuarentena, vacunación o sacrificio de animales seropositivos. De igual manera la coordinación entre diversas autoridades es importante para difundir información clara y precisa del evento.

En la *fase de emergencia* se realizan investigaciones epidemiológicas para determinar el origen y fuente de la enfermedad, así como, la extensión física del brote. Se considera la actuación simultánea y coordinada con instancias de cada país, con el objetivo de generar apoyos a productores afectados por las medidas de control, proveer de capacitación y asistencia en temas relacionados a desinfección y la posible eliminación de cadáveres.

En la última *fase* denominada como *restauración*, que ocurre posterior al control de la emergencia, las actividades van encaminadas a la reconstrucción hasta alcanzar el estado previo a la emergencia, se realizan evaluaciones de daños y planes de recuperación con estimaciones de recursos necesarios.

En otro orden de ideas, los Centros de Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, indican que los programas de manejo de emergencias en salud deben incluir actividades de preparación y de respuesta, este organismo refiere 3 niveles de activación de emergencia, en el que el nivel 3 es el más bajo y en el que se atienden las necesidades primarias de respuesta, en el nivel 2 hay un aumento en la magnitud de la respuesta y en el nivel 1 se establecen mecanismos de respuesta internacional (Rasmussen & Goodman, 2019). De igual forma, organiza los niveles de respuesta de acuerdo a las áreas de experiencia en cada grupo quienes trabajan de manera coordinada, estableciendo así *grupos de respuesta científica* (responsables de aspectos epidemiológicos y control de enfermedades como el desarrollo de vacunas), el *grupo de epidemiología y vigilancia* (responsables del monitoreo y rastreo de la propagación de enfermedades infecciosas y de otras amenazas a la salud, utilizan herramientas estadísticas para evaluar patrones y tendencias de prevalencias , así como establecen la distribución de vacunas), el *grupo de modelado* utiliza modelos matemáticos para predecir la propagación, el *grupo de salud ambiental* identifica y mitiga factores ambientales que puedan contribuir a la propagación de enfermedades, los laboratorios desarrollan pruebas diagnósticas para identificar patógenos y garantizan que las pruebas desarrolladas sean pruebas precisas y oportunas y de igual manera difunden información para que los resultados se comuniquen de manera efectiva, existe el *grupo de atención médica y contramedidas*, quienes desarrollan terapias de tratamiento e inclusive el desarrollo de nuevos medicamentos; el *grupo de operaciones internacionales* coordina la respuesta en diferentes países y finalmente el *grupo de migración global* y cuarentena identifica poblaciones de alto riesgo para implementar actividades de cuarentena.

Toda la actividad de los grupos deberá estar respaldada por el área de sistemas de información geográfica, quienes ayudan a investigar patrones de transmisión, lugares comunes, factores de exposición, de transmisión y sus hipótesis, con la finalidad de entender la propagación de enfermedades.

En fases de emergencia los CDC recomienda seguir los pasos siguientes para la atención de la crisis de salud:

1. Preparación para el trabajo de campo mediante la generación de mapas situacionales, que pueden incluir redes de comunicación y otros aspectos de interés.
2. Confirmación de los diagnósticos de la enfermedad.

3. Identificación de anomalías en los umbrales de prevalencia.
4. Recopilación y geocodificación de datos para el estudio de brotes de enfermedades.
5. Organización y tabulación de los datos en función de tiempo, lugar y tasas de afección.
6. medidas de control o prevención más efectivas basado en resultados y en geoestadística para la toma de decisiones informadas.
- 7 y 8. Desarrollo de hipótesis y planeación de estudios a partir de estadística geoespacial avanzada para comprender las asociaciones espaciales y temporales, así como establecer teorías de agente causal, modo de transmisión y ubicación de las fuentes de exposición.
9. Realizar medidas para reducir o eliminar la propagación de las enfermedades mediante programas de acción identificadas como efectivas. Puede incluir actividades de monitoreo de prevalencias e incidencias para la toma de decisiones.

En México se cuenta con el dispositivo de emergencias en sanidad animal (DINESA) operado y ejecutado por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) coordinado por la Dirección General de Salud Animal a través de los grupos estatales de emergencia de sanidad animal (GEESA), para hacer frente a las emergencias de tipo sanitario, con este dispositivo se ejecutan las medidas de prevención, control y erradicación de enfermedades exóticas y emergentes que son consideradas como peligro potencial para la ganadería nacional o la salud de la población. Las actividades para el control de enfermedades y en atención al productor incluyen asistencia técnica, diagnóstico, capacitación, trampeo, toma de muestras, control químico, biológico o cultural, vacunación, eliminación de animales, control de movilización, divulgación e implementación de cuarentenas (DOF: 30/12/2022*).

* Acuerdo por el que se dan a conocer las Reglas de Operación del Programa de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, para el ejercicio fiscal 2023.

Capítulo 2. Metodología general

Banco de sueros

Durante los años de 2011 y 2012, la SAGARPA (hoy Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, SADER) y la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México) realizaron encuestas, diagnósticos reproductivos y la colección de alrededor de 30 000 muestras de sangre para establecer un banco de sueros bovino (Cuadro 5). Este banco centraliza un número de muestras representativo de cada estado y para 30 entidades federativas de la República Mexicana, excluyendo a la Ciudad de México y Baja California Sur. Este banco de sueros es la primera colección de muestras del hato nacional obtenidas bajo un diseño que permiten inferencias desde el nivel estatal, colectadas aleatoriamente de unidades de producción en donde no se realizaban vacunaciones. Las muestras se encuentran en un cuarto congelador a -20° C identificadas por medio de un sistema de código de barras que permite la tipificación de cada animal por rancho, municipio y estado de la República. De igual manera, se colectaron datos de la unidad de producción como región climática, humedad, temperatura, fin zootécnico, y manejo reproductivo de los animales muestreados para ser analizados como posibles factores de riesgo.

Para contar con un muestreo representativo del hato bovino nacional, se calculó un tamaño muestral con la fórmula:

$$n = \frac{Npq}{(N-1)B^2} + pq$$

Donde:

N = Población de bovinos reportada en el programa ganadero (PROGAN)

p = Prevalencia del 50%

q = $1-p$

B = error 3%

Z = confianza 95%

(Segura & Honhold, 2000)

Además, se calculó el número de muestras requerido por estado, considerando el tamaño de hato predominante en cada entidad, observando 3 categorías de hatos: pequeños (menos de 35 animales), medianos (entre 36 a 100 cabezas por hato) y grandes (más de 100 animales).

Cuadro 5. Listado del número de muestras colectadas en cada estado de la república mexicana

Estado	# muestras
Aguascalientes	1114
Baja California	251
Campeche	820
Chiapas	1368
Chihuahua	331
Coahuila	335
Colima	1268
Durango	1225
Estado de México	370
Guanajuato	1185
Guerrero	1080
Hidalgo	1403
Jalisco	1775
Michoacán	879
Morelos	585
Nayarit	2506
Nuevo León	751
Oaxaca	1396
Puebla	2538
Querétaro	1215
Quintana Roo	590
San Luis Potosí	1187
Sinaloa	608
Sonora	756
Tabasco	1188
Tamaulipas	1366
Tlaxcala	168
Veracruz	901
Yucatán	565
Zacatecas	422
Total	30146

Desarrollo y validación de un ensayo pentaplex para la identificación de anticuerpos contra enfermedades virales comunes en bovinos

El siguiente artículo muestra el desarrollo del ensayo múltiple, su optimización, validación y la discusión de los resultados, llevados a cabo como parte inicial de los trabajos de doctorado. Posteriormente, con dicho inmunoensayo se condujo el análisis epidemiológico de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB en el territorio nacional, el cual ha sido aprobado para su publicación en la revista *Access Microbiology*:

Development and validation of a pentaplex assay for the identification of antibodies against common viral diseases in cattle

Ana Rodriguez, Rogelio A. Alonso-Morales, Arantza Lassala, Lucia Rangel P, Vianey Ramírez-Andoney and Carlos G. Gutierrez*

Abstract

Animal welfare and economic implications of infectious diseases in cattle demand an efficient surveillance as the foundation for control and eradication programmes. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), Parainfluenza virus type 3 (PI3V), Bovine herpes virus-1 (BoHV-1), Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), and Enzootic bovine leukosis virus (EBLV) cause common and often underdiagnosed diseases in cattle that are endemic in most countries [1]. A hallmark of individual exposure to a viral pathogen is the presence of antibodies directed towards that virus. The aim of this study was to develop and validate a pentaplex assay to simultaneously detect and quantify antibodies against BRSV, PI3V, BoHV-1, BVDV and EBLV in serum, as an efficient tool to yield epidemiological data. Monoplex assays were initially developed using either complete BRSV or BoHV-1 viral lysates, or recombinant proteins for BVDV, EBLV or PI3V as capture antigens. In addition, 125 serum samples from unvaccinated cattle, which were classified as positive or negative for each of the viruses by commercial ELISA kits, were used for validation. Conditions established for the Luminex monoplex assays were adopted for the pentaplex assay. The accuracy, determined by the area under the ROC curve, was greater than 0.97, and assay diagnostic sensitivities and specificities were over 95 and 90%, respectively, for all antigens. Intra (r) and interassay (R) coefficients of variation were under 10 and 20%, respectively. Selectivity towards target viruses was shown by binding inhibition assays where unbound viruses reduced fluorescence intensities. Diagnostic agreement for samples analysed simultaneously in the monoplex and multiplex assays was almost perfect. In conclusion, a highly sensitive pentaplex assay was validated for the simultaneous identification of antibodies directed against BVDV, BoHV-1, PI3V, BRSV and EBLV in serum. The developed pentaplex assay complies with performance characteristics established by international guidelines for diagnostic tests and may be used as a tool for the implementation of epidemiological surveillance.

Received 27 October 2022; Accepted 17 September 2023; Published 17 October 2023

Author affiliations: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. México, Mexico.

***Correspondence:** Carlos G. Gutierrez, ggcarlos@unam.mx

Keywords: BoHV-1; BRSV; BVDV; EBLV; Multiplex; PI3V.

Abbreviations: AOAC, Association of Official Analytical Chemists; ATCC, American Type Culture Collection; AUC, area under the curve; BacToBac, baculovirus expression system; BamHI, Bacillus amyloliquefaciens restriction endonuclease type II; BLAST, Basic Local Alignment Search Tool; BoHV-1, bovine alphaherpesvirus type 1; BRSV, bovine respiratory syncytial virus; BVDV, bovine viral diarrhoea virus; °C, degrees celsius; CV, coefficient of variation; DH10BAC, competent cells to generate recombinant bacmids by transposition; DNA, deoxyribonucleic acid; EBLV, enzootic bovine leukosis; EBLV, enzootic bovine leukosis virus; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FBS, foetal bovine serum; FEUM, Farmacopeia of the Mexican United States (by its acronym in Spanish Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos); g, relative centrifuge force; µg, micrograms; gE, glycoprotein E2 of BVDV; gp51, glycoprotein 51 of bovine leukaemia virus; h, hours; HN, hemagglutinin neuraminidase; H7N3, hemagglutinin 7 neuraminidase 3; IBR, infectious bovine rhinotracheitis syndrome; IgG, gamma immunoglobulin; µl, microliter; LR+, positive likelihood ratios; M, molar; MFI, mean fluorescent intensity; ml, milliliter; Mono NC, negative monovalent control; Mono PC, positive monovalent control; NaCl, sodium chloride; NaN₃, sodium azide; NCBI, National Center for Biotechnology Information; nm, nanometer; NSB, non-specific binding; PBS, phosphate buffer solution; PCR, polymerase chain reaction; PE, streptavidin-phycoerythrin; pH, potential of hydrogen; PI3V, parainfluenza virus type 3; Poly C, polyvalent positive control; ROC, receiver operating characteristics; r.p.m., revolutions per minute; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; Sf9, spodoptera frugiperda cell line IPLB-Sf-21-AE; TCID50, median tissue culture infectious dose 50; U ml⁻¹, units per millilitre; USPC, United States Pharmacopeial Convention; WOA, World Organisation for Animal Health; xMAP, multi-analyte profiling.

000511.v3 © 2023 The Authors



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

DATA SUMMARY

Data underlying this research can be retrieved using the following link on Figshare: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.22341601.v3> [2]. This file has three worksheets with: (1) the mean fluorescent intensities for positive and negative samples used to estimate sensitivities and specificities in the ROC analyses. (2) Mean fluorescent intensities of positive and negative quality controls in the pentaplex assay, and their inter- and intra-assay coefficients of variation. (3) Correspondence analysis of sample status when analysed in either the monoplex or pentaplex formats.

INTRODUCTION

Infectious diseases in cattle have significant animal welfare and economic implications that threaten the sustainability of productive enterprises and affect the quality, quantity and availability of animal products. In addition, lack of specific treatment for viral diseases contribute to the increased use of antibiotics, as they are often associated with secondary microbial infections.

Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), Parainfluenza virus type 3 (PI3V), Bovine herpes virus-1 (BoHV-1), Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and Enzootic bovine leukosis virus (EBLV) cause common and often underdiagnosed infectious diseases in cattle that are endemic in most countries according to the WOAAH [1]. Bovine respiratory syncytial virus is a paramyxovirus with cytopathic effects, clinical signs of infection are limited to the respiratory system and vary from inapparent to severe [3]. Control is achieved by modified live or inactivated virus vaccines. Morbidity tends to be high (prevalence of antibodies in the US ranges from 60–80%) and mortality rate spans from none to 20% [4, 5]. Parainfluenza virus type 3 (PI3V) is also a paramyxovirus that is widely spread in cattle and other ruminant populations, which by itself causes subclinical to mild respiratory signs. However, PI3V infection predisposes the respiratory tract to secondary bacterial pneumonia. Inactivated and modified live vaccines are available for its control [6]. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) infection is associated with multiple disease syndromes in cattle including infectious bovine rhinotracheitis syndrome (IBR), conjunctivitis, pustular vulvovaginitis, balanoposthitis, abortion, encephalomyelitis and mastitis. Adult cattle are the principal reservoir, with high prevalence that indicates a wide distribution [7, 8]. The IBR syndrome, caused by BoHV-1 infection, is rarely fatal in mature cattle unless complicated by secondary bacterial infection of the lung. Despite the low mortality, IBR causes considerable economic losses, and an IBR-free status is required for semen and embryo trade in the European Union [7]. Bovine viral diarrhoea is caused by a pestivirus producing infections that range from subclinical to mucosal disease. It also associates with repeat breeding, abortion, foetal mummification, congenital defects, immunotolerance and persistent infections. Nonetheless, its most important effect is immunosuppression that facilitates the synergistic infection with other pathogens [9]. Enzootic bovine leukosis (EBL) is caused by a retrovirus. An overt cause of economic loss for the producer of EBLV infected cattle is the decommission of carcasses affected by lymphomatous tumours. However, more difficult to quantify is the immunosuppression that facilitates secondary infections, which cause suboptimal performance, and a diminished response to vaccination and to natural infections [10, 11]. The economic toll caused from these diseases for bovine producers in North America and Brazil has been calculated in several millions of dollars annually [6, 12].

The implicit animal welfare and economic consequences of infectious disease occurrence, due to decreased productive performance, increased mortality rates, possible reproductive failure, as well as preventive and treatment costs [7, 8, 13]; have led many countries to implement surveillance, control and eradication programmes. Further, as control programmes advance, more rigorous regulations are enacted for commercialization of gametes, live animals and animal products at regional, national and international levels [7] to avoid an increase in prevalence in endemic areas and potential outbreaks in disease-free countries.

Control and eradication programmes require an ongoing intervention through surveillance of pathogen exposure in hosts and susceptible individuals. Initial tests for establishing prevalence of a disease often rely on serological antibody identification, since the antibody registry unequivocally indicates previous or current contact of the population to an infectious agent. Moreover, the development and validation of diagnostic platforms that allow for the detection of antibodies associated to several diseases of interest in parallel (multiplex) in a single sample, potentially provide a detailed snapshot of individual exposure and allow for determination of prevalence rates. Later serological surveillance could confirm the success of vaccination programmes.

Multiplexing technologies have been increasingly used in human health diagnoses, since rapid assessment of several causative pathogen infections and/or differential identification of diseases that have similar symptoms are frequently necessary [14, 15]. In veterinary sciences, multiplexing has predominantly relied on custom assays developed in open platforms that have been mainly tailored to solve particular research demands [14, 16–18], but that have the potential to significantly increase epidemiological resources. The xMAP technology is a microsphere-based assay where beads have unique emission profiles for individual fluorescent wavelength identities that allow users to construct assays with multiple analyte sets. It is a flow-cytometry-like system that allows for each individual microsphere to be queried, and multiple readings are taken per microsphere-set, providing statistical validity and robustness to the data (for details see [19]). The aim of this study was to develop and validate a pentaplex assay, using the Luminex x-MAP platform, to detect and quantify serum antibodies directed against five viral pathogens (BRSV, PI3, IBR, BVD and EBL), as a tool to yield epidemiological data in cattle production units.

Regarding antibody detection using the xMAP technology from Luminex, five distinctive fluorophore-coded microspheres (1.25×10^6 microspheres per antigen; BioRad Laboratories, Magplex-C Microspheres, MC10051-01) were covalently bound [23] to the complete viruses or to the recombinant viral antigens, using the carbodiimide method. The antigen-antibody interaction when present was therefore specific and revealed by a second antibody (anti-bovine IgG) labelled with biotin, as an anchor for streptavidin-phycoerythrin (PE) (BioRad Laboratories, 171304501) [23, 24]. The Luminex system allows for the microspheres to be read individually using two laser diodes. The first laser (635 nm) identifies the microsphere code (specific for each virus or viral antigen) and the second laser (523 nm) excites the PE when an antibody is bound to the microsphere-linked antigens [19, 23]. The optimum amount of inclusion of sera in the assay was determined by testing sample dilutions from 1:2 to 1:32768. The best antibody binding for all antigens was obtained between 1:8 and 1:20 dilution. The detection limits of antibody quantification were estimated by serial dilutions of the polyC and reported as the highest dilution that differed from non-specific binding values (NSB) (AOAC 2002).

For monoplex and pentaplex assays in the Luminex platform, 400 antigen-bound microspheres were added per well in a total volume of 50 μ l of blocking buffer (PBS 0.01M -Sigma P3813- with 1% albumin -Sigma 7906- and 0.05% of sodium azide [NaN_3] -Sigma 199931, pH 7.4), for each viral antigen studied. Fifty microlitres of the positive or negative control samples (diluted 1:10) were then added to the reaction and plates were incubated for 2 h. Wells were subsequently washed with a PBS solution with 0.05% tween 20 (Sigma P1379), and 50 μ l of biotin-bound anti-bovine IgG were added at 1:10000 dilution and incubated for a further 2 h. After a second wash, antigen-antibody complexes were unveiled by the addition of 50 μ l of 1:100 PE in blocking buffer. Beads were subsequently rinsed and resuspended in 100 μ l wash solution. Mean fluorescent intensity (MFI) for independent antigens was measured and recorded simultaneously by the Luminex platform (Bioplex 100/200, BioRad laboratories). All assays were conducted at 25°C, with plates protected from light and under constant agitation at 300 r.p.m. throughout.

For validation of the pentaplex assay, antigens were initially evaluated within the Luminex platform as monoplex assays, using the respective monoPC and monoNC to establish cut-off points. Once the monoplex assays were standardized, according to international guidelines (AOAC 2002 [25]), validation of the pentaplex assay was conducted.

Cut-off points (measured in MFI), diagnostic sensitivity and specificity, and positive likelihood ratios ($LR+ >10$) for monoplex and pentaplex assays were determined by the receiver operating characteristics (ROC) curve method (Prism 8 GraphPad Prism - software; RRID:SCR_002798) in triplicate. Cut-off points for each disease were selected for diagnostic sensitivity and specificity values greater than 90%. The likelihood ratios for the positive results were selected at values above 10 [26].

Pentaplex assay precision was determined by repeatability (r) and reproducibility (R) parameters. For the former, polyC and FBS samples were analysed within the same assay in five replicates. An intra-assay coefficient of variation below 20% was considered adequate according to international specifications (AOAC 2002 [25]; *Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013* 2013 [27]; USPC 2019 [28]). For the latter, polyC and FBS were evaluated in quintuplicate on three independent assays. An inter-assay coefficient of variation below 20% was deemed as adequate (AOAC 2002 [25]; *Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013* 2013 [27]; USPC 2019 [28]).

Selectivity, shown by antibody binding to its particular antigen [29], was evaluated for BVDV, BoHV-1, and PI3V by binding inhibition monoplex assays. Soluble viral antigens at neat and 1:2 dilutions were added to the reaction to inhibit sample antibody binding (monoPC) to the microsphere-linked antigens. In addition, baculovirus expressing haemagglutinin antigen form the H7N3 influenza virus were added as a negative control. These assays were performed in triplicate and the results were expressed as binding percentages.

Agreement on dichotomic results (positive or negative sample status) in monoplex and pentaplex assays was evaluated in simultaneously ran tests. Sixty samples for BoHV-1, BVDV, PI3V and EBLV, as well as 44 samples for BRSV were used, and the agreement between monoplex and pentaplex assays was estimated by corrected Cohen's Kappa coefficient [30, 31].

RESULTS

Antibody quantification, which differed from non-specific binding values, was achieved for all antigens tested at sample dilutions between 1:2 to 1:1024 in both monoplex and pentaplex Luminex assays. To establish optimum true positive rate (sensitivity) and false positive rate (1-specificity) parameters, ROC curves were plotted for mono and pentaplex assays. The area under the curve (AUC) was greater than 0.97 for all antigens (Fig. 1). Mean fluorescent intensities for the positive and negative control samples and optimized cut-off points for viral antibodies are shown in Fig. 2. Diagnostic sensitivity and specificity were over 95 and 90%, respectively, with positive likelihood ratios greater than 10 in all cases (Table 2).

All assays were deemed as having an excellent precision according to Eurachem [32] and FEUM guidelines, with intra-assay coefficients of variation (r) below 10%, and inter-assay coefficients of variation (R) lower than 20% (Table 2).

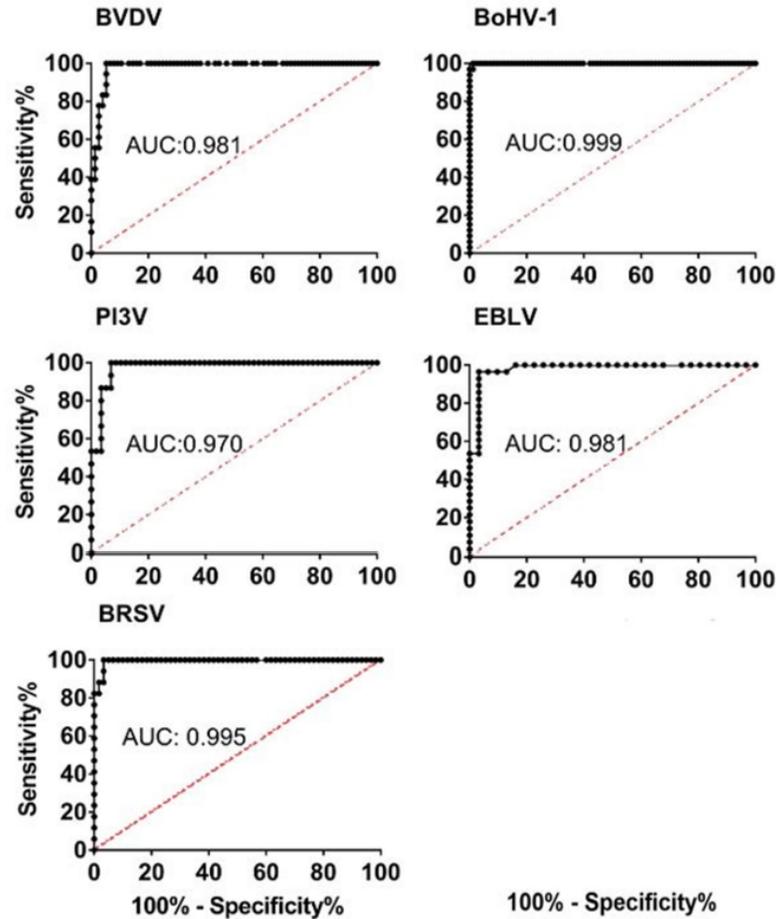


Fig. 1. ROC analyses showing diagnostic sensitivity and specificity values at different cut-off points in Luminex monoplex assays to detect serum antibodies directed against Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), Bovine Herpes virus-1 (BoHV-1), Parainfluenza virus type 3 (PI3V), Enzootic Bovine Leukosis virus (EBLV) and Bovine respiratory syncytial virus (BRSV).

Selectivity towards the viral antigens was shown by binding inhibition assays (Fig. 3) where the addition of unbound BVDV, PI3V and BoHV-1 viruses reduced MFI values. Further, the inclusion of baculovirus expressing influenza H7N3 viral antigens to the assay reaction showed low non-specific non-specificity (<5%).

To validate the pentaplex assay, established conditions for the monoplex tests were used when all antigens were combined within the same assay (pentaplex platform). The AUCs for the pentaplex assay, which are used to determine sensitivity and specificity parameters, did not differ with those obtained for the monoplex tests (Table 2). Moreover, diagnoses agreement for samples analysed simultaneously in the monoplex and multiplex assays was almost perfect for BoHV-1, EBLV, BRSV and BVDV (>0.81) and substantial for PI3V (0.61–0.80) (Table 3).

DISCUSSION

A highly sensitive pentaplex assay was validated for the identification of serum antibodies directed against BVDV, BoHV-1, PI3V, BRSV and EBLV. All antigens developed were specific and recognized by antibodies of samples that tested positive by commercial ELISA kits. In addition, a binding inhibition assay proved the selectivity of the antigens to particular viruses or viral antigens.

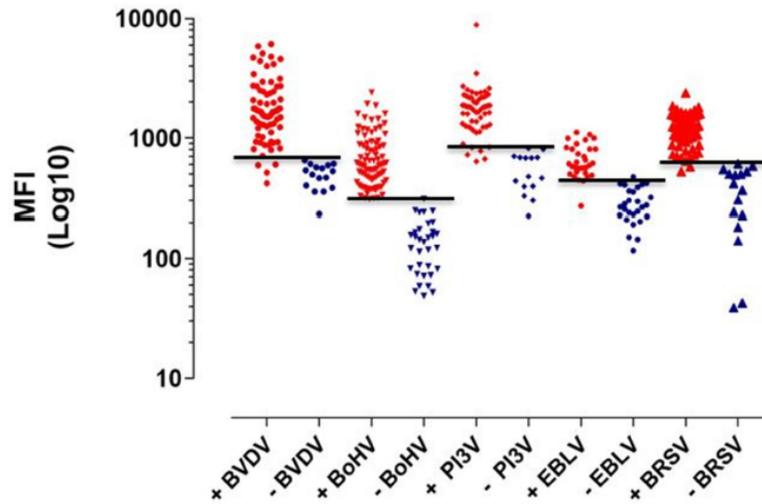


Fig. 2. Mean fluorescent intensities for positive (red) and negative (blue) control samples in monoplex assays standardized in the Luminex platform. The horizontal lines show the selected cut-off points for Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), Parainfluenza virus type 3 (PI3V), Bovine Herpes virus-1 (BoHV-1), Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), and Enzootic Bovine Leukosis virus (EBLV). (+=positive control, -=negative control for each disease tested).

Table 2. Performance characteristics of the Luminex Pentaplex assay for Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), Bovine Herpes virus-1 (BoHV-1), Parainfluenza virus type 3 (PI3V), Enzootic Bovine Leukosis virus (EBLV), and Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), antibody detection. Cut-off points values are shown in mean fluorescent intensity units (MFI). Sensitivity (Se), specificity (Sp), accuracy (AUC), positive (LR+) and negative (LR-) likelihood ratios, and coefficients of variation (CV) for reproducibility (R) and repeatability (r) of at least three assays are shown

Antigen	Cut-off (MFI)	Se (%)	Sp (%)	AUC 95%	LR+	CV (%)	
						R	r
gE2 rBVDV	683.6	100	94.7	0.981 (0.95–1.00)	19.00	11.03	4.28
BoHV-1	313.1	100	98.8	0.999 (0.99–1.00)	83.00	10.84	6.39
HN rPI3V	833.1	100	93.1	0.970 (0.95–1.00)	14.50	20.00	3.25
gP51 rEBLV	430	96.43	96.8	0.981 (0.95–1.00)	29.89	4.93	5.10
BRSV	621	100	96.67	0.995 (0.98–1.00)	30.0	9.63	3.86

Further, identification of positive and negative samples by monoplex and pentaplex assays had an almost perfect agreement. The detection limit for all diseases was effective up to a 1:1024 sample dilution.

For an equivalent number of determinations, multiplex assays have several advantages over monoplex assays. The simultaneous analyses for different antigens, with the reduction in the amount of sample, reagents and time needed for diagnosis are undoubtedly amongst the most important, facilitating epidemiological research and surveillance [24, 33]. However, no guidelines are recognized for validation of multiplex assays, and recommendations published for the standardization of single assays are typically used. Thus, assays need to be firstly validated individually (as monoplex tests) to establish conditions that are subsequently transferred to the multiplex platform [34].

In this study, both monoplex and pentaplex assays for all viral antigens showed diagnostic sensitivity and specificity above 95 and 93%, respectively, with excellent accuracies (ROC AUC >0.96). Receiver-operating characteristics (ROC) analyses calculate sensitivity and specificity parameters over an uninterrupted range of cut-off points (MFI), subsequently plotting the results. The value for the area under the curve (AUC) of such plots indicate the probability of correctly classifying the sample. A trade-off between diagnostic sensitivity and specificity is inevitable, however selected cut-off points for the assay are established when both parameters are above 90% and the AUC approaches 1, hence complying with the performance guidelines set up by regulatory bodies (AOAC 2002; [25]; *Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013* [22]), and efficiently separating between positive

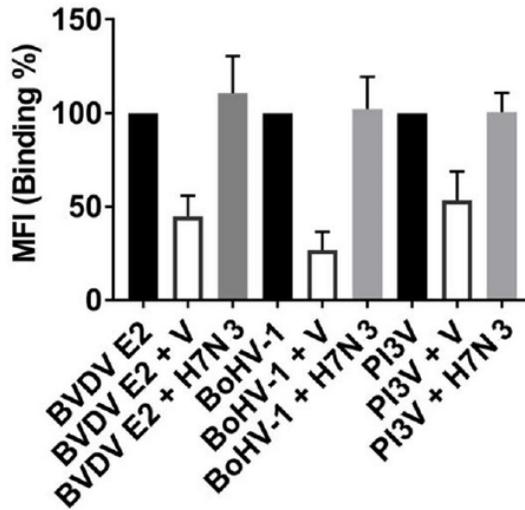


Fig. 3. Binding inhibition caused by the addition of unbound viruses to the assay reaction Bovine viral diarrhoea virus -BVDV-, Bovine Herpes virus-1 -BoHV-1-, Parainfluenza virus type 3 -PI3V-. Total binding to the assay antigen (E2 protein of BVDV; complete BoHV-1, or HN for PI3V) in the absence of unbound virus (■). The addition of unbound virus caused a reduction in MFI (□). Binding percentage when a baculovirus-H7N3 (▒) was added to test a potential antibody binding inhibition caused by the baculovirus proteins.

Table 3. Diagnoses agreement expressed by the corrected Cohen's kappa coefficient, and area under the curve (AUC) for samples analysed simultaneously in monoplex and multiplex Luminex assays for Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), Bovine Herpes virus-1 (BoHV-1), Parainfluenza virus type 3 (PI3V), Enzootic Bovine Leukosis virus (EBLV) and Bovine respiratory syncytial virus (BRSV)

Antigen	Monoplex assay AUC	Multiplex assay AUC	Corrected Cohen's kappa coefficient (k')
gE2 rBVDV	0.937	0.960	0.93
BoHV-1	0.885	0.852	0.92
HN rPI3V	0.846	0.788	0.77
gP51 rEBLV	0.832	0.830	0.86
BRSV	0.943	0.940	0.96

<0 No agreement; 0.0–0.2 slight agreement; 0.41–0.60 moderate agreement; 0.61–0.80 substantial agreement; 0.81–1.00 almost perfect agreement [30, 31].

and negative samples. Further, given the likelihood ratios observed, the probability that samples classified as positive by the assay come from animals that were indeed exposed to the field virus (since tested sera came from non-vaccinated animals) was at least 10 times greater than those with negative results [35].

Assay selectivity, shown by antibody binding to its particular antigen, was warranted firstly by either using the whole virus (BoHV-1 and BRSV) or by selecting immunodominant and highly conserved antigens present at the viral surface (gp51, HN, and gE2 for EBLV, PI3V, and BVDV, respectively). Secondly, selective binding of serum antibodies to the viral antigens was confirmed by a decreased fluorescent signal in monoplex inhibition tests [22], where soluble antigens were added to the assay reaction. Moreover, the addition of baculovirus-H7N3 to the assay did not cause inhibition of the signal, indicating that baculovirus antigens were not recognized by bovine serum antibodies and thus did not interfere with the outcome. This is relevant as the recombinant antigens used herein were produced in a baculovirus expression system.

Conveyance of performance characteristics from monoplex assays to multiplex assays may be challenging as there is the potential for assay cross-reactivity and interference between analytes [34]. However, since all antigens used for assays in this study belonged to different viral families, the possibility of cross-reactivity was scarce. This assertion was further supported by lack of homology

when paired comparisons between the sequences of all antigens were performed (BLAST data not shown, NCBI GenBank). Hence, serum antibodies directed against an antigen are unlikely to recognize a different antigen non-specifically [29, 36].

High repeatability and reproducibility were observed for all the assays validated (monoplex and pentaplex). The intra-assay (r) and inter-assay (R) coefficients of variation were within the acceptable range (i.e. below 20%) [32, 36]. Hence, all validated assays had performance characteristics to be qualified for clinical diagnosis.

Taken together, the above evidence indicates that the monoplex assays validated in this work could be successfully merged to a pentaplex platform, without altering performance parameters. Moreover, to effectively assess the diagnostic efficiency of monoplex and pentaplex formats, samples were tested in both platforms simultaneously, finding a substantial agreement for PI3V and an almost perfect agreement for BoHV-1, EBLV, BRSV and BVDV (Table 3) [31]. Thus, an efficient pentaplex assay for simultaneous antibody quantification against five viral cattle diseases with high diagnostic sensitivity, specificity and selectivity was validated for sero-epidemiological studies.

All assays were highly sensitive and able to discriminate the presence of antibodies from the 1:2 dilution. Nonetheless, the dilution that characterized the detection limit varied slightly for each antigen, with the 1:1024 dilution successfully discriminating positive samples from non-specific binding values for all five antigens tested. Albeit assays could discriminate positive samples in a wide range of dilutions, the MFI was diminished at low dilutions (1:8 or below). This counter-intuitive phenomenon (hook effect) occurs when an excess of antibodies impairs their effectiveness to form immune complexes [37]. With high dilution detection limits, a minimal volume of sample is needed for the determination of antibodies without affecting the diagnostic efficiency of the assay. This attribute is particularly useful when analysing samples combined as pools for epidemiological screening, where antibodies of a positive sample could potentially be diluted [37, 38]. A further advantage of a high sample dilution is decreasing potential interference of unrelated sample components in the assay [36], thereby reducing non-specificity. In this regard, non-specificity of the assay is also diminished by the Luminex xMAP platform since antigens are covalently bound to the surface of the fluorescent beads. This contrasts with most other assay types, where antigens are attached to the plate surface by electrostatic adsorption, leaving multiple active sites that could later bind to non-interest molecules, antibodies or the conjugate to create non-specific signals [23, 39]. Moreover, contrasting with assay platforms where the signal is developed and read in the same well where the reaction takes place, bead signal acquisition in the Luminex xMAP assays occur in a capillary where the antigen-linked beads are individually incited by a laser, reducing the possibility of reading non-specific immune complexes formed during incubation [23].

Multiplexing in its various platforms will likely substitute monoplex assays for massive serological surveillance. As with ELISA, xMAP allows for the in-house development of assays, optimizing the antigens of interest and permitting the customization of antigen panels to suit specific needs. The development of an xMAP assay is no more complicated than that of an ELISA that uses the same antigens, in most cases yielding similar or even higher sensitivity. Several multiplex assays have been developed by other research groups to study bovine diseases. Fontana *et al.* [40] created a multi-antigen assay for the serological detection of bovine tuberculosis using recombinant proteins, reporting a lack of interference in the multiplex reaction and similar signal intensity for all antigens used for both the monoplex and multiplex platforms. Others have developed assays for a single pathogen using multiple antigens with satisfactory results (Yun *et al.* 2007 [17]). Anderson *et al.* [16] devised a multiplex assay similar to the one reported herein, where BRSV, BoHV-1, BVDV and PI3V were studied using viral lysates as capture antigens. These authors found that the performance of the multiplex assay was equivalent to that of the monoplex ELISA for two of their antigens (BoHV-1 and PI3V), while it was lower for the other two (BRSV and BVDV). The reason for the later decline in performance is not clear [16]. Nonetheless, the possibility of protein interference or cross-reactivity when multiple viral lysates are used cannot be ruled out. Although a direct comparison between monoplex ELISAs and the pentaplex assay developed in this work was not made, the contrast between antigen performance in the xMap monoplex versus the pentaplex assay was similar for recombinant proteins and viral lysates.

The viruses chosen for the development of the pentaplex assay in this study (BVDV, BoHV-1, EBLV, BRSV and PI3V), have been targeted in eradication/control programmes in Europe and North America due to increasing disease prevalence [10] and the ensuing negative impact in herd health and productivity [7, 41, 42]. Eradication programmes establish prevalence by regions, and encompass preventive medicine programmes and vaccination strategies, as well as the identification, isolation and elimination of positive animals [7, 41, 42]. Nevertheless, most assessments underestimate the potential impact of secondary complications due to immunosuppression and related synergistic effects with other pathogens. Hence, costs of control and eradication programmes should be regarded as an investment, with expenses of diagnostic testing, removal of infected animals, vaccination and monitoring being factored in against reduced losses in the long term. The inception of any control programme is based on accurate knowledge of prevalences. In this endeavour, the development of efficient diagnostic tools is the corner stone for the implementation of epidemiological surveillance and control.

Funding information

This work was supported by project 32239-1463-2-VIII-12 SAGARPA-UNAM.

Acknowledgements

DGAPA, UNAM provided graduate scholarship support for RCA.

Author contributions

A.R. Conceptualization, formal analysis, investigation, methodology, writing – original draft. R.A.M. Conceptualization, methodology, supervision. A.L. Investigation, writing – review & editing. L.R.P. Investigation, writing – original draft. V.R.A. Methodology. C.G.G. Conceptualization, formal analysis, funding acquisition, supervision, writing – review & editing.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical statement

This study was revised and sanctioned by the Internal Committee for the use and care of Animals for experimental research (SICUAE) of the School of Veterinary Medicine, UNAM.

References

1. WAHIS. World animal health information system; 2020. <http://wahis.woah.org/#/home> [accessed 8 October 2022].
2. Rodriguez A, Alonso-Morales R, Lassala A, Rangel P L, Ramirez-Andoney V, et al. Development and validation of a pentaplex assay for the identification of antibodies against common viral diseases in cattle. *Figshare*. 2023. DOI: 10.6084/m9.figshare.22341601.v3.
3. Sacco RE, McGill JL, Pillatzki AE, Palmer MV, Ackermann MR. Respiratory syncytial virus infection in cattle. *Vet Pathol* 2014;51:427–436.
4. Sarmiento-Silva RE, Nakamura-Lopez Y, Vaughan G. Epidemiology, molecular epidemiology and evolution of bovine respiratory syncytial virus. *Viruses* 2012;4:3452–3467.
5. Wilkins PA, Woolums AR. Diseases of the respiratory system. In: Smith B (eds). *Large Animal Internal Medicine*, Fourth ed. Elsevier; 2009.
6. Bowland SL, Shewen PE. Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. *Can Vet J* 2000;41:33–48.
7. Iscaro C, Cambiotti V, Petrini S, Feliziani F. Control programs for infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in European countries: an overview. *Anim Health Res Rev* 2021;22:136–146.
8. Vonk Noordegraaf A, Buijtsels JAAM, Dijkhuizen AA, Franken P, Stegeman JA, et al. An epidemiological and economic simulation model to evaluate the spread and control of infectious bovine rhinotracheitis in The Netherlands. *Prev Vet Med* 1998;36:219–238.
9. Evans CA, Pinior B, Larska M, Graham D, Schweizer M, et al. Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. *Transbound Emerg Dis* 2019;66:640–652.
10. Bartlett PC, Ruggiero VJ, Hutchinson HC, Droscha CJ, Norby B, et al. Current developments in the epidemiology and control of enzootic bovine leukosis as caused by bovine leukemia virus. *Pathogens* 2020;9:1058.
11. Erskine R, Sordillo L. Bovine leukosis virus update I: prevalence, economic losses, and management. *Michigan Dairy Review* 2009;14.
12. Silva Be, Aragão BB, Pinheiro Junior JW, et al. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Economic impacts of bovine alphaherpesvirus 1 infection in Brazil: meta-analysis based on epidemiological indicators. *Semina Ciênc Agrár* 2021;42:3355–3378.
13. Betancur Hurtado C, Orrego Uribe A, González Tous M. Estudio seroepidemiológico del virus de parainfluenza 3 en bovinos del municipio de Montería (Colombia) con trastornos reproductivos. *Rev Med Vet* 2010;1:63–70.
14. Christopher-Hennings J, Araujo KPC, Souza CJH, Fang Y, Lawson S, et al. Opportunities for bead-based multiplex assays in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest* 2013;25:671–691.
15. Otoo JA, Schlappi TS. REASSURED multiplex diagnostics: a critical review and forecast. *Biosensors* 2022;12:124.
16. Anderson S, Wakeley P, Wibberley G, Webster K, Sawyer J. Development and evaluation of a Luminex multiplex serology assay to detect antibodies to bovine herpes virus 1, parainfluenza 3 virus, bovine viral diarrhoea virus, and bovine respiratory syncytial virus, with comparison to existing ELISA detection methods. *J Immunol Methods* 2011;366:79–88.
17. Langenhorst RJ, Lawson S, Kittawornrat A, Zimmerman JJ, Sun Z, et al. Development of a fluorescent microsphere immunoassay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using oral fluid samples as an alternative to serum-based assays. *Clin Vaccine Immunol* 2012;19:180–189.
18. Go YY, Wong SJ, Branscum AJ, Demarest VL, Shuck KM, et al. Development of a fluorescent-microsphere immunoassay for detection of antibodies specific to equine arteritis virus and comparison with the virus neutralization test. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:76–87.
19. Graham H, Chandler DJ, Dunbar SA. The genesis and evolution of bead-based multiplexing. *Methods* 2019;158:2–11.
20. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol* 2016;5:85–86.
21. Jacobson RH. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev Sci Tech* 1998;17:469–526.
22. OIE. Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. In: *Manual Terrestre de La OIE*. 2018. pp. 1–18.
23. Angeloni S, Das S, Jager W, Dunbar SA. xMAP® Cookbook a collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP®; 2022. www.luminexcorp.com
24. Chowdhury F, Williams A, Johnson P. Validation and comparison of two multiplex technologies, luminex and mesoscale discovery, for human cytokine profiling. *J Immunol Methods* 2009;340:55–64.
25. Association of Official Analytical Chemists. AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals, pp. 1–38; 2002. www.AOAC.org
26. Hayden SR, Brown MD. Likelihood ratio: a powerful tool for incorporating the results of a diagnostic test into clinical decision-making. *Ann Emerg Med* 1999;33:575–580.
27. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Pub. L. No. 177. México: Secretaría de salud; 2013, pp. 1–75.
28. United States Pharmacopeial Convention. *Pharmacopeia of EE*. Rockville, MD: UU, USP 42 & NF 37. Inc; 2019.
29. Vessman J, Stefan RI, van Staden JF, Danzer K, Lindner W, et al. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). *Pure Appl Chem* 2001;73:1381–1386.
30. Cerda L J, Villarreal Del P L. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Rev Chil Pediatr* 2008;79:54–58.
31. Landis JR, Koch GG. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics* 1977;33:363–374.
32. Magnusson B, Örnemark U. Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods - a laboratory guide to method validation and related topics, 2nd ed; 2014. <http://www.eurachem.org> ISBN:9789187461590
33. Bastarache JA, Koyama T, Wickersham NE, Mitchell DB, Mernaugh RL, et al. Accuracy and reproducibility of a multiplex immunoassay platform: a validation study. *J Immunol Methods* 2011;367:33–39.
34. Clotilde LM, Bernard C 4th, Salvador A, Lin A, Lauzon CR, et al. A 7-plex microbead-based immunoassay for serotyping

- Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods* 2013;92:226–230.
35. Silva Fuente-Alba C, Molina Villagra M. Likelihood ratio (razón de verosimilitud): definición y aplicación en Radiología. *Revista Argentina de Radiología* 2017;81:204–208.
 36. Findlay JW, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, et al. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal* 2000;21:1249–1273.
 37. Rey EG, O'Dell D, Mehta S, Erickson D. Mitigating the Hook effect in lateral flow sandwich immunoassays using real-time reaction kinetics. *Anal Chem* 2017;89:5095–5100.
 38. Ravindran R, Khan IH, Krishnan VV, Ziman M, Kendall LV, et al. Validation of multiplex microbead immunoassay for simultaneous serodetection of multiple infectious agents in laboratory mouse. *J Immunol Methods* 2010;363:51–59.
 39. Ray CA, Bowsher RR, Smith WC, Devanarayan V, Willey MB, et al. Development, validation, and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum. *J Pharm Biomed Anal* 2005;36:1037–1044.
 40. Fontana S, Pacciarini M, Boifava M, Pellesi R, Casto B, et al. Development and evaluation of two multi-antigen serological assays for the diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *J Microbiol Methods* 2018;153:118–126.
 41. Makoschey B, Berge AC. Review on bovine respiratory syncytial virus and bovine parainfluenza - usual suspects in bovine respiratory disease - a narrative review. *BMC Vet Res* 2021;17:261.
 42. Van Campen H. Epidemiology and control of BVD in the U.S. *Vet Microbiol* 2010;142:94–98.

The Microbiology Society is a membership charity and not-for-profit publisher.

Your submissions to our titles support the community – ensuring that we continue to provide events, grants and professional development for microbiologists at all career stages.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org

Estandarización de las concentraciones de reactivos en los inmunoensayos ELISA y Luminex®

Para determinar las condiciones del inmunoensayo, inicialmente se realizaron ELISA's de tipo indirectos donde se probaron las concentraciones de antígenos (10, 1, 0.1, 0.01. µg por pozo equivalente a 200, 20, 2 y 0.2 µg/ml) y del conjugado anti IgG unido a HRP (1/10 000 y 1/20 000) (Figura 10). Los sueros control positivo (Cp) se probaron en dilución 1:10 y los ensayos tuvieron pozos de uniones no específicas (UNE). Se eligieron las concentraciones de reactivos en las que las lecturas de densidades ópticas para el Cp fueran cercanos a 1.0 y para los UNE's menores a 0.1 (Figura 11). Las condiciones de reactivos que dieron los resultados óptimos fueron usadas para el desarrollo de los ensayos en el sistema Luminex®.

HRP		10ug			1ug			0.1ug			0.01ug							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12					
1:10 000	BO	A	1.445	1.401	1.477	1.422	1.357	1.386	1.452	1.366	1.542	1.465	1.496	1.503	PI3	suero 1:10		
	UNE	B	0.051	0.045	0.042	0.055	0.045	0.043	0.046	0.042	0.043	0.046	0.043	0.043				
1:20 000	BO	C	1.355	1.368	1.343	1.328	1.343	1.317	1.377	1.343	1.39	1.299	1.359	1.451				
	UNE	D	0.045	0.042	0.043	0.042	0.043	0.042	0.043	0.043	0.044	0.043	0.042	0.042				
1:10 000	BO	E	1.357	1.245	1.326	1.244	1.268	1.236	1.279	1.347	1.36	1.251	1.434	1.465			DVB	suero 1:10
	UNE	F	0.042	0.042	0.046	0.044	0.043	0.043	0.044	0.044	0.048	0.044	0.043	0.046				
1:20 000	BO	G	1.236	1.13	1.16	1.168	1.207	1.162	1.052	1.06	1.092	1.092	1.14	1.112				
	UNE	H	0.044	0.044	0.043	0.043	0.045	0.043	0.058	0.048	0.043	0.044	0.046	0.043				
1:10 000	BO	A	1.36	1.34	1.333	1.369	1.377	1.278	1.414	1.473	1.024	1.308	1.479	1.45	L	suero 1:10		
	UNE	B	0.043	0.044	0.044	0.043	0.042	0.045	0.044	0.044	0.044	0.043	0.044	0.044				
1:20 000	BO	C	1.09	1.11	1.052	1.084	1.131	1.104	1.041	1.1	1.199	1.118	1.224	1.211				
	UNE	D	0.046	0.045	0.046	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.045	0.043	0.044	0.051				

Figura 10. Densidades ópticas de ensayo ELISA realizado para la estandarización de PI3, DVB y LEB, se muestran las uniones no específicas (UNE) y uniones máximas (BO).

	SFB	UNE	C+cconejo	1:10	C+cconejo	1:10	Suero
	1	2	3	4	5	6	
A	0.055	0.05	1.084	1.091	0.755	1.057	VRSB
B	0.057	0.049	1.018	1.002	0.774	1.004	
C	0.057	0.052	0.709	0.815	0.551	0.87	IBR
D	0.053	0.05	0.165	0.511	0.555	0.655	
HRP 1:10 000				0.1ug/pozo	0.01ug/pozo		

Figura 11. Densidades ópticas de ensayo ELISA realizado para la estandarización de VRSB e IBR, se muestran las uniones no específicas (UNE) y uniones máximas (BO).

DESARROLLO DE LOS ENSAYOS EN LA PLATAFORMA LUMINEX® ACOPLAMIENTO DE ESFERAS A ANTÍGENOS VIRALES

Los antígenos que tienen naturaleza química proteica, incluyendo los de origen viral, son acoplados a las esferas que tienen grupos carboxilo en su superficie utilizando el protocolo de reacción de cabodiimida de dos pasos. El primer paso consiste en activar la esfera con etil-dimetil-aminopropil-carbodimida (EDC). Este compuesto reacciona con los grupos carboxilo de la esfera y forma un intermediario inestable (o-acilsourea), el cual debe estabilizarse con nihidroxisufosuccinamida (SNHS). En el segundo paso se da el acoplamiento o unión covalente donde el intermediario estabilizado reacciona con las aminas primarias de la proteína a acoplar. Las concentraciones de las proteínas virales usadas para el acoplamiento fueron de 2 µg para HN de VPI3V, gP51 de VLEB y gE de VDVB. Para los lisados virales de VRSB y de BoHV-1 (IBR) se utilizaron 5 µg. En todos los casos el acoplamiento se hizo usando 1.25×10^6 microesferas magnéticas (Bio Rad Laboratories, Magplex-C Microspheres, MC10051-01, Hercules California, USA) siguiendo el protocolo referido en el cookbook de Luminex® (Angeloni S, xMAP Cookbook, 2013).

Conteo de microesferas posterior al acoplamiento

La eficiencia de recuperación de esferas posterior al acoplamiento se calcula como el cociente del conteo de esferas al final del proceso dividida entre el total de esferas al inicio de la reacción y multiplicado por 100. Los conteos se realizaron utilizando un citómetro Scepter (Merck #). Los porcentajes de recuperación deben ser iguales o superiores al 80% (Angeloni S, xMAP Cookbook, 2013).

Verificación del acoplamiento

Con la finalidad de verificar si las microesferas acoplaron sus antígenos respectivos se realizó un ensayo con controles positivos, controles negativos y una concentración conocida del conjugado (anti IgG marcado con biotina). Este último reacciona con estreptavidina-PE, se evaluó que la muestra control positiva diera una lectura alta, que se denominó unión máxima, expresada en intensidades medias de fluorescencia (IMF) y en el control negativo se observara uniones bajas, además de añadir pozos con esferas sin acoplar, al que se le denominó uniones no específicas (UNE's).

Resultados generales del ensayo pentaplex de Luminex®

ANTÍGENOS Y LISADOS VIRALES

Derivado de la producción recombinante o del cultivo viral, se obtuvieron los antígenos recombinantes para gE2 del virus de DVB, el HN del PI3, y la glicoproteína gp51 del LEB que una vez purificados se cuantificaron en concentraciones de 8.73µg/µl de gE2 de DVB; 6.10 µg/µl de gp51 de LEB; 12.12 µg/µl de HN PI3. Los lisados virales para el herpesvirus 1 de la rinotraqueítis infecciosa bovina y el VRSB tuvieron concentraciones de 4.2 µg/µl para IBR y 4.7 µg/µl para VRSB.

RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE ANTÍGENOS Y LISADOS VIRALES EN ELISA

Resultados de acoplamiento

Después de realizar la técnica de acoplamiento se estimaron los porcentajes de La recuperación de microesferas, posterior al acoplamiento fue superior al 90%. La verificación de acoplamiento se realizó en un ensayo monoplex usando controles positivos y negativos monovalentes a cada enfermedad, y para evaluar las uniones no específicas (UNE's) se utilizaron sets de esferas sin acoplar (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados de recuperación y verificación de esferas, posterior al acoplamiento de cada antígeno

	Esferas/pozo	DVB (64)	IBR (51)	LEB (37)	PI3 (26)	VRSB (43)
Recuperación de esferas (%)		91	91.7	99	98	99
Control negativo (IMF)	400	23	39	35	36	20
UNE (IMF)	400	17	18	18	17	18

Ensayo múltiple pentaplex

El ensayo para el diagnóstico de las cinco enfermedades fue validado con los parámetros de sensibilidad (Se), especificidad (Esp) sus intervalos de confianza (IC) 95%, áreas bajo la curva (AUC) e intervalos de verosimilitud para el diagnóstico de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB. De manera general se observa que las áreas bajo la curva (AUC) para cada uno de los antígenos fueron superiores o iguales a 0.97, los puntos de corte obtenidos para cada enfermedad en todos los casos

tuvieron porcentajes de sensibilidad y especificidad, superiores al 90%. En tanto que los valores de verosimilitud positivos (LR+) fueron superiores a 10 y los valores de verosimilitud negativos (LR-) próximos a 0 (ver capítulo 3 en el apartado de resultados, cuadro 2).

Capítulo 3. Estudios de la seroprevalencia de diarrea viral bovina (DVB), parainfluenza 3 (PI3), virus respiratorio sincitial bovino (VRSB), rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y leucosis enzoótica bovina (LEB) en el hato nacional

Diseño muestral, regionalización del territorio nacional y cálculo del Tamaño Mínimo de Muestra (TMM)

Para el estudio seroepidemiológico de DVB, IBR, LEB, VRSB y PI3 en la república mexicana, se regionalizó el país en 5 zonas ganaderas (Figura 12), denominadas: zona norte (conformada por los estados de Baja California, Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, Sonora y Zacatecas), zona pacífico (Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa), zona centro (Aguascalientes, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí y Tlaxcala), zona golfo (Tabasco, Tamaulipas y Veracruz) y zona península (Campeche, Quintana Roo y Yucatán). Esta regionalización obedece a condiciones agroecológicas y de manejo en los hatos similares, además se deriva del estudio de la caracterización del ganado bovino realizada por González *et al.* (2019).

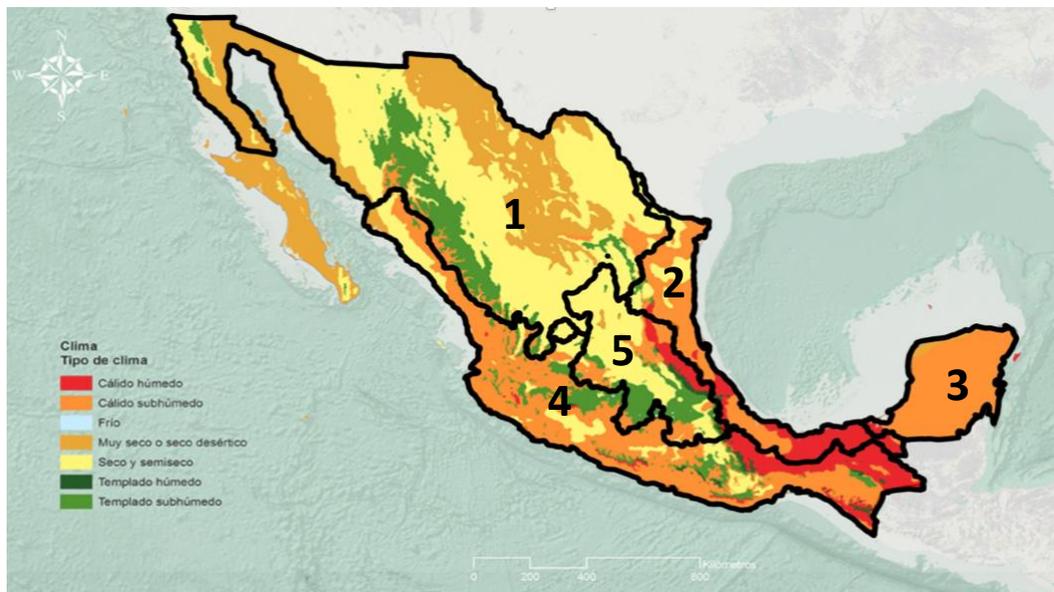


Figura 12. Mapa de climas de México, modificado con las zonas ganaderas: 1) norte, 2) golfo, 3) península, 4) pacífico y 5) centro (Modificado de: http://gisviewer.semarnat.gob.mx/aplicaciones/Atlas2015/atm_climas.html#). Autor: García, E. comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO)1998.

Estudio piloto

Para realizar el muestreo epidemiológico representativo se calculó el tamaño mínimo de muestras (TMM) considerando las prevalencias previas de un ensayo piloto con 50 muestras de cada región (Segura, 2000), se utilizó la fórmula para poblaciones finitas de variables dicotómicas descrita por Segura y Honhold (2000), con 95% de nivel de confianza y un error 0.05%:

$$n = \frac{N Z^2 \sum N_i p_i q_i}{N^2 d^2 + Z^2 \sum N_i p_i q_i}$$

Donde:

n = Tamaño de muestra

N = Tamaño de la población (total de sueros en el banco)

N_i = Número de elementos en el estrato i

p_i = Prevalencia estimada en el estrato i

q_i = $1 - p_i$

d = Precisión deseada

Z = Valor de tablas de la distribución normal estándar

De la población total de muestras de cada zona ganadera ($n= 4\ 071$ zona norte; $n= 11\ 465$ zona pacífico; $n= 9\ 180$ zona centro; $3\ 455$ zona golfo y $n=1\ 975$ de la zona península) se realizó un muestreo aleatorio simple ($n= 50$ muestras) y posterior al inmunoensayo pentaplex se estimaron las frecuencias relativas expresadas en porcentaje de cada enfermedad y para cada zona ganadera (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados del estudio piloto de las frecuencias relativas de seropositividad para las enfermedades de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB en cada zona ganadera

	DVB (%)	IBR (%)	LEB (%)	PI3 (%)	VRSB (%)
Norte	36	42	4	50	16
Pacífico	66	24	14	50	70
Centro	12	20	6	48	60
Golfo	42	6	8	64	10
Península	22	26	14	52	34

Con los porcentajes de seropositividad del ensayo piloto, se calculó el TMM para el ensayo que determinó la seropositividad de 5 enfermedades en la república mexicana usando la zona

ganadera como conglomerado. En el Cuadro 8 se observa el tamaño mínimo de muestra (TMM) calculado para cada zona y enfermedad. Para garantizar la inclusión del TMM de todas las enfermedades, se utilizó el número mayor obtenido para cada zona (en este caso, los valores de PI3).

Cuadro 8. Tamaño mínimo de muestra calculado para cada enfermedad y para cada zona ganadera de la república mexicana

	DVB	IBR	LEB	PI3	VRSB
<i>Norte</i>	265	261	75	308	206
<i>Pacífico</i>	696	600	354	818	684
<i>Centro</i>	411	484	208	703	629
<i>Golfo</i>	235	108	90	254	145
<i>Península</i>	83	84	48	111	96
Total	1690	1537	775	2195	1761

La fórmula de TMM del estudio piloto tuvo ajustes considerando prevalencias pequeñas y grandes (Jaramillo & Martínez, 2010), de acuerdo a las siguientes fórmulas.

- Prevalencias menores al 30%:

$$n = \frac{(1 - p)}{p d}$$

- Prevalencias >70%:

$$n = p / ((1 - p)d)$$

Donde:

n = tamaño mínimo de muestra

p = Probabilidad de que el evento ocurra

d = error estimado

El número de muestras calculado con 95% de confianza y 0.05% de error, por cada zona, más las 50 muestras del estudio piloto se observan en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Número de muestras analizadas para determinar la seropositividad de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB en cada zona ganadera

Zona ganadera	Número de muestras
NORTE	528
PACÍFICO	864
CENTRO	753
GOLFO	367
PENÍNSULA	174

SELECCIÓN DE MUESTRAS DE SUERO

Una vez obtenido el TMM se generaron para cada región igual cantidad de números aleatorios. Estos números aleatorios fueron usados para seleccionar las muestras a partir de la base de datos de cada región en una hoja de Excel® (Microsoft™, versión 16.7, 2019). Las muestras obtenidas incluyeron 430 municipios (Figura 13) distribuidos en la totalidad de la república mexicana.

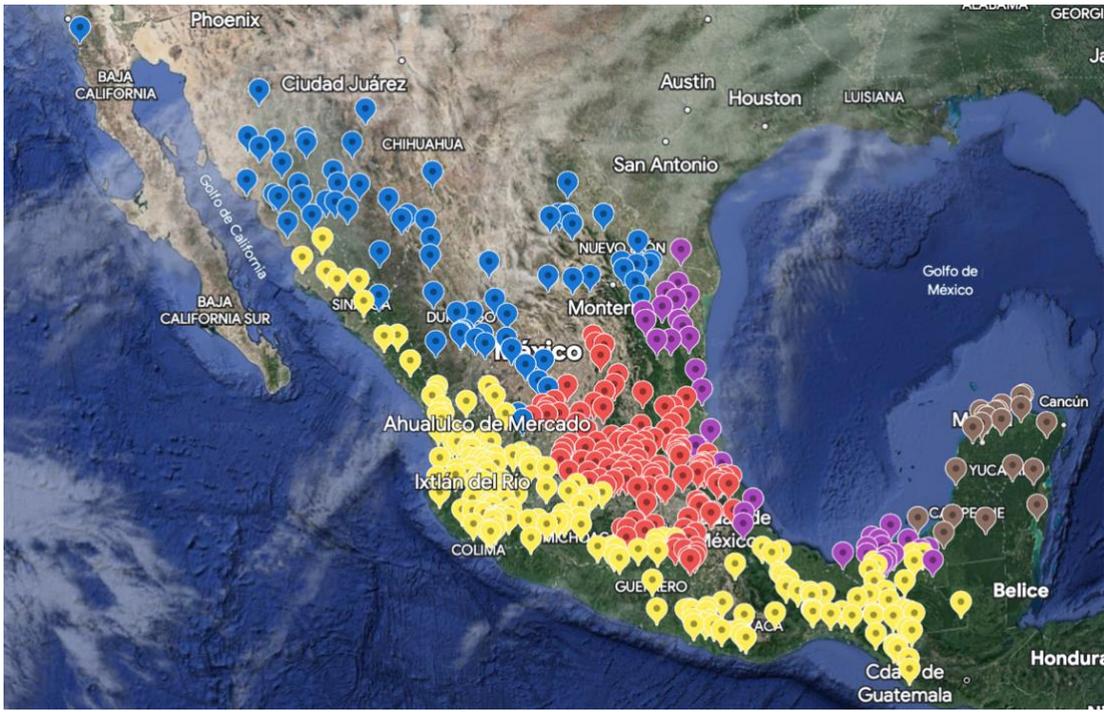


Figura 13. Representación gráfica de la distribución de los municipios incluidos en el muestreo para el análisis de seropositividad de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB. Se muestran identificadores de la zona norte en color azul, en color violeta a la zona golfo, en color café a la zona de la península, en amarillo la zona pacífico y en rojo la zona centro (elaborado con Google Earth).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los factores de riesgo asociadas a la seropositividad de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB se seleccionaron según lo descrito en la bibliografía: fin zootécnico (Ortiz *et al.*, 2020); efecto estacional (Heald *et al.*, 1992); edad de los animales (Şevik y colaboradores 2015) y tipo de servicio (Hopkins & Di Giacomo 1997). Además, de variables como sistema de pastoreo y clima (simplificado de la clasificación de García, 1990). Los datos se obtuvieron a partir de la base usada para caracterizar el sistema ganadero de bovinos en pastoreo en México (González-Padilla *et al.*, 2019).

Se realizaron cálculos de riesgos relativos y de odds ratios con sus intervalos de confianza al 95%, considerando como referencia la media de la población en estudio. En los que un valor de 1 indica la ausencia de asociación, los valores menores a 1 se tienen asociación negativa con una menor probabilidad de presencia de la enfermedad y los valores superiores a 1 indican asociación positiva, o que su presencia predispone a la seropositividad de las enfermedades (Dominguez-Lara, 2018). Del mismo modo, se consideró que si los intervalos de confianza que no contienen el 1 muestran diferencias estadísticamente significativas.

Las fórmulas para calcular el riesgo relativo (RR) y odds ratio (OR) (Jaramillo & Martínez, 2010) son:

$$RR = \left(\frac{a}{a+b} \right) / \left(\frac{c}{c+d} \right)$$

$$OR = \left(\frac{a}{b} \right) / \left(\frac{c}{d} \right)$$

Donde:

a= Expuestos seropositivos

b= Expuestos seronegativos

c= No expuestos seropositivos

d= No expuestos seronegativos

a+b= Total de expuestos

c+d= Total de no expuestos

a+c= Total de seropositivos

b+d= Total de seronegativos

El efecto de los factores de riesgo sobre la variable dependiente (logit de positivos/totales) se analizó por regresión logística. Los efectos climáticos (temperatura, humedad y su interacción) sobre la variable dependiente (logit de positivos/totales) se evaluaron en un análisis múltiple (GLMM, Generalized Linear Mixed Model). En todos los casos la región fue utilizada como variable aleatoria. Los resultados fueron re-transformados y expresados como proporción después del análisis.

Los efectos de los factores de riesgo se consideraron significativos cuando las diferencias fueron indicadas por el análisis de regresión logística ($p \leq 0.05$).

Se realizó un análisis de correlación entre las seropositividades de las enfermedades de DVB, IBR, PI3, LEB y VRSB, y se utilizó el criterio de interpretación de Cohen (1988) que indica:

0.1 a 0.3 correlación baja

0.3 a 0.5 correlación media

mayores a 0.5 correlación alta

Para realizar los análisis se utilizaron el procesador estadístico Genstat (General Statistic Program V.23 VSNi) y software Excel (Microsoft© excel©).

RESULTADOS

PREVALENCIAS GENERALES

Las frecuencias de seropositividad generales encontradas en este trabajo se muestran en el Cuadro 10. La mayor prevalencia se observa para VRSB (51.6%) y DVB (51.5%), en tanto que la menor prevalencia aparente fue para IBR (33.9%). Con los resultados obtenidos se considera que la seropositividad promedio general de las enfermedades VRSB y DVB se encuentra en niveles hiperendémicos, y en el caso de en tanto que PI3, LEB e IBR en mesoendémicos.

La seropositividad del VRSB conserva un patrón de endemidad similar en cada zona ganadera. El VRSB mostró niveles hiperendémicos en las zonas pacífico, centro y golfo. En contraste, IBR tuvo los menores niveles, siendo mesoendémica en todas las zonas e incluso reporta niveles hipoendémicos en el estado de Tlaxcala, debido a la ausencia de casos seropositivos.

Al evaluar la prevalencia aparente de las cinco enfermedades en las zonas ganaderas se puede distinguir que la zona pacífico tiene seroprevalencias hiperendémicas de manera más frecuente (4 de 5 enfermedades) que las otras cuatro regiones ganaderas, cuyos niveles de endemia predominantes son mesoendémicos.

Cuadro 10. Frecuencias de seropositividad para DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB en cada zona ganadera de la república mexicana y sus respectivos IC 95%

	DVB	IC	IBR	IC	LEB	IC	PI3	IC	VRSB	IC
Prevalencia/zona	(%)	(inf-sup)								
Norte	50.6	0.42-0.61	36.1	0.30-0.44	42.3	0.35-0.51	47.8	0.40-0.58	49.3	0.41-0.60
Pacífico	57.6	0.49-0.67	37.4	0.32-0.44	53.6	0.46-0.63	51.2	0.44-0.60	58.8	0.50-0.69
Centro	46.9	0.40-0.55	31.1	0.26-0.37	45.2	0.38-0.53	44.2	0.37-0.52	51.2	0.43-0.60
Golfo	58.3	0.47-0.73	34.6	0.27-0.44	43.3	0.35-0.54	52.9	0.42-0.66	51.2	0.41-0.64
Península	44.2	0.32-0.60	30.2	0.22-0.42	32.0	0.23-0.45	40.1	0.29-0.55	47.7	0.35-0.65
Generales	51.5		33.9		43.3		47.2		51.6	

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

Las prevalencias aparentes estatales, para cada ubicación municipal y para cada enfermedad se representaron en mapas coropléticos de las figuras: Figura , Figura , Figura y Figura . Las prevalencias estatales estuvieron en un rango de 15.79 a 94.44% para DVB (Figura 14), para IBR tuvieron un rango de 0 a 53.44% (Figura 15), LEB tuvo un rango de 14.29 a 94.44% (Figura 16), en tanto que las prevalencias aparentes estatales de PI3 estuvieron entre un rango de 10.53 a 83.33% (Figura 17) y las de VRSB estuvieron en un rango de 15.79 a 88.89% (Figura 18).



Figura 14. Mapa de la seroprevalencia general aparente para DVB en la república mexicana, mostrada en tonalidades naranja la seroprevalencia aparente estatal y en puntos rojizos se indica el municipio muestreado. La intensidad de las barras de color muestran la seroprevalencia aparente encontrada en México expresada en decimales. Realizado con el lenguaje de programación Phyton© V.2 Software Foundation 2021-2023.

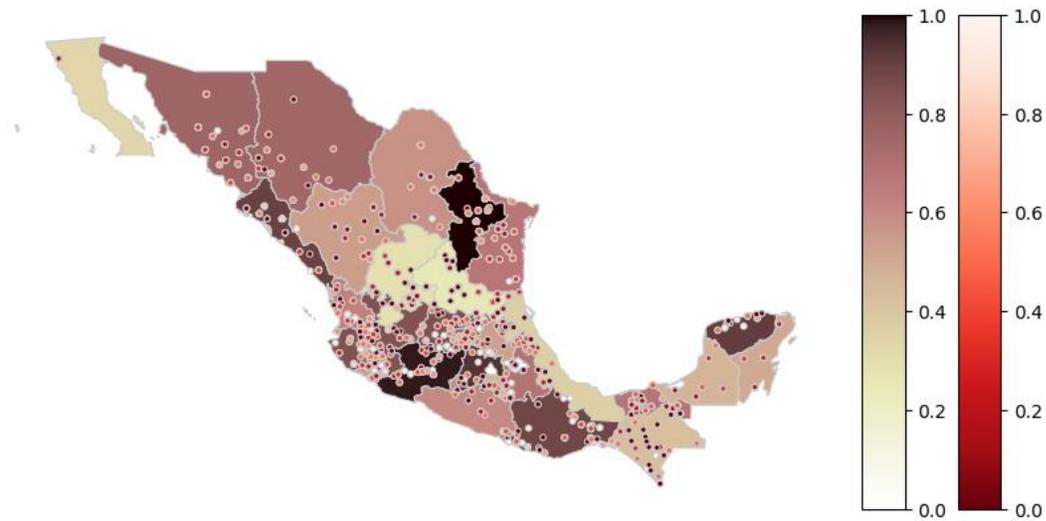


Figura 15. Mapa de la seroseroprevalencia general aparente para IBR en la república mexicana mostrada en tonalidades rosa la seroprevalencia aparente estatal y en puntos rojizos se indica el municipio muestreado. La intensidad de las barras de color muestran la seroprevalencia aparente encontrada en México expresada en decimales. Realizado con el lenguaje de programación Phyton© V.2 Software Foundation 2021-2023.

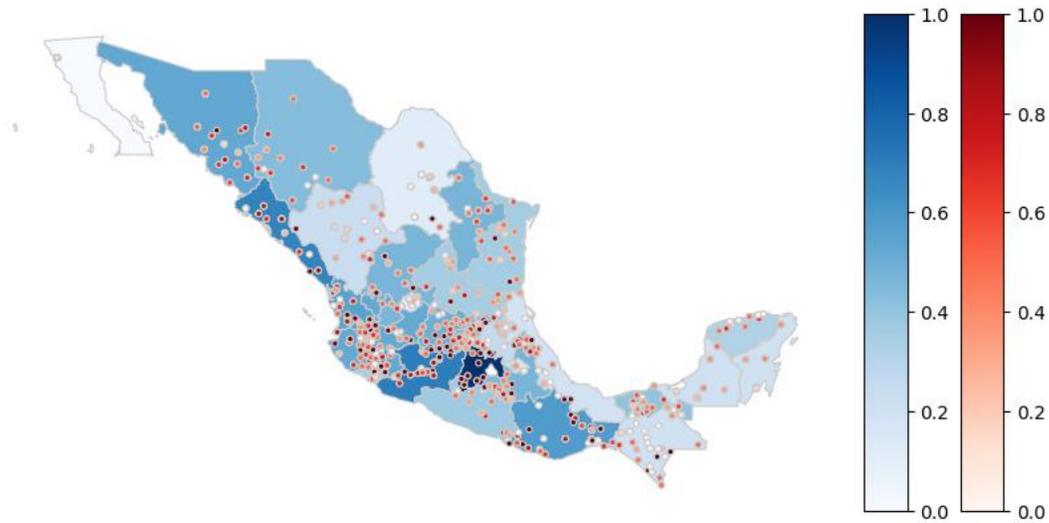


Figura 16. Mapa de seroprevalencia general aparente para LEB en la república mexicana mostrada en tonalidades azules la seroprevalencia aparente estatal y en puntos rojizos se indica el municipio muestreado. La intensidad de las barras de color muestran la seroprevalencia aparente encontrada en México expresada en decimales. Realizado con el lenguaje de programación Phyton© V.2 Software Foundation 2021-2023.



Figura 17. Mapa de la seroprevalencia general aparente para PI3 en la república mexicana mostrada en tonalidades verdes la seroprevalencia aparente estatal y en puntos rojizos se indica el municipio muestreado. La intensidad de las barras de color muestran la seroprevalencia aparente encontrada en México expresada en decimales. Realizado con el lenguaje de programación Phyton© V.2 Software Foundation 2021-2023.

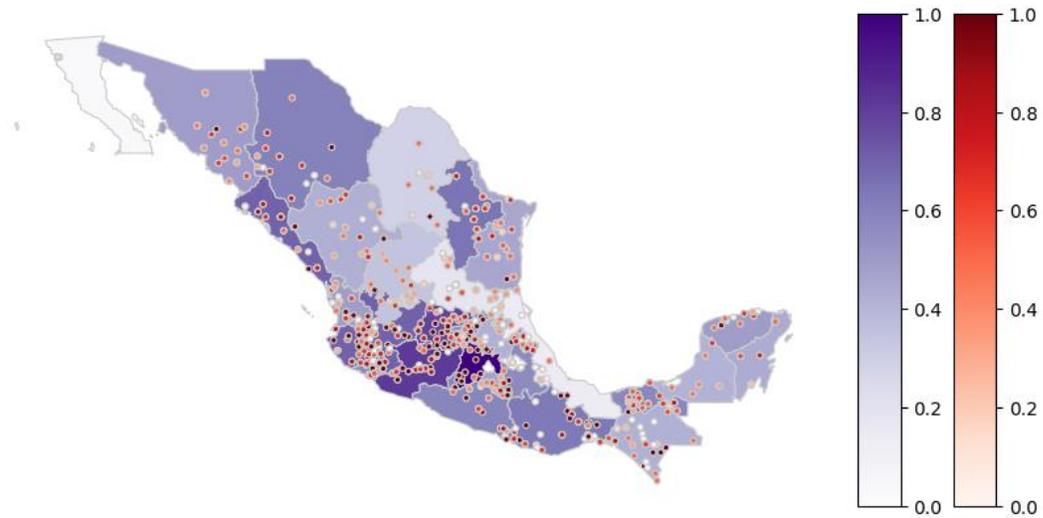


Figura 18. Mapa de la seroprevalencia general aparente para VRSB en la república mexicana mostrada en tonalidades moradas la seroprevalencia aparente estatal y en puntos rojizos se indica el municipio muestreado. La intensidad de las barras de color muestran la seroprevalencia aparente encontrada en México expresada en decimales. Realizado con el lenguaje de programación Phyton© V.2 Software Foundation 2021-2023.

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN GENERAL

Se observa que la correlación de seropositividad entre todas las enfermedades estudiadas es alta (r superior al 0.5), positiva y significativa (Figura 19). Particularmente la asociación entre DVB y VRSB es una correlación muy alta, por arriba de 0.892 ($p < 0.001$).

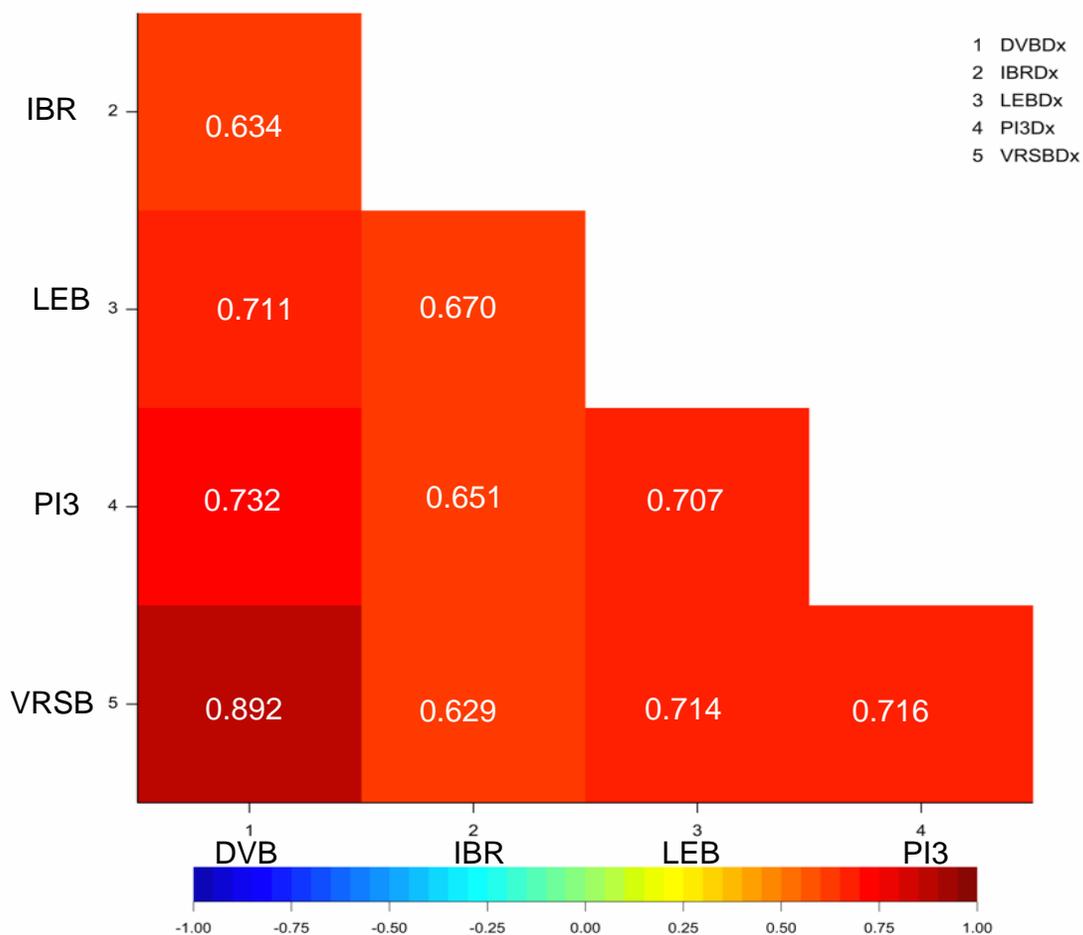


Figura 19. Coeficientes de correlación de las seroprevalencias aparentes entre las enfermedades de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB, $n=2435$ y valores de $p < 0.001$.

Análisis de seroprevalencias para DVB, de acuerdo con factores ambientales y manejos ganaderos

La Figura 20 muestra la intensidad de seroprevalencia de DVB por estado, en la república mexicana, así como su regionalización en las 5 zonas ganaderas analizadas.



Figura 20. Mapa que representa por la intensidad de coloración la seropositividad estatal a DVB en las zonas ganaderas: norte (contorno azul), golfo (contorno rosa), península (contorno café), pacífico (contorno anaranjado) y centro (contorno rojo) (Creada con Microsoft® excel®). La barra de intensidad de color muestra el rango en el que se presenta la seropositividad para esa enfermedad.

El factor de humedad resulta significativo ($p < 0.03$) para la manifestación de la enfermedad de DVB. En las zonas Subhúmedas (w_2) la probabilidad de seroprevalencia fue del 59% ($p = 0.031$), con un RR 1.15 superior a la media (Cuadro 11). En tanto que en las zonas muy áridas la seroprevalencia (30%) se reduce casi a la mitad (RR=0.56; $p = 0.031$). Contrariamente, la temperatura no mostró significancia ($p = 0.23$; Cuadro 12), ni existió interacción entre humedad y temperatura ($p = 0.36$). Con respecto a la variable de clima el RR de presentación de enfermedad para los climas áridos es 0.80 para el semicálido (SC) árido y 0.78 para el templado árido, inferior a la media nacional ($p < 0.001$) (Cuadro 13). Mientras que en el clima SC subhúmedo se observó un RR 1.23 superior a la media ($p < 0.001$) (Cuadro 13).

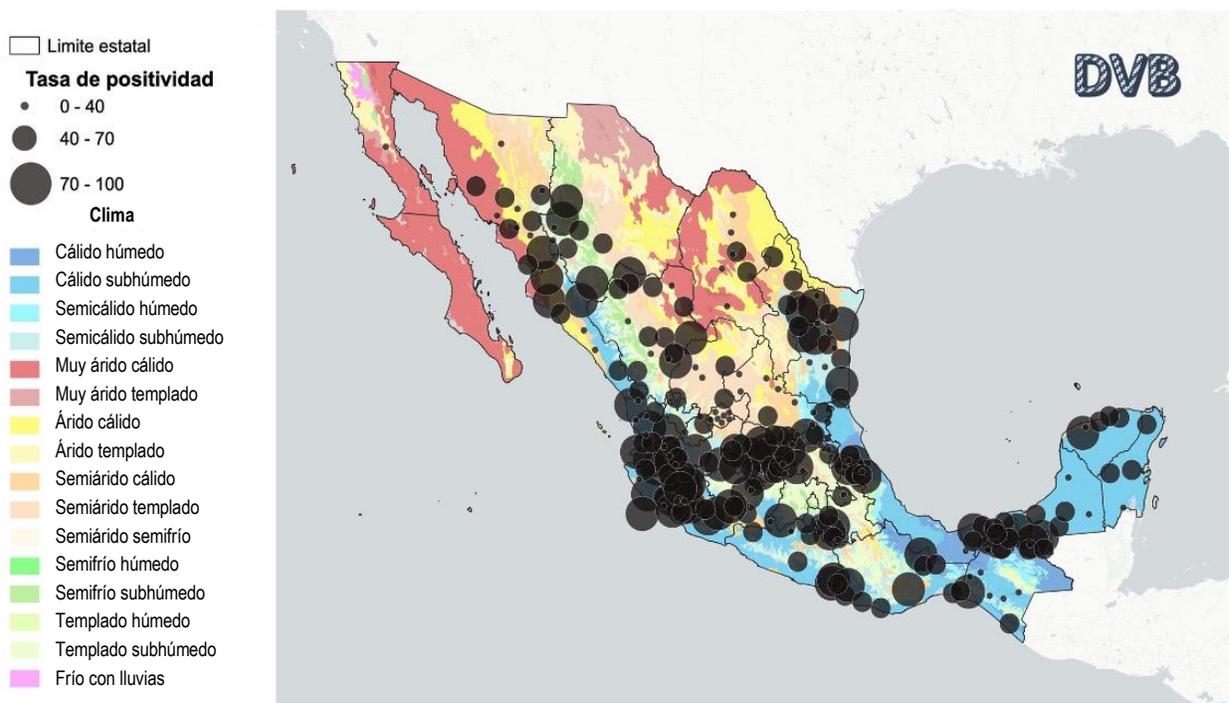


Figura 21. Seropositividad a DVB en cada municipio muestreado, se indica cada municipio con círculos negros que denotan la magnitud de seropositividad. Los municipios con $n < 2$ solo se señalaron con un punto sin denotar magnitud. Mapa elaborado con QGIS@3.30 Geographic Information System. Open-source Geospatial Foundation project (<http://qgis.org>).

Cuadro 11. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de humedad, con un IC 95%

Humedad	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Muy árido	0.30 ^a	0.21	0.40	0.031	0.56*	0.004	0.41	0.77
Árido	0.50 ^{ab}	0.40	0.60		0.95	>0.05	0.78	1.16
Seco	0.49 ^b	0.45	0.53		0.92	>0.05	0.84	1.01
Subhúmedo (w0)	0.53 ^b	0.47	0.58		1.00	>0.05	0.90	1.12
Subhúmedo (w1)	0.53 ^b	0.49	0.57		1.02	>0.05	0.94	1.12
Subhúmedo (w2)	0.59 ^b	0.54	0.64		1.15**	0.05	1.05	1.27
Húmedo (f)	0.53 ^b	0.46	0.59		1.00	>0.05	0.88	1.14
Húmedo (m)	0.57 ^b	0.50	0.63		1.09	>0.05	0.97	1.22

Literales distintas indican diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 12. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de temperatura, con un IC 95%

Temperatura	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Cálido muy cálido (CMC)	0.54	0.51	0.56	0.23	1.04	>0.05	0.89	1.21
Semi cálido (SC)	0.55	0.51	0.58		1.07	>0.05	0.98	1.17
Templado (T)	0.46	0.42	0.50		0.85*	0.02	0.76	0.94
Semi frío (SF)	0.63	0.42	0.79		1.19	>0.05	0.87	1.63

No existe diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 13. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de clima, con un IC 95%

Clima	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
CMC_árido	0.56 ^b	0.50	0.62	<0.001	1.09	>0.05	0.97	1.21
CMC_subhúmedo	0.50 ^{ab}	0.46	0.54		0.95	>0.05	0.86	1.04
CMC_húmedo	0.57 ^b	0.51	0.62		1.09	>0.05	0.99	1.21
SC_árido	0.43 ^a	0.37	0.49		0.80*	0.032	0.69	0.93
SC_subhúmedo	0.62 ^b	0.57	0.66		1.23**	0.005	1.13	1.34
SC_húmedo	0.48 ^{ab}	0.39	0.57		0.92	>0.05	0.76	1.11
T_árido	0.42 ^a	0.36	0.48		0.78*	0.012	0.67	0.90
T_subhúmedo	0.51 ^{ab}	0.44	0.57		0.97	>0.05	0.85	1.10
T_húmedo	0.56 ^{ab}	0.25	0.83		1.06	>0.05	0.59	1.90
SF_subhúmedo	0.64 ^{ab}	0.44	0.80		1.22	>0.05	0.91	1.64

Literales distintas indican diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

El tipo de empadre mostró que el empadre estacional tuvo un menor RR (0.73) de seroprevalencia positiva que el empadre continuo (RR= 1.37) ($p=0.003$; Cuadro 14). El tipo de servicio ($p=0.03$; Cuadro 15) evidencian un incremento en el RR (1.2) cuando se realiza inseminación artificial (IA), mientras que para la monta natural se observó un menor RR (0.95). Cuando se analizaron los factores productivos no se encontraron asociaciones con la seropositividad de DVB en todo el territorio nacional: fin zootécnico ($p=0.21$; Cuadro 16), número de parto ($p=0.29$; Cuadro 17) y sistema de pastoreo ($p=0.21$; Cuadro 18).

Cuadro 14. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de empadre, con un IC 95%

Tipo de empadre	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Continuo	0.54 ^b	0.52	0.57	0.003	1.37**	0.011	1.31	1.42
Estacional	0.40 ^a	0.30	0.51		0.73*	0.052	0.58	0.92

Literales distintas indican diferencia estadística.* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 15. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de tipo de servicio, con un IC 95%

Tipo de servicio	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
IA	0.63 ^b	0.54	0.72	0.02	1.20 ^{**}	0.060	1.05	1.37
Monta	0.53 ^a	0.51	0.56		0.95 [*]	0.200	0.90	0.99

Literales distintas indican diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 16. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de fin zootécnico, con un IC 95%

Fin zootécnico	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	P	IC inf.	IC sup.
Cárnico	0.52 ^a	0.49	0.54	0.21	0.95	>0.05	error	error
Doble propósito	0.54 ^a	0.50	0.58		1.05	>0.05	0.96	1.15

Literales iguales indican que no existe diferencia estadística. No se encontraron probabilidades de seropositividad que difieran en relación a la media poblacional.

Cuadro 17. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de número de parto, con un IC 95%

Número de parto	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	P	IC inf.	IC sup.
1	0.53	0.48	0.58	0.29	0.99	>0.05	0.89	1.09
2	0.52	0.47	0.56		0.96	>0.05	0.87	1.06
3	0.52	0.47	0.56		0.95	>0.05	0.87	1.05
4	0.56	0.51	0.61		1.06	>0.05	0.96	1.17
5	0.56	0.49	0.62		1.05	>0.05	0.93	1.19
6	0.60	0.52	0.68		1.13	>0.05	0.98	1.30
7	0.54	0.41	0.65		1.00	>0.05	0.80	1.25
8	0.33	0.16	0.56		0.62	>0.05	0.34	1.14
9	0.45	0.26	0.67		0.85	>0.05	0.54	1.34

No existe diferencia estadística. No se encontraron probabilidades de seropositividad que difieran en relación a la media poblacional.

Cuadro 18. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a DVB para la variable de sistema de pastoreo, con un IC 95%

Sistema de pastoreo	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Rotacional	0.53	0.51	0.56	0.21	1.05	>0.05	0.71	1.55
Alterno	0.50	0.45	0.55		0.95	>0.05	0.86	1.05
Continuo	0.49	0.42	0.55		0.92	>0.05	0.81	1.05

No existe diferencia estadística. No se encontraron probabilidades de seropositividad que difieran en relación a la media poblacional.

Análisis de seroprevalencias para IBR, de acuerdo con factores ambientales y manejos ganaderos

La Figura muestra la intensidad de seroprevalencia de IBR por estado, en la república mexicana, así como su regionalización en las 5 zonas ganaderas analizadas.



Figura 22. Mapa que representa por la intensidad de coloración la seropositividad estatal a IBR en las zonas ganaderas: norte (contorno azul), golfo (contorno rosa), península (contorno café), pacífico (contorno anaranjado) y centro (contorno rojo) (Creada con Microsoft© excel©). La barra de intensidad de color muestra el rango en el que se presenta la seropositividad para esa enfermedad.

En las temperaturas templadas (T) se observó menor riesgo de seropositividad (RR=0.86; $p=0.04$) (Cuadro 19). Referente a la humedad, se observó que el ambiente “muy árido” tiene menor riesgo de tener animales seropositivos (RR=0.57; $p=0.02$). Contrariamente el ambiente subhúmedo (w2) muestra mayor riesgo de seropositividad a IBR (RR=1.16 superior a la media) ($p=0.02$; Cuadro 20). Por otro lado, en el clima semicálido subhúmedo el RR=1.27 es mayor al promedio y en el clima templado húmedo se reduce el riesgo de seropositividad RR= 0.73 ($p<0.001$; Cuadro 21). No existió interacción entre humedad y temperatura ($p=0.35$).

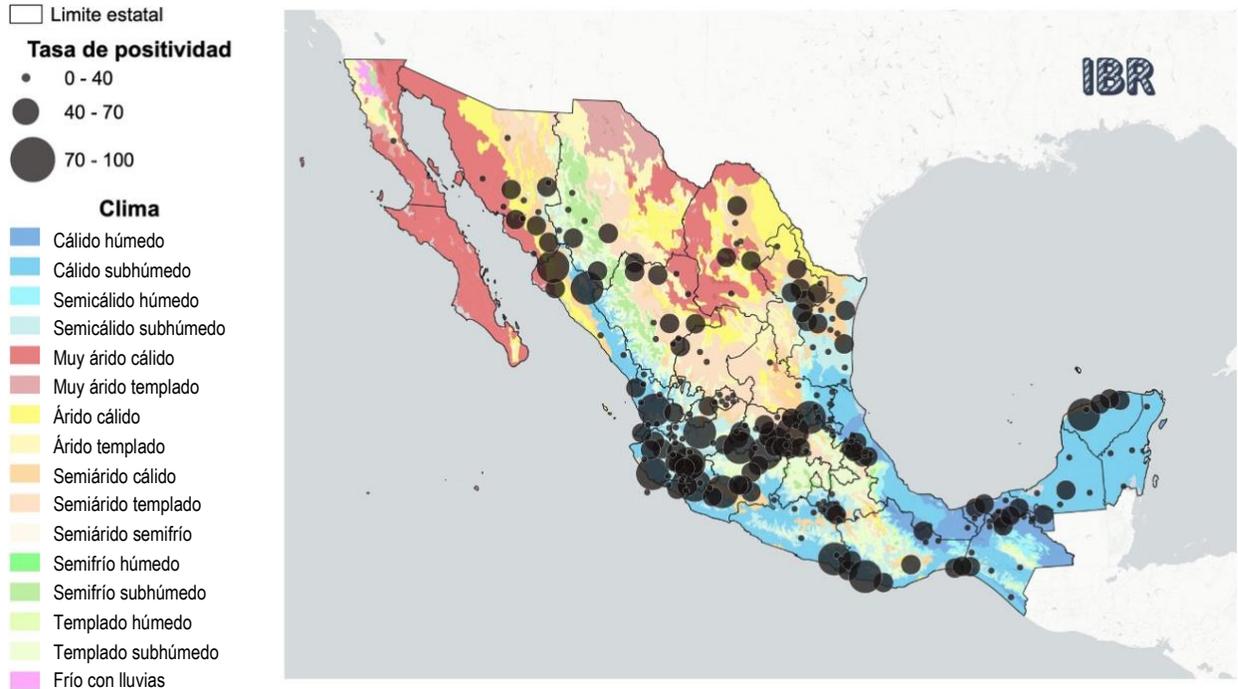


Figura 23. Seropositividad a IBR en cada municipio muestreado, se indica cada municipio con círculos negros que denotan la magnitud de seropositividad. Los municipios con $n < 2$ solo se señalaron con un punto sin denotar magnitud. Mapa elaborado con QGIS®3.30 Geographic Information System. Open-source Geospatial Foundation project (<http://qgis.org>).

Cuadro 19. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de temperatura, con un IC 95%

Temperatura	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Cálido muy cálido (CMC)	0.34 ^{ab}	0.31	0.37	0.04	0.97	>0.05	0.75	1.03
Semi cálido (SC)	0.38 ^b	0.35	0.42		1.17	>0.05	0.92	1.49
Templado (T)	0.31 ^a	0.27	0.35		0.86*	0.05	0.74	1.00
Semi frío (SF)	0.25 ^{ab}	0.12	0.46		0.72	>0.05	0.36	1.45

Literales distintas indican diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 20. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de humedad, con un IC 95%.

Humedad	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Muy árido	0.20 ^a	0.13	0.30	0.02	0.57*	0.01	0.38	0.87
Árido	0.32 ^{ab}	0.24	0.42		0.93	>0.05	0.70	1.24
Seco	0.34 ^b	0.31	0.38		0.99	>0.05	0.86	1.15
Subhúmedo (w0)	0.30 ^{ab}	0.25	0.35		0.85	>0.05	0.72	1.02
Subhúmedo (w1)	0.38 ^b	0.34	0.42		1.13	>0.05	0.98	1.30
Subhúmedo (w2)	0.39 ^b	0.34	0.44		1.16**	0.07	1.00	1.34
Húmedo (f)	0.34 ^{ab}	0.28	0.40		0.98	>0.05	0.81	1.18
Húmedo (m)	0.32 ^{ab}	0.27	0.39		0.93	>0.05	0.77	1.13

Literales distintas indican diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 21. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de clima, con un IC 95%

Clima	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
CMC_árido	0.40 ^b	0.34	0.46	<0.001	1.17	>0.05	1.00	1.37
CMC_subhúmedo	0.32 ^{ab}	0.29	0.36		0.92	>0.05	0.79	1.08
CMC_húmedo	0.32 ^{ab}	0.27	0.37		0.91	>0.05	0.77	1.08
SC_árido	0.32 ^{ab}	0.27	0.38		0.93	>0.05	0.77	1.12
SC_subhúmedo	0.42 ^b	0.37	0.46		1.27**	0.005	1.11	1.45
SC_húmedo	0.37 ^{ab}	0.28	0.46		1.06	>0.05	0.84	1.36
T_árido	0.26 ^a	0.21	0.31		1.03	>0.05	0.86	1.23
T_subhúmedo	0.35 ^{ab}	0.30	0.42		0.97	>0.05	0.38	2.43
T_húmedo	0.33 ^{ab}	0.11	0.67		0.73*	0.49	0.59	0.89
SF_subhúmedo	0.28 ^{ab}	0.14	0.48		0.81	>0.05	0.43	1.52

Literales distintas indican diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Los factores de riesgo productivos analizados para la manifestación de seropositividad de IBR en el territorio nacional no mostraron efecto para: fin zootécnico ($p=0.97$; Cuadro 22), tipo de servicio ($p=0.21$; Cuadro 26), número de parto ($p=0.81$; Cuadro 24) y sistema de pastoreo ($p=0.50$; Cuadro 25). El empadre continuo mostró mayor riesgo ($RR=1.96$) de presentar seropositividad, en tanto que en el empadre estacional fue menor ($RR=0.34$) ($p<0.001$; Cuadro 26).

Cuadro 22. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de fin zootécnico, con un IC 95%

Fin zootécnico	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Cárnico	0.35	0.32	0.37	0.97	1.00	>0.05	0.89	1.13
Doble propósito	0.35	0.31	0.38		1.00	>0.05	0.66	1.52

No se encontraron probabilidades de seropositividad que difieran en relación a la media poblacional.

Cuadro 23. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de tipo de servicio, con un IC 95%

Tipo de servicio	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
IA	0.41	0.32	0.51	0.09	1.21	>0.05	0.99	1.50
Monta	0.34	0.32	0.36		0.92*	0.25	0.87	0.98

No existe diferencia estadística.* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 24. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de número de parto, con un IC 95%

Número de parto	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	P	IC inf.	IC sup.
1	0.33	0.29	0.38	0.81	0.97	>0.05	0.82	1.14
2	0.36	0.31	0.40		1.06	>0.05	0.91	1.24
3	0.34	0.30	0.38		0.99	>0.05	0.84	1.16
4	0.34	0.30	0.39		1.00	>0.05	0.85	1.17
5	0.36	0.30	0.43		1.06	>0.05	0.88	1.28
6	0.36	0.28	0.44		1.05	>0.05	0.84	1.32
7	0.26	0.17	0.38		0.76	>0.05	0.51	1.13
8	0.24	0.10	0.47		0.69	>0.05	0.32	1.50
9	0.32	0.16	0.54		0.93	>0.05	0.50	1.72

No existe diferencia estadística. No se encontraron probabilidades menores o mayores de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 25. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de sistema de pastoreo, con un IC 95%

Sistema de pastoreo	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Rotacional	0.35 ^a	0.32	0.37	0.50	1.01	>0.05	0.92	1.12
Alterno	0.34 ^a	0.29	0.38		0.97	>0.05	0.83	1.12
Continuo	0.33 ^a	0.27	0.39		0.94	>0.05	0.78	1.13

Literales iguales indican que no existe diferencia estadística. No se encontraron probabilidades menores o mayores de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 26. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a IBR para la variable de tipo de empadre, con un IC 95%

Tipo de empadre	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Continuo	0.35 ^b	0.33	0.38	<0.001	1.96**	0.100	1.85	2.07
Estacional	0.18 ^a	0.11	0.28		0.51*	0.001	0.34	0.76

Literales distintas indican diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Análisis de prevalencias para LEB, de acuerdo con factores ambientales y manejos ganaderos

La figura 24 muestra la intensidad de seroprevalencia de LEB por estado, en la república mexicana, así como su regionalización en las 5 zonas ganaderas analizadas.

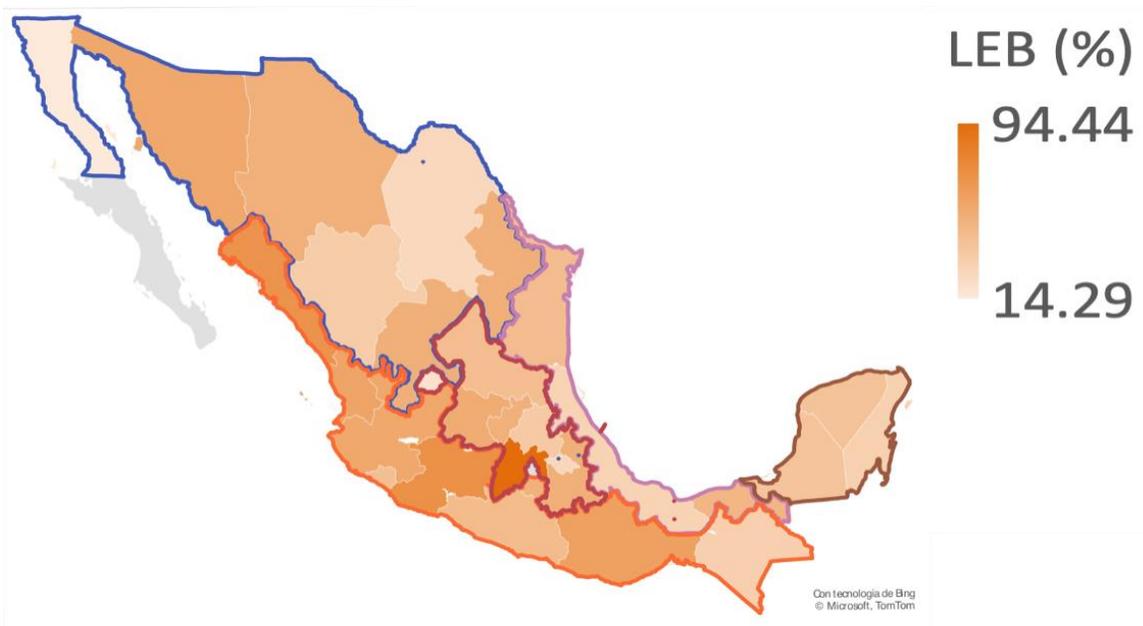


Figura 24. Mapa que representa por la intensidad de coloración la seropositividad estatal a LEB en las zonas ganaderas: norte (contorno azul), golfo (contorno rosa), península (contorno café), pacífico (contorno anaranjado) y centro (contorno rojo) (Creada con Microsoft® excel®). La barra de intensidad de color muestra el rango en el que se presenta la seropositividad para esa enfermedad.

Se encontró que la temperatura semicálida tiene un mayor RR (1.15) de seropositividad con relación al RR nacional y los ambientes templados tienen menor (RR=0.83) ($p=0.039$; Cuadro 27). Mientras que en el clima “semicálido subhúmedo” el RR es 1.23 mayor el riesgo de seropositividad a LEB, y en el clima templado árido fue menor (RR=0.70) ($p<0.001$; Cuadro 29). Para la variable

humedad, no se observó diferencia estadística ($p=0.292$; Cuadro 28), ni existió interacción entre humedad y temperatura ($p=0.08$).

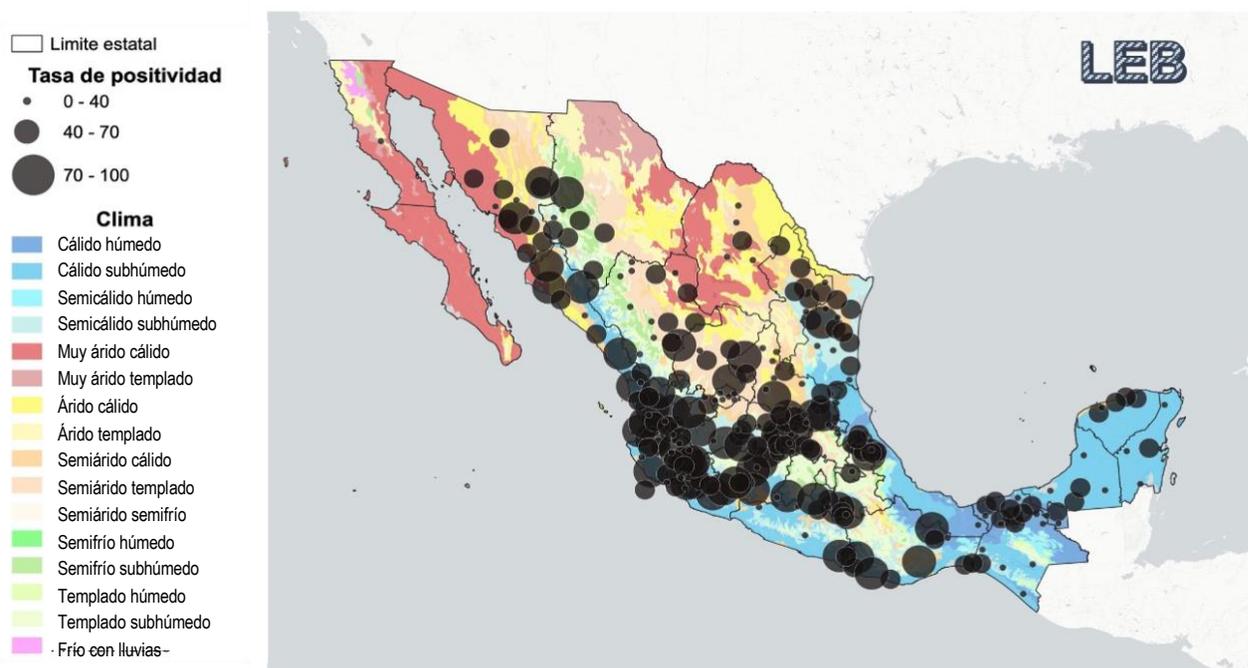


Figura 25. Seropositividad a LEB en cada municipio muestreado, se indica cada municipio con círculos negros que denotan la magnitud de seropositividad. Los municipios con $n < 2$ solo se señalaron con un punto sin denotar magnitud. Mapa elaborado con QGIS®3.30 Geographic Information System. Open-source Geospatial Foundation project (<http://qgis.org>).

Cuadro 27. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de temperatura, con un IC 95%

Temperatura	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Cálido muy cálido (CMC)	0.46 ^{ab}	0.43	0.49	0.039	0.99	>0.05	error	error
Semi cálido (SC)	0.51 ^b	0.47	0.54		1.15 ^{**}	0.030	1.03	1.28
Templado (T)	0.42 ^a	0.24	0.62		0.83 [*]	0.010	0.74	0.94
Semi frío (SF)	0.40 ^{ab}	0.36	0.44		0.90	>0.05	0.56	1.45

Literales diferentes indican diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 28. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de humedad, con un IC 95%

Humedad	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Muy árido	0.27 ^a	0.18	0.37	0.292	0.57*	0.005	0.40	0.80
Árido	0.47 ^b	0.37	0.57		1.02	>0.05	0.83	1.26
Seco	0.43 ^b	0.39	0.47		0.91	>0.05	0.82	1.02
Subhúmedo (w0)	0.48 ^b	0.42	0.53		1.04	>0.05	0.92	1.17
Subhúmedo (w1)	0.49 ^b	0.45	0.53		1.08	>0.05	0.98	1.20
Subhúmedo (w2)	0.51 ^b	0.46	0.56		1.11**	0.12	1.00	1.24
Húmedo (f)	0.45 ^b	0.39	0.52		0.98	>0.05	0.84	1.14
Húmedo (m)	0.45 ^b	0.39	0.52		0.98	>0.05	0.85	1.13

No existe diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 29. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de clima, con IC 95%

Clima	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
CMC_árido	0.50 ^{bc}	0.44	0.56	<0.001	1.08	>0.05	0.95	1.23
CMC_subhúmedo	0.45 ^b	0.41	0.49		0.97	>0.05	0.87	1.08
CMC_húmedo	0.45 ^{bc}	0.40	0.50		0.97	>0.05	0.86	1.10
SC_árido	0.42 ^{ab}	0.36	0.48		0.90	>0.05	0.78	1.05
SC_subhúmedo	0.55 ^c	0.50	0.59		1.23**	0.006	1.12	1.36
SC_húmedo	0.48 ^{ab}	0.39	0.57		1.05	>0.05	0.87	1.27
T_árido	0.34 ^a	0.28	0.39		0.70*	0.002	0.59	0.83
T_subhúmedo	0.49 ^{bc}	0.42	0.55		1.06	>0.05	0.92	1.22
T_húmedo	0.22 ^{abc}	0.06	0.58		0.48	>0.05	0.14	1.63
SF_subhúmedo	0.44 ^{abc}	0.26	0.64		0.95	>0.05	0.61	1.48

Literales iguales indican que no existe diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Para el empadre continuo se observó un mayor RR (1.68) y el empadre estacional mostró el menor RR (0.59) para presentar seropositividad a LEB ($p < 0.001$; Cuadro 31). Los factores productivos analizados no mostraron asociaciones: fin zootécnico ($p = 0.42$; Cuadro 30), tipo de servicio ($p = 0.11$; Cuadro 32) y número de parto ($p = 0.59$; Cuadro 33) ni sistemas de pastoreo ($p = 0.07$; Cuadro 34).

Cuadro 30. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de fin zootécnico, con un IC 95%

Fin zootécnico	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Cárnico	0.46	0.43	0.48	0.42	0.97	>0.05	0.76	1.23
Doble propósito	0.47	0.44	0.51		1.04	>0.05	0.92	1.16

No existe diferencia estadística. No se encontraron probabilidades de seropositividad que difieran en relación a la media poblacional.

Cuadro 31. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de tipo de empadre, con un IC 95%

Tipo de empadre	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Continuo	0.47 ^b	0.45	0.49	<0.001	1.68**	0.140	1.61	1.76
Estacional	0.28 ^a	0.19	0.39		0.59*	0.004	0.44	0.80

Literales diferentes indican que existe diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 32. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de tipo de servicio, con un IC 95%

Tipo de servicio	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
IA	0.54	0.44	0.63	0.11	1.18	>0.05	1.00	1.39
Monta	0.46	0.43	0.48		0.96	>0.05	0.91	1.01

No existe diferencia estadística. No se encontraron probabilidades de seropositividad que difieran en relación a la media poblacional.

Cuadro 33. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de número de parto, con un IC 95%

Número de parto	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	P	RR	p	IC inf.	IC sup.
1	0.45	0.40	0.49	0.59	0.96	>0.05	0.85	1.08
2	0.47	0.42	0.52		1.03	>0.05	0.92	1.16
3	0.44	0.40	0.48		0.94	>0.05	0.84	1.06
4	0.48	0.44	0.53		1.06	>0.05	0.95	1.19
5	0.47	0.40	0.53		1.01	>0.05	0.88	1.18
6	0.51	0.43	0.59		1.12	>0.05	0.94	1.32
7	0.43	0.32	0.56		0.94	>0.05	0.72	1.24
8	0.38	0.20	0.60		0.83	>0.05	0.48	1.43
9	0.32	0.16	0.54		0.69	>0.05	0.37	1.27

No existe diferencia estadística. No se encontraron probabilidades de seropositividad que difieran en relación a la media poblacional.

Cuadro 34. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a LEB para la variable de sistema de pastoreo, con un IC 95%

Sistema de pastoreo	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Rotacional	0.46	0.43	0.48	0.07	0.95	>0.05	0.83	1.10
Alterno	0.47	0.42	0.52		1.02	>0.05	0.92	1.14
Continuo	0.45	0.38	0.51		0.96	>0.05	0.83	1.11

No existe diferencia estadística. No se encontraron probabilidades de seropositividad que difieran en relación a la media poblacional.

Análisis de prevalencias para PI3, de acuerdo con factores ambientales y manejos ganaderos

La figura 26 muestra la intensidad de seroprevalencia de PI3 por estado, en la república mexicana, así como su regionalización en las 5 zonas ganaderas analizadas.



Figura 26. Mapa que representa por la intensidad de coloración la seropositividad estatal a PI3 en las zonas ganaderas: norte (contorno azul), golfo (contorno rosa), península (contorno café), pacífico (contorno anaranjado) y centro (contorno rojo) (Creada con Microsoft® excel®). La barra de intensidad de color muestra el rango en el que se presenta la seropositividad para esa enfermedad.

No se encontraron diferencias significativas con el factor temperatura ($p=0.20$; Cuadro 35). La variable humedad demuestra que la condición subhúmedo (w_2) ($RR=1.13$) y húmedo ($RR=1.15$)

tuvieron riesgos mayores de presentar seropositividad a PI3 con respecto a la media ($p=0.03$; Cuadro 36), en tanto que las condiciones muy árido y seco tienen menores riesgos (0.59 y 0.88 respectivamente) ($p=0.03$; Cuadro 36). No existió interacción entre humedad y temperatura ($p=0.10$).

En el clima semicálido subhúmedo el RR fue 1.19 con respecto a la media, en tanto que en los climas semicálido árido (RR=0.80) y templado árido (RR=0.71) se observaron menores riesgos de seroprevalencia de PI3 ($p<0.001$; Cuadro 37).

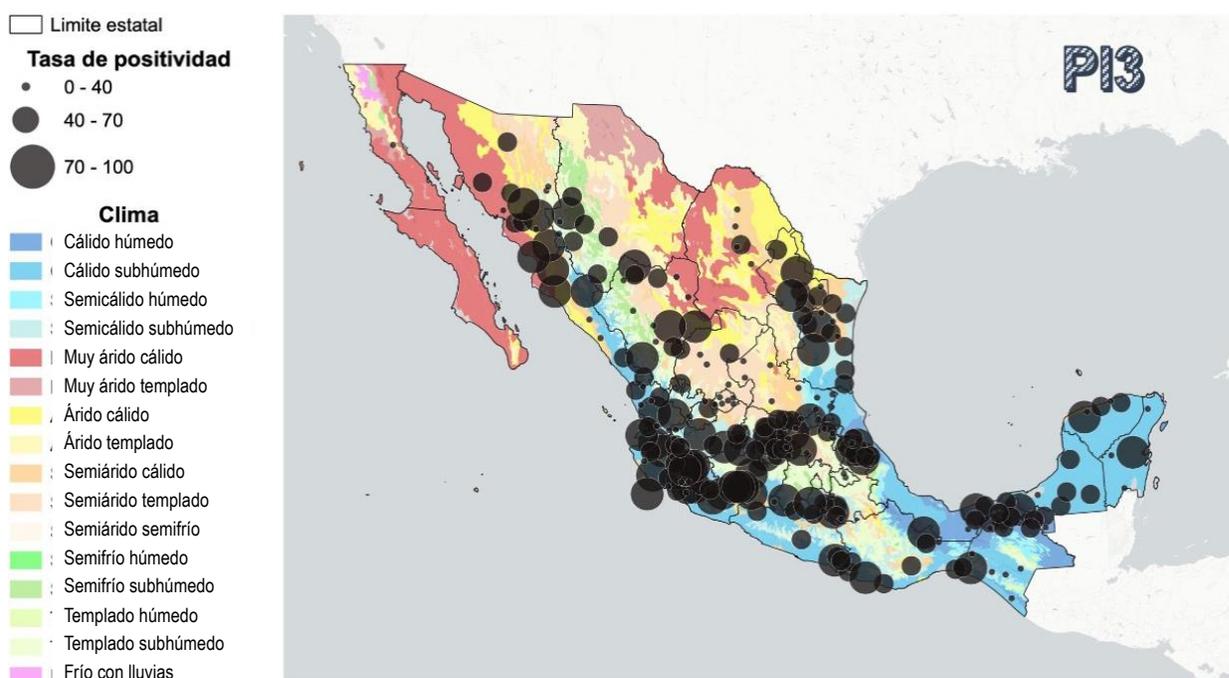


Figura 27. Seropositividad a PI3 en cada municipio muestreado, se indica cada municipio con círculos negros que denotan la magnitud de positividad. los municipios con $n<2$ solo se señalaron con un punto sin denotar magnitud. Mapa elaborado con QGIS@3.30 Geographic Information System. Open-source Geospatial Foundation project (<http://qgis.org>).

Cuadro 35. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a PI3 para la variable de temperatura, con un IC 95%

Temperatura	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Cálido muy cálido (CMC)	0.50	0.47	0.53	0.20	1.07	>0.05	0.76	1.50
Semi cálido (SC)	0.50	0.47	0.54		1.07	>0.05	0.96	1.18
Templado (T)	0.46	0.27	0.66		0.82*	0.011	0.73	0.92
Semi frío (SF)	0.41	0.37	0.45		0.95	>0.05	0.62	1.48

No existe diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 36. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a PI3 para la variable de humedad, con un IC 95%

Humedad	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Muy árido	0.29 ^a	0.20	0.39	0.03	0.59*	0.008	0.43	0.82
Árido	0.48 ^{abc}	0.38	0.58		1.00	>0.05	0.81	1.23
Seco	0.44 ^b	0.40	0.47		0.88*	0.05	0.79	0.98
Subhúmedo (w0)	0.46 ^{bc}	0.41	0.52		0.96	>0.05	0.85	1.08
Subhúmedo (w1)	0.50 ^{bc}	0.46	0.54		1.05	>0.05	0.95	1.16
Subhúmedo (w2)	0.53 ^c	0.48	0.58		1.13**	0.089	1.02	1.26
Húmedo (f)	0.49 ^{bc}	0.43	0.56		1.02	>0.05	0.89	1.18
Húmedo (m)	0.55 ^c	0.48	0.61		1.15**	0.10	1.02	1.30

Literales diferentes indican diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 37. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a PI3 para la variable de clima, con un IC 95%

Clima	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
CMC_árido	0.53 ^b	0.47	0.59	<0.001	1.11	>0.05	0.99	1.25
CMC_subhúmedo	0.47 ^{bc}	0.43	0.51		0.96	>0.05	0.86	1.06
CMC_húmedo	0.53 ^b	0.48	0.58		1.12	>0.05	1.00	1.24
SC_árido	0.39 ^{ac}	0.33	0.45		0.80*	0.03	0.68	0.93
SC_subhúmedo	0.55 ^{abc}	0.51	0.60		1.19**	0.02	1.08	1.31
SC_húmedo	0.48 ^b	0.39	0.57		1.01	>0.05	0.83	1.22
T_árido	0.35 ^a	0.30	0.41		0.71*	0.002	0.61	0.84
T_subhúmedo	0.48 ^{bc}	0.42	0.55		1.01	>0.05	0.88	1.16
T_húmedo	0.67 ^{abc}	0.33	0.89		1.39	>0.05	0.87	2.21
SF_subhúmedo	0.48 ^{abc}	0.29	0.67		1.00	>0.05	0.66	1.50

Literales iguales indican que no existe diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Al analizar los factores productivos en el territorio nacional, no se encontraron asociaciones entre seropositividad de PI3 y las variables: fin zootécnico ($p=0.16$; Cuadro 38), número de parto ($p=0.62$; Cuadro 40) y sistema de pastoreo ($p=0.77$; Cuadro 41). El empadre continuo mostró mayor RR (1.67) y el empadre estacional menor riesgo (RR=0.60) ($p<0.001$; Cuadro 39).

Cuadro 38. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a PI3 para la variable de fin zootécnico, con un IC 95%

Fin Zootécnico	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Cárnico	0.47	0.44	0.50	0.16	0.94	>0.05	0.68	1.30
Doble propósito	0.50	0.46	0.54		1.06	>0.05	0.95	1.18

No existe diferencia estadística. No se encontraron probabilidades de seropositividad que difieran en relación a la media poblacional.

Cuadro 39. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a PI3 para la variable de tipo de empadre, con un IC 95%

Tipo de empadre	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Continuo	0.50 ^b	0.47	0.52	<0.001	1.67**	0.015	1.59	1.74
Estacional	0.30 ^a	0.21	0.41		0.60*	0.005	0.45	0.80

Literales diferentes indican que existe diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 40. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a PI3 para la variable de número de parto, con un IC 95%

Número de parto	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
1	0.49	0.44	0.54	0.62	1.01	>0.05	0.90	1.13
2	0.50	0.45	0.55		1.03	>0.05	0.92	1.15
3	0.47	0.43	0.51		0.95	>0.05	0.85	1.06
4	0.48	0.43	0.53		0.98	>0.05	0.87	1.10
5	0.52	0.45	0.58		1.07	>0.05	0.93	1.22
6	0.52	0.44	0.61		1.08	>0.05	0.92	1.27
7	0.48	0.36	0.60		0.98	>0.05	0.77	1.26
8	0.29	0.13	0.51		0.59	>0.05	0.30	1.15
9	0.45	0.26	0.67		0.93	>0.05	0.59	1.48

No existe diferencia estadística. No se encontraron probabilidades de seropositividad que difieran en relación a la media poblacional.

Cuadro 41. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a PI3 para la variable de sistema de pastoreo, con un IC 95%

Sistema de pastoreo	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Rotacional	0.49	0.46	0.51	0.77	1.03	>0.05	0.87	1.22
Alternativo	0.47	0.42	0.52		0.96	>0.05	0.86	1.08
Continuo	0.47	0.40	0.53		0.96	>0.05	0.84	1.11

No existe diferencia estadística. No se encontraron probabilidades de seropositividad que difieran en relación a la media poblacional.

Análisis de prevalencias para VRSB, de acuerdo con factores ambientales y manejos ganaderos

La figura 28 muestra la intensidad de seroprevalencia de VRSB por estado, en la república mexicana, así como su regionalización en las 5 zonas ganaderas analizadas.



Figura 28. Mapa que representa por la intensidad de coloración la seropositividad estatal a VRSB en las zonas ganaderas: norte (contorno azul), golfo (contorno rosa), península (contorno café), pacífico (contorno anaranjado) y centro (contorno rojo) (Creada con Microsoft® excel®). La barra de intensidad de color muestra el rango en el que se presenta la seropositividad para esa enfermedad.

Para la seropositividad de VRSB en la república mexicana, se observó un efecto de la humedad, en el que la condición subhúmeda (w2) tiene RR mayor (1.16), mientras que en la muy árida se observó un RR inferior (0.52) ($p < 0.023$; Cuadro 43). En tanto que para temperatura no se encontró asociaciones estadísticamente significativas ($p = 0.29$; Cuadro 42). No existió interacción entre humedad y temperatura ($p = 0.35$). En el clima semicálido subhúmedo se observó el mayor RR (1.18) y los climas semicálido árido y templado árido mostraron los menores riesgos (0.81 y 0.85 respectivamente) ($p < 0.001$; Cuadro 44).

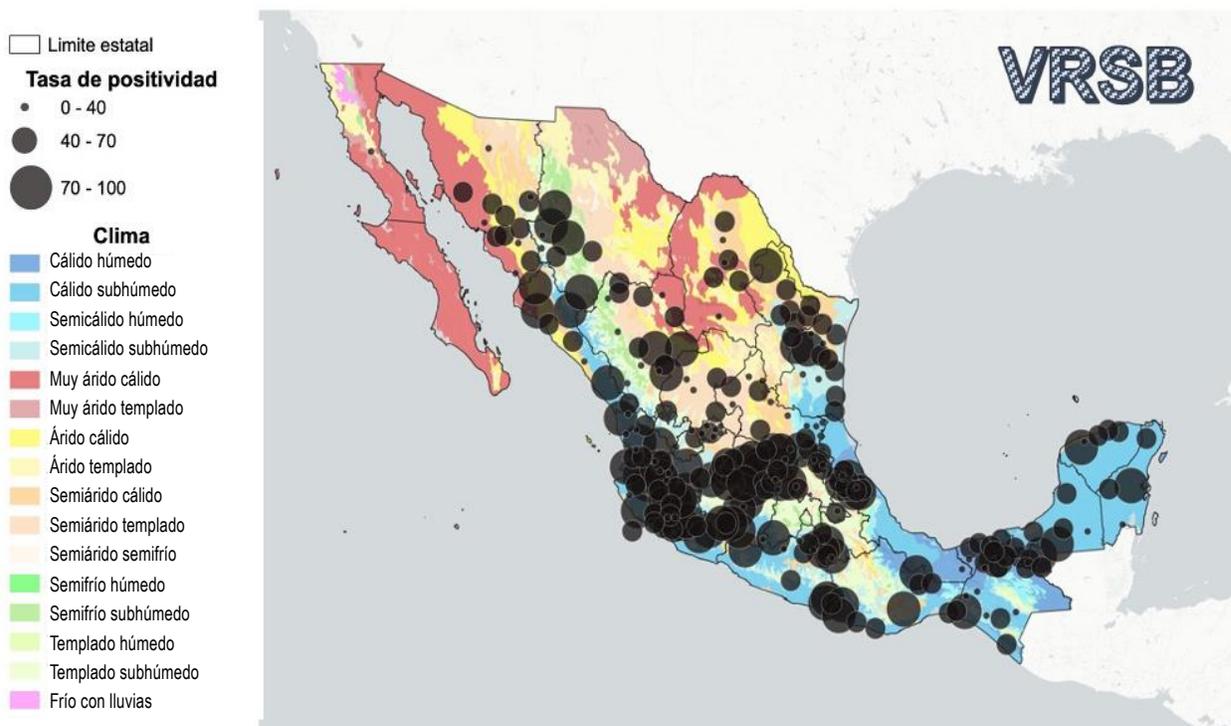


Figura 29. Seropositividad a VRSB en cada municipio muestreado, se indica cada municipio con círculos negros que denotan la magnitud de seropositividad. Los municipios con $n < 2$ solo se señalaron con un punto sin denotar magnitud. Mapa elaborado con QGIS®3.30 Geographic Information System. Open-source Geospatial Foundation project (<http://qgis.org>).

Cuadro 42. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a VRSB para la variable de temperatura, con un IC 95%

Temperatura	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Cálido muy cálido (CMC)	0.54	0.51	0.56	0.29	1.02	>0.05	0.88	1.18
Semi cálido (SC)	0.55	0.51	0.58		1.04	>0.05	0.95	1.14
Templado (T)	0.63	0.42	0.79		0.91	>0.05	0.82	1.00
Semi frío (SF)	0.49	0.45	0.53		1.18	>0.05	0.86	1.61

No existe diferencia estadística. No se encontraron probabilidades de seropositividad que difieran en relación a la media poblacional.

Cuadro 43. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a VRSB para la variable de humedad, con un IC 95%

Humedad	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Muy árido	0.28 ^a	0.19	0.38	0.023	0.52*	0.001	0.37	0.72
Árido	0.53 ^b	0.43	0.63		1.00	>0.05	0.83	1.20
Seco	0.51 ^b	0.47	0.55		0.95	>0.05	0.87	1.05
Subhúmedo (w0)	0.52 ^b	0.47	0.57		0.98	>0.05	0.88	1.09
Subhúmedo (w1)	0.55 ^b	0.51	0.59		1.05	>0.05	0.96	1.15
Subhúmedo (w2)	0.60 ^b	0.55	0.65		1.16**	0.04	1.06	1.27
Húmedo (f)	0.51 ^b	0.45	0.58		0.96	>0.05	0.85	1.10
Húmedo (m)	0.53 ^b	0.47	0.60		1.01	>0.05	0.89	1.14

Literales diferentes indican diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 44. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a VRSB para la variable de clima, con un IC 95%

Clima	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
CMC_árido	0.57 ^b	0.51	0.63	<0.001	1.08	>0.05	0.97	1.20
CMC_subhúmedo	0.53 ^{ab}	0.49	0.56		0.99	>0.05	0.90	1.08
CMC_húmedo	0.53 ^{ab}	0.48	0.58		1.00	>0.05	0.90	1.11
SC_árido	0.44 ^a	0.38	0.50		0.81*	0.03	0.70	0.94
SC_subhúmedo	0.61 ^a	0.56	0.65		1.18**	0.02	1.09	1.29
SC_húmedo	0.49 ^{ab}	0.40	0.58		0.92	>0.05	0.77	1.11
T_árido	0.46 ^{ab}	0.40	0.52		0.85*	0.06	0.74	0.97
T_subhúmedo	0.53 ^{ab}	0.47	0.60		1.01	>0.05	0.89	1.14
T_húmedo	0.67 ^{ab}	0.33	0.89		1.26	>0.05	0.79	2.00
SF_subhúmedo	0.64 ^{ab}	0.44	0.80		1.21	>0.05	0.90	1.63

Literales diferentes indican diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

El empadre continuo mostró un RR mayor (1.45) y el empadre estacional un RR menor (0.69) ($p=0.001$; Cuadro 46). No se encontraron asociaciones entre las variables fin zootécnico ($p=0.05$; Cuadro 45), número de parto ($p=0.32$; Cuadro 47), ni sistema de pastoreo ($p=0.21$; Cuadro 48).

Cuadro 45. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a VRSB para la variable de fin zootécnico, con un IC 95%

Fin zootécnico	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Cárnico	0.52 ^a	0.49	0.55	0.05	0.93	>0.05	error	error
Doble propósito	0.56 ^a	0.52	0.60		1.08	>0.05	0.98	1.18

Literales iguales indican que no existe diferencia estadística. No se encontraron probabilidades de seropositividad que difieran en relación a la media poblacional.

Cuadro 46. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a VRSB para la variable de tipo de empadre, con un IC 95%

Tipo de empadre	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Continuo	0.55 ^b	0.52	0.57	<0.001	1.45**	0.01	1.39	1.51
Estacional	0.38 ^a	0.28	0.49		0.69*	0.02	0.54	0.88

Literales diferentes indican que existe diferencia estadística. * Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 47. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a VRSB para la variable de número de parto, con un IC 95%

Número de parto	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	P	IC inf.	IC sup.
1	0.54	0.49	0.59	0.32	1.00	>0.05	0.91	1.11
2	0.53	0.49	0.58		0.99	>0.05	0.89	1.09
3	0.53	0.48	0.57		0.97	>0.05	0.88	1.07
4	0.54	0.49	0.59		1.00	>0.05	0.90	1.11
5	0.57	0.51	0.64		1.07	>0.05	0.95	1.21
6	0.6	0.52	0.69		1.14	>0.05	0.99	1.30
7	0.51	0.39	0.63		0.94	>0.05	0.74	1.19
8	0.38	0.20	0.60		0.71	>0.05	0.41	1.22
9	0.36	0.19	0.58		0.67	>0.05	0.39	1.17

No existe diferencia estadística. No se encontraron diferencias de probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 48. Prevalencia media aparente y riesgo relativo a VRSB para la variable de sistema de pastoreo, con IC 95%

Sistema de pastoreo	Prevalencia	IC inf.	IC sup.	p	RR	p	IC inf.	IC sup.
Rotacional	0.53	0.51	0.56	0.21	1.00	>0.05	0.69	1.44
Alterno	0.51	0.47	0.56		0.96	>0.05	0.87	1.06
Continuo	0.53	0.46	0.59		0.99	>0.05	0.88	1.12

No existe diferencia estadística.

En la siguiente figura (Figura) se observa que la correlación parcial entre VRSB y DVB se mantiene alta (0.71), aun después de considerar el efecto de las otras enfermedades ($r=0.711$, $p<0.001$);).

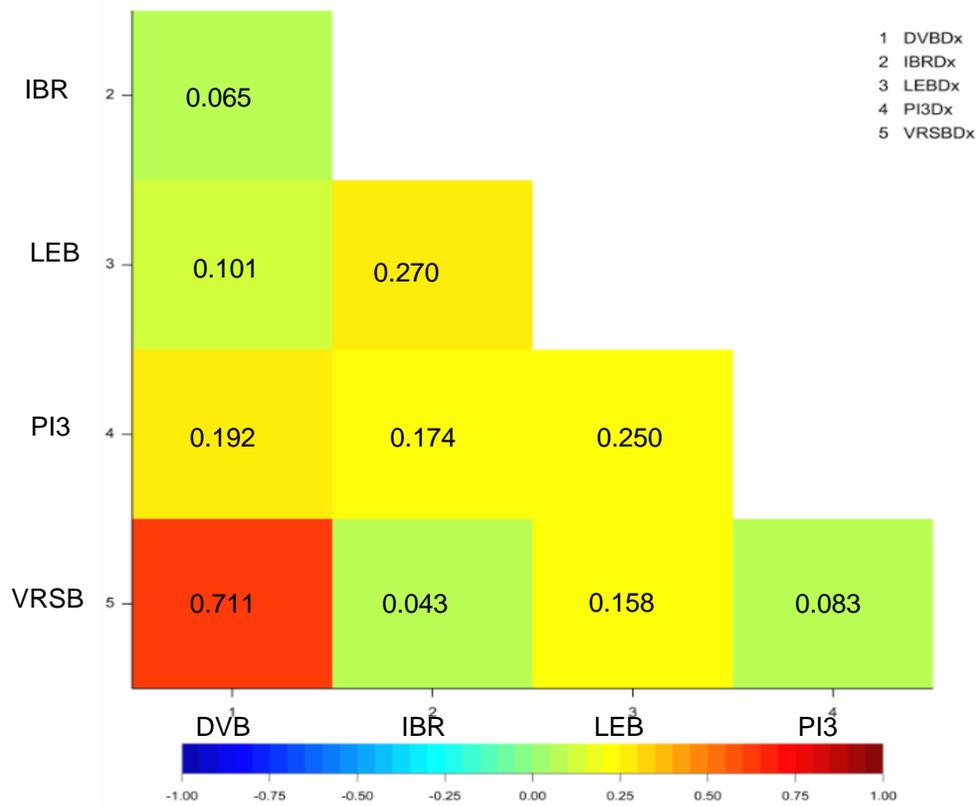


Figura 30. Coeficientes de correlación parcial de las prevalencias aparentes entre las enfermedades de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB, n=2435 y valores de $p < 0.001$.

Capítulo 4. Discusión general

Los resultados del presente trabajo muestran que en el territorio nacional (a partir de un muestreo en el periodo 2011-2012) las enfermedades estudiadas en el ganado bovino (DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB) se encuentran en rangos que las sitúan como mesoendémicas a hiperendémicas. Las seroprevalencias se determinaron en vacas adultas no vacunadas, por lo que la presencia de anticuerpos indica la exposición a los patógenos y es un reflejo del estatus sanitario del país. Adicionalmente, se encontró que, comparado con la prevalencia media nacional, la alta y la baja humedad se asocian a un mayor y menor riesgo relativo de seropositividad, respectivamente. Similarmente, el empadre continuo aumenta el riesgo relativo de seropositividad a las enfermedades, en comparación con el empadre estacional.

En este trabajo, se encontraron seroprevalencias generales que oscilan entre un mínimo de 28.9% (IBR) y un máximo de 60% (VRSB). Estos valores coinciden con los informados en estudios previos sobre el ganado de cría en pastoreo en México (Cuadro 2). Sin embargo, es importante tener en cuenta que los trabajos anteriores incluyeron un número limitado de muestras (Monroy B *et al.*, 1987; Suzan *et al.*, 1983; De la Trinidad, 2010) o se llevaron a cabo en áreas muy específicas (Abad Zavaleta *et al.*, 2016; Ríos-Utrera *et al.*, 2018), lo que restringe las inferencias que se pueden obtener. Milián-Suazo *et al.* (2016) estudiaron 182 hatos lecheros en aproximadamente un tercio de los estados de México (10 estados de la república), y encontraron prevalencias para IBR y DVB (73% y 78.8% respectivamente) superiores a las observadas en este estudio. Sin embargo, los resultados de Milián-Suazo *et al.* (2016) no son directamente comparables con los del presente trabajo, debido a que se trata de animales en un sistema productivo diferente y a la posible inclusión de animales vacunados. En el presente estudio se procuró utilizar un diseño muestral que permitiera inferir hacia la totalidad del territorio mexicano. Para ello, se realizó una prueba piloto que estableció prevalencias regionales que posteriormente se consideraron para calcular el tamaño de muestra con representatividad regional y nacional.

En otros países donde las enfermedades estudiadas son endémicas y no se realizan programas de control, las seroprevalencias reportadas son similares a las encontradas en México (Cuadro 1). Por ejemplo, India informa prevalencias de 12% a 65% para DVB (Kumar *et al.*, 2018), mientras que en Brasil llegan hasta el 90% (Almeida *et al.*, 2013). En el caso de IBR, las seroprevalencias en Europa tienen valores entre el 12 y el 45.7% (Raaperi *et al.*, 2014), mientras que Uruguay reporta el 37% en ganado productor de carne (Guarino *et al.*, 2008) y China el 35.8% (Houe & Meyling, 1991; Yan *et al.*, 2008). En cuanto a la prevalencia general de LEB en el continente americano, se estima entre el 10.4 y el 60.8% en hatos lecheros (Pulido *et al.*, 2017), y alcanza el 69% en hatos cárnicos en Japón (More *et al.*, 2017). En el caso de PI3 y VRSB las estimaciones suelen realizarse de forma conjunta, con porcentajes de prevalencia entre el 40 a 100% para Suecia

(Sacco *et al.*, 2014), y entre el 43 al 90% únicamente para VRSB, en corrales de engorda con brotes de infecciones respiratorias en Sudáfrica. En contraste, en los países en los que existen programas de control o erradicación las prevalencias se ubican por debajo de las encontradas en nuestro estudio. Un ejemplo es el caso de Dinamarca, que estableció un programa de erradicación para la DVB cuando la seropositividad era de 60 a 85% en 1991 logró erradicarla en sólo 9 años (Houe & Meyling, 1991). Se ha observado que la introducción del virus de DVB en un hato libre, tiene un impacto económico, durante el primer año, que representa pérdidas entre el 5 al 22% de la ganancia anual en países como Reino Unido, Alemania, Portugal, Holanda, Noruega e Italia (EFSA, 2017). De manera similar, en España, mediante la detección temprana de LEB y el establecimiento oportuno de un programa de control, se logró reducir la seroprevalencia máxima del 16% en las zonas de alta incidencia en 1986 al 0% en 2010. En el caso de IBR, Austria, Dinamarca, Finlandia, Noruega, Suecia y Suiza iniciaron con un rango de prevalencias del 12% al 77.5% y lograron su erradicación en aproximadamente 20 años, mediante un programa de dos etapas. En las zonas de alta prevalencia se llevó a cabo vacunación masiva y sistemática cada 6 meses, mientras que en las zonas de baja prevalencia no se utilizó la vacunación, sino la identificación y eliminación de los animales seropositivos. Durante ambas etapas, fueron fundamentales los monitoreos serológicos periódicos para realizar un seguimiento adecuado (EFSA, 2015; More *et al.*, 2017; Iscaro *et al.*, 2021; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2023).

En México, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica Nacional (SiVE) realiza monitoreos pasivos para las enfermedades endémicas. Recibe reportes mensuales de laboratorios diagnósticos, rastros, transportistas, productores y médicos veterinarios (SiVE, 14-06-2021^{*}). Desafortunadamente, la poca participación de los involucrados sesga las estimaciones. Por ejemplo, la prevalencia calculada a partir de los resultados reportados en el SiVE en el 2012, fue hipoendémica para todas las enfermedades (4.6% DVB, 2.4% IBR, 0.3% LEB, 0.2% PI3, 0.3% VRSB), y contrasta con nuestros resultados donde encontramos valores de mesoendemia para IBR, LEB y PI3 (porcentajes entre 33 y 46.5), a hiperendemia para DVB y VRSB (50.2 y 50.4 respectivamente). Todo lo anterior pone de manifiesto la necesidad de realizar campañas nacionales de diagnóstico, que demuestren el estatus sanitario real del país.

En los países donde se han implementado campañas de control de enfermedades endémicas, han comenzado evaluando el estado actual de dichas enfermedades, lo que ayuda a priorizar su manejo (Lane *et al.*, 2015). Los socios comerciales más cercanos de México, como

^{*} Acuerdo mediante el cual se dan a conocer las medidas aplicables en materia de epidemiología y de vigilancia epidemiológica en animales terrestres y el uso de la información del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en los Estados Unidos Mexicanos.

Canadá y Estados Unidos, iniciaron programas de monitoreo seroepidemiológico en 2003 para obtener un diagnóstico de la situación y caracterizar genéticamente las enfermedades endémicas (Bartlett *et al.*, 2020), así como detectar animales persistentemente infectados (PI) en el caso de la DVB (Ridpath, 2012). Cuando estos países comiencen sus programas de control y erradicación, las restricciones que impongan afectarán la comercialización de animales y sus productos. Es crucial que México inicie un diagnóstico epidemiológico activo de aquellas enfermedades que podrían representar un problema comercial, como ocurre actualmente entre los países de la Comunidad Europea para la comercialización de ganado, semen o embriones desde países con presencia de IBR, DVB y LEB hacia las zonas libres (EFSA, 2015; EFSA, 2017; EFSA, 2017a). EUA prohíbe la comercialización de ganado proveniente de hatos que no se encuentren libres de brucelosis y tuberculosis (APHIS, 2023; SADER, 2023a). En el caso de las aves y sus subproductos no procesados provenientes de México, EUA mantiene restricciones comerciales desde el 2012 a causa de la influenza aviar de alta patogenicidad, que se encuentra en nuestro territorio (APHIS, 2023).

La detección de animales seropositivos indica la exposición a los virus circulantes de campo en relación a las enfermedades analizadas. En este estudio, se consideraron únicamente vacas adultas provenientes de hatos en los cuales el encargado confirmó que no se empleaba vacunación. Es importante destacar que los anticuerpos maternos dejan de ser detectados después de los 6 meses de edad de los terneros (Margineda *et al.*, 2019; Weaver & Reisen, 2010), lo que minimiza la posibilidad de sobreestimar la seroprevalencia debido a la inmunidad pasiva en el grupo muestreado. Por otro lado, los anticuerpos producidos después de infecciones transitorias con virus de campo pueden persistir por varios meses, incluso hasta un año (Potgieter *et al.*, 1995), o en el caso del VRSB, hasta 3 años o más (Peters *et al.*, 2004; Kono *et al.*, 1982). En este contexto, las seroprevalencias encontradas podrían indicar la acumulación de anticuerpos resultantes de exposiciones al virus en diferentes momentos del pasado mediato o inmediato de la vida de las vacas, por lo que no se puede determinar el momento exacto de la infección en relación al muestreo. Para establecer una incidencia reciente, Hanon *et al.* (2016) sugieren que la mejor edad para realizar análisis de seroprevalencia es entre los 6 y 18 meses de edad de los animales, donde no hay interferencia de la inmunidad pasiva y los animales son lo suficientemente jóvenes para limitar el período en el que ocurrió la infección. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la duración de la inmunidad puede verse afectada por múltiples factores, como la dosis infectante y el estado fisiológico e inmunológico de los hospederos (Day & Schultz, 2014). Además, el tipo de virus y la cepa pueden influir en la respuesta inmunológica, por ejemplo, se sabe que el virus de LEB produce una baja seroconversión, lo que dificulta su seguimiento (Kono *et al.*, 1982).

En este estudio se encontró que el riesgo relativo de tener animales seropositivos para DVB, IBR, PI3 y VRSB se ve afectado por la humedad como componente del clima. En efecto, en las zonas subhúmedas (w2) el riesgo relativo de seropositividad incrementa entre un 13 y un 16% con respecto a la media nacional, mientras que en las regiones áridas o muy áridas el riesgo se reduce entre un 12 y un 48%. El efecto de la humedad en la resiliencia de los virus es complejo y depende de factores como la estructura del virión y la temperatura, así como la composición y el volumen de las gotas y aerosoles, que están relacionados con la velocidad de evaporación (French *et al.*, 2023). Estos factores además interactúan entre sí, afectando la estabilidad viral (Morris *et al.*, 2021). Resulta por lo tanto difícil establecer una conclusión general sobre la resistencia de los virus envueltos a la alta o baja humedad. Algunos autores mencionan, sin embargo, que en condiciones de humedad relativa alta *in vitro* (40%) los virus envueltos como el de la influenza y el SARS-Cov-2, pueden permanecer infectantes por más tiempo en aerosoles (Robertson *et al.*, 1946; Morris *et al.*, 2021). Todos los virus de las enfermedades estudiadas en este trabajo son envueltos (Sánchez-Conde, 2010), lo que pudiera explicar parcialmente el incremento observado en la prevalencia de cuatro de las enfermedades estudiadas debido al aumento de humedad.

Estudios previos han relacionado los efectos conjuntos de la humedad y la temperatura con la seroprevalencia de algunas enfermedades (Dahl *et al.* 2020; Gupta *et al.*, 2023). Se sabe que un índice temperatura:humedad (THI) mayor a 68, supera la capacidad del animal de disipar calor y conlleva a un aumento de temperatura por arriba de los límites fisiológicos, impactando el bienestar animal (Summer *et al.*, 2019). En ganado lechero el estrés calórico tiene efectos negativos en parámetros reproductivos y productivos. Similarmente, aunque el efecto de un THI alto no se aprecia en una métrica de producción diaria en ganado de cría, sus efectos provocan bajo consumo de alimento, alteraciones metabólicas y reducción del crecimiento, así como disminución de la respuesta inmune (Polsky & von Keyserlingk, 2017; Gupta *et al.*, 2023). Con relación a esto último, Dahl *et al.* (2020) mostraron que el estrés calórico provoca una caída en la capacidad fagocítica, un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias, una disminución en la producción de anticuerpos y un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que resultan en una mayor susceptibilidad a las enfermedades. De manera similar, se ha observado que la exposición prolongada al frío extremo causa un aumento en los niveles de cortisol debilitando la respuesta inmune del animal (Kim *et al.*, 2023). Por otro lado, se ha mostrado que variaciones repentinas en el clima pueden también aumentar la susceptibilidad de los animales a diferentes enfermedades (Padalino *et al.*, 2021). Las condiciones ambientales se deben a circunstancias atmosféricas y orográficas particulares de una región y su relación con la presencia o predisposición a enfermedades es estudiada por la patogeografía (Pal & Chakravarty, 2020), área que ha

permeado poco en la medicina veterinaria. Los cambios estacionales en humedad y temperatura están también relacionados con cambios en la abundancia de vectores hematófagos, que pudieran favorecer la transmisión de algunas enfermedades. Existe evidencia de que el control de las moscas de cuerno con redes mosquiteras se relaciona con una disminución en la seroconversión de las vacas a LEB (Kohara *et al.*, 2018). Más aún, se ha replicado ARN del virus de leucemia en los órganos bucales de la mosca de cuerno (García & Herrera, 2016). En este estudio no se encontró una interacción entre la humedad y la temperatura para ninguna de las enfermedades estudiadas.

Las prácticas de manejo relacionadas con el ordeño o sistemas de pastoreo intensivo, el tipo de empadre y el tipo de servicio pudieran favorecer la transmisión de las enfermedades al aumentar temporalmente la densidad o proximidad entre animales, uso de fuentes de agua o comederos, contacto con fómites etc (Hopkins & DiGiacomo, 1997; Siegwart *et al.*, 2006; Dayaram *et al.*, 2017; Labadie *et al.*, 2020). Aunque en este estudio no se encontró efecto de las dos primeras variables (ordeño y sistemas de pastoreo), el riesgo relativo de seropositividad aumentó con relación al tipo de empadre y el tipo de servicio. Los resultados muestran un mayor riesgo relativo de seropositividad para IBR, DVB y LEB con el empadre continuo (RR de 1.37 a 1.96). Por un lado, la presencia del macho en el empadre continuo favorece la transmisión viral por contacto directo al realizar comportamientos de inspección y verificación de las hembras en celo (Organización Mundial de Salud Animal OIE, 2018), o por transmisión venérea (Miller & Van der Maaten, 1982; Givens, 2018). Este hallazgo es particularmente relevante ya que el 97% de los ganaderos en México usan empadre continuo para el servicio reproductivo de las vacas (Lassala *et al.*, 2020). De manera similar, el riesgo relativo a seropositividad para DVB se incrementó con el uso de IA (RR=1.20). No existe una razón por la que la técnica de inseminación artificial, por sí misma, aumente la seroprevalencia a las enfermedades. El aumento en el riesgo relativo por la inseminación artificial es probablemente debido a deficiencias higiénicas o de bioseguridad por parte de los técnicos que realizan la inseminación (Almeida *et al.*, 2013), en el procesamiento del semen, o el uso de toros cuyo estatus sanitario se desconoce (Givens, 2018). Debe considerarse que las vacas persistentemente infectadas excretan VDVB en secreciones uterinas y vaginales (Organización Mundial de Salud Animal OIE, 2018). Adicionalmente, la gran mayoría del semen utilizado para bovinos de carne y doble propósito en México proviene de toros colectados de manera local.

Nuestra evaluación seroepidemiológica ilustra la necesidad de abordar estas enfermedades endémicas mediante un monitoreo activo, dada la alta prevalencia observada. A pesar de que nuestras muestras fueron recolectadas en 2011 y 2012, es importante señalar que no ha habido campañas nacionales significativas para controlar o erradicar las enfermedades examinadas desde esa fecha. Por tanto, podemos inferir que la prevalencia de estas enfermedades no ha disminuido

y nuestros resultados podrían ser indicativos de la situación actual. Sin embargo, es esencial realizar estudios futuros para validar estos hallazgos.

La tendencia global se inclina hacia el control o la erradicación de enfermedades endémicas, para la prevención de la reemergencia de enfermedades, la protección contra su propagación a otras poblaciones animales o humanas, la mitigación del impacto económico en los sistemas productivos, la prevención de obstáculos al comercio internacional, y la promoción del bienestar animal. Además, la prevención y el control de las enfermedades promueven el crecimiento económico y fortalecen las comunidades locales, lo que contribuye a garantizar un suministro seguro y suficiente de alimentos procedentes de hatos saludables (OIE, 2015; Health for animals.org).

En un mercado globalizado el control de las enfermedades endémicas en el ganado bovino garantiza la salud animal, y puede significar la apertura o el cierre de oportunidades de mercado y la estabilidad de la industria pecuaria. Ejemplo de esto son los controles para tuberculosis, brucelosis y garrapata, que han permitido a los estados fronterizos del norte de México exportar más de un millón de animales hacia los Estados Unidos (NOM-041-ZOO-1995; DOF, 28-01-2015*; DOF, 10-09-2012**; DOF, 30-12-2022*** y Requisitos y protocolo de cuarentena para exportar ganado bovino). La implementación de programas de control representa una inversión para el país y para el productor, sin embargo, se considera que los beneficios superan a los costos.

La OIE, ahora OMSA proporciona directrices para el control y prevención de enfermedades de reporte obligatorio a sus países miembros. Gracias a ello, los programas de control de enfermedades virales, implementados por países de la Unión Europea han tenido un impacto en la reducción de su prevalencia (Bertolotti *et al.*, 2015, Wernike, K., *et al.*, 2017, Wernike & Beer 2019; van Roon *et al.*, 2020; Stokstad *et al.*, 2020, Santman-Berends *et al.*, 2021). En los Estados Unidos, aunque no existen programas obligatorios a nivel nacional, hay programas regionales o estatales en los que se fomenta la vacunación contra IBR, DVB, PI3 y VRSB (Tennessee Agricultural Enhancement Program [TAEP]), o bien las pruebas para el diagnóstico de DVB y la eliminación de animales portadores persistentes (Wisconsin Wisconsin Department of Agriculture, Trade, and Consumer Protection [DATCP]).

* Acuerdo por el que se modifican y adicionan diversas disposiciones del similar por el que se establece la Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus spp*

** Acuerdo por el que se establece la campaña nacional para el control de la garrapata *Boophilus spp.*, Diario Oficial de la Federación

*** Acuerdo por el que se dan a conocer las Reglas de Operación del Programa de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, para el ejercicio fiscal 2023.

El nivel de prevalencia y el acceso a los recursos disponibles pueden afectar las estrategias de detección, control y erradicación de las enfermedades. Para IBR por ejemplo, un programa de control para las áreas en las que se determine una prevalencia alta debe centrarse en la vacunación, el aislamiento de los animales infectados y la implementación de medidas de bioseguridad. Para las áreas de baja incidencia, el control debe priorizar la prevención mediante el uso de vacunas, y la bioseguridad, para evitar la introducción de la infección (EFSA, 2017a). Del mismo modo, en el caso zonas con alta prevalencia de DVB, se deben utilizar pruebas de diagnóstico a gran escala para identificar y eliminar aquellos animales que sean diagnosticados como persistentemente infectados. En contraste, en áreas con una prevalencia baja el control debe incluir vacunación y medidas de bioseguridad (EFSA, 2017). Una estrategia similar a esta última debe seguirse en zonas donde exista leucosis bovina, en las que la identificación y la eliminación de los animales infectados debe ser prioritaria, así como en el establecimiento de medidas estrictas de bioseguridad que eviten el ingreso del patógeno a la unidad productiva y la generación de fómites (EFSA, 2015).

Al considerar el impacto de las enfermedades endémicas, el factor económico es crucial en la toma de decisiones. Se ha observado que el costo de las enfermedades endémicas es alto (Zanella, 2016), y se estima que las pérdidas económicas por abortos en México pueden alcanzar \$690 millones de pesos (\$28 millones de dólares USA) (Rocha-Valdez, 2020). En otros países se ha informado que los problemas respiratorios resultan en pérdidas por más de 1000 millones de dólares anuales, debido a la infertilidad, tratamientos y disminución de la producción (Bowland & Shewen, 2000; Can Mehmet Ferit *et al.*, 2016; Erskine & Sordillo, 2009 & Sordillo, 2009; Sacco *et al.*, 2014; Sarmiento-Silva *et al.*, 2012). Por otro lado, países con programas de control imponen restricciones comerciales a la compra de animales, embriones o semen de países con altas prevalencias (More *et al.*, 2017). En Brasil, Silva *et al.* (2021) estimaron pérdidas económicas superiores a 48 millones de dólares anuales por restricciones comerciales.

Finalmente, este estudio destaca las altas tasas de seroprevalencia para las enfermedades examinadas y subraya la necesidad de determinar su impacto económico y en la salud animal (Gomez-Romero *et al.*, 2021). A medida que nuestros socios comerciales adoptan programas de control, es posible que exijan a México la implementación de un diagnóstico epidemiológico activo para enfermedades que puedan representar un riesgo comercial. Además, la falta de medidas de control podría conducir a infecciones más graves debido a la aparición de nuevas variantes con tasas de letalidad más altas (DISCONTTOOLS, 2020). El seguimiento efectivo de estas infecciones se puede lograr a través de pruebas múltiples, tal como se demostró en este estudio.

Capítulo 5. Anexos

Anexo 1. Metodología

ANTÍGENOS VIRALES

Debido a que no existen comercialmente epítomos específicos para el desarrollo de pruebas diagnósticas fue necesario desarrollar antígenos recombinantes, para ello se identificaron de acuerdo a literatura, las epítomos inmunodominantes o el fraccionamiento de los virus bajo estudio.

VIRUS DE REFERENCIA

Para el virus sincitial respiratorio bovino se utilizaron las cepas 375 (#VR-1339) y la Iowa FS-1(#VR-1485). Para el virus de la diarrea viral bovina, se usó la cepa NADL (#VR-1422). Para el herpesvirus bovino, se utilizó el herpesvirus 1 de la rinotraqueítis infecciosa bovina cepa IBRV NG dltk (#VR-2112). Para el virus de parainfluenza 3 bovina, se empleó la cepa SB (#VR-739). Para el virus de Leucemia bovina, se utilizaron células BL3.1 ATCC (#CRL – 2306). Todos estos aislados virales fueron obtenidos del ATCC (<http://www.atcc.org/>).

CULTIVO CELULAR, INFECCIÓN Y PROPAGACIÓN VIRAL

Los virus fueron propagados en células MDBK a 37°C en medio MEM suplementado con suero fetal de bovino (SFB) al 10% hasta alcanzar una confluencia del 80% para poder infectarlas con los virus de: Diarrea Viral Bovina (VDVB), Leucemia Bovina (LEB), Parainfluenza 3 (VPI3), Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB) y Rinotraqueítis infecciosa bovina (VIBR); después de una hora de incubación a temperatura ambiente, se agregó medio de cultivo suplementado con antibiótico y sin SFB, y se incubaron a 37 °C hasta observar efecto citopático, que en el caso de IBR fue de 48 horas; PI3 24 horas; VRSB 36 horas; VDVB y LEB: 72 a 96 horas. Una vez observado el efecto citopático, las botellas de cultivo se congelaron a -70 °C durante 24 horas. Posteriormente, se descongeló y se decantó el sobrenadante en tubos Falcon para ser centrifugados (5,000 g, 20 min), posteriormente se alicuotaron los sobrenadantes y se almacenaron a -70 °C.

Los virus de PI3, IBR, VRSB y VDVB se titularon por dilución limitante en placas de microtitulación empleando diluciones decuples seriadas desde 1/10¹ a 1/1x10⁶ por duplicado con el método Reed and Muench (1938). Para el caso del virus de leucemia bovina se realizó por la técnica ELISA.

AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES VIRALES

A partir de los cultivos virales se obtuvo el material genético viral de VRSB, VP1-3 y LEB, que fueron extraídos usando protocolos de TRIZOL (Sambrook & Maniatis, 1985). A partir de los purificados, los genes se amplificaron por transcripción reversa y PCR (RT-PCR). Para ello, se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos a partir de las secuencias de nucleótidos reportadas en el GenBank: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/GenbankSearch.html>), obteniendo los siguientes iniciadores:

Cuadro 49. Antígenos recombinantes para LEB, DVB y PI3. Se muestran los datos de tamaño, identificación de acceso a GeneBank y secuencia

GENE	AMPLIFICADO (pb)	ACCESO GENBANK	SECUENCIA
GP51 DE LEB	1570pb	AY078387	BLVF 5' AT GGATCC GATGCCYAAAG AACGACGGTCCCG 3'; BLVRHis 5' AT GGATCC TCA GTGGTGGTGGTGGTGGTGGGCAGGGTCGRAGGTTGATGTAATCG 3'
E2 DE VDVB	1165pb	AJ133738	E2DVBF 5' AT GGATCC GATCC gCTGATAACAGGRGYGCAAGG 3'; E2DVBRhis 5' AT GGATCC TTA GTGGTGGTGGTGGTGGTGTG CTGATAAGACCATGTATGTRACCAG 3')
HN DE PI3	1,719pb	AF178655	Gen HNBPI3F 5' AT GGATCC gATGGAATATTGAAACACAC 3'; HNBPI3Rhis 5' AT GGATCC TTA GTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGCAGTTTTTCGGAAC 3'

A partir de estos iniciadores se pudieron amplificar cada uno de los genes virales y ser clonados en los sitios de corte BamH1 del vector de movilización a baculovirus pFastBacHa (sistema BacToBac de Invitrogen <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/10584027>), con una secuencia de seis histidinas presente dentro de la construcción que permitía que los antígenos recombinantes fueran purificados con columnas de afinidad de agarosa níquel (Bornhorst & Falke, 2000).

Posteriormente, los vectores plasmídicos pUC19 y pFastBacHTa fueron cultivados hasta obtener al menos 1 mg de ácido nucleico. Con el ADN de los plásmidos purificado con columnas de afinidad (Kit Mega, QIAGEN) se transformaron bacterias competentes *E. coli DH5alfa* seleccionadas por medio de LB-ampicilina. Posteriormente el ADN fue digerido con las endonucleasas Sma1 (pUC19-T) y BamH1 (pFastBacHT). La digestión fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa y por transformación bacteriana hasta tener menos de 5×10^3 UFC/ μ g ADN. Posteriormente el plásmido pFastBacHT fue desfosforilado y al ADN del plásmido pUC19 se le adicionaron colas

de timina usando *Taq*ADNpolimerasa. La evaluación final se determinó con la inserción de un ligando control al plásmido, se verificó la orientación de la clonación y se cuantificó el número de clonas recombinantes, así como la verificación de su identidad por secuenciación de nucleótidos.

Las clonas recombinantes correctamente orientadas se crecieron para obtener ADN y transformar células DH10BAC, y se seleccionaron por resistencia a tres antibióticos y se obtuvieron por transposición sitio específica, clonas recombinantes en Báculos. El sistema Bac to Bac permite seleccionar las clonas transpuestas por color al crecerlas con IPTG y X-Gal, las clonas se verificaron por PCR y se obtuvo su ADN.

Posteriormente, con este ADN purificado de los báculos recombinantes se transfectan células de insecto *Sf9*. Inicialmente se mezcló el ADN con liposomas (Cellfectin Gibco BRL - 10365-010) y después se agregaron a las células de insecto. Se obtuvo una suspensión con el baculovirus recombinante, se realizó un segundo pase de los baculovirus recombinantes (infectando con 0.7×10^6 células *Sf9*/ml por 48 horas) (www.invitrogen.com). Para la extracción de ADN de los baculovirus se diluyó el sobrenadante de cultivo celular 1:10 en buffer K, se mezcló con vortex, e incubó por 1h a 55 °C, y después por 10 minutos más a 95°C, se toman muestras para llevarlas a diluciones de 1:10 y 1:100 y evaluarlas por duplicado, al final de la producción de antígenos recombinantes, fueron titulados por ELISA.

Para determinar el título de baculovirus, se obtuvo por PCR en tiempo real al relacionarlo con una curva estándar de ADN (pGp64). Condiciones de ensayo: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg. y 60°C por 45 seg. Se consideró que 1ng del ADN del pGp64 contiene 3.07×10^9 moléculas.

CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS

Para poder optimizar y evaluar los ensayos monoplex y multiplex, se inició con la obtención de muestras control positivo en el formato monoplex (monoCp) y muestras conocidas como negativas (monoCn) para cada una de las enfermedades, a partir de los resultados obtenidos en ensayos ELISA comerciales Idexx BVDV (#99 4400), IBR Ab (#99 – 41459), PI3 (#P00652-2), VRSB (#P00651-2) LEB (#P02110-5) (Idexx Laboratoires, Westbrook, Maine, USA). Se probaron 125 muestras del banco de sueros de la FMVZ, provenientes de animales no vacunados, de los resultados de los ensayos ELISA comerciales se lograron identificar 84 muestras positivas y 41 negativas a DVB; 89 positivas y 35 negativas a IBR; 75 sueros positivos y 16 negativos a PI3; 73 muestras positivas y 18 negativas a VRSB y 44 sueros positivos y 44 negativos a LEB. De estas poblaciones, se identificaron 7 sueros que resultaron positivos a las 5 enfermedades, y se realizó un pool para ser utilizado en los ensayos múltiples como control positivo, al que se denominó como

control positivo polivalente (polyCp) y debido a que no se encontraron sueros negativos a las cinco enfermedades, se utilizó suero fetal bovino. como control negativo polivalente para el ensayo múltiple.

ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO LUMINEX®

Para realizar la optimización del ensayo múltiple la plataforma xMAP de Luminex® y la identificación simultánea de anticuerpos contra DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB, se utilizaron las microesferas previamente acopladas con los antígenos, se probaron diferentes cantidades de esferas (100, 200, 300 y 400 esferas), diferentes diluciones de las muestra monoCp y monoCn y posteriormente polyCp y SFB en el ensayo múltiple (dilución doble seriada desde 1:2 y hasta 32 768), se probaron además dos diluciones del anti IgG bovino unido a biotina (Jackson Inmunoresesarch #101-065-165 RRID: AB_2337297) para comprobar la mejor condición (1:10 000 y 1:20 000) el número de analitos a determinar, los tiempos de incubación y temperaturas (Hawcroft *et al.*, 1987).

Una vez que acoplados los antígenos a las microesferas, el ensayo se realizó agregando 50 µl de mix de microesferas que contenían 400 esferas de cada región de las 5 enfermedades y 50 µl de muestra diluida 1:20, incubando 2hrs a 25°C en agitación constante a 350 rpm, posterior a un ciclo de 3 lavados se agregó el anticuerpo secundario, un anti IgG bovino unido a biotina en una concentración de 1:10 000, incubando en condiciones similares a las mencionadas anteriormente. Posterior a un nuevo ciclo de lavado se agregaron 50 µl de estreptavidina ficoeritrina (SAPE) (SAPE Bio Rad Laboratoires #171304501 diluida 1:100. Finalmente, se realizó un nuevo ciclo de lavado y se agregaron 100 µl de solución de lectura, los resultados fueron obtenidos en intensidades medias de fluorescencia (IMF) en donde la fluorescencia es directamente proporcional a la concentración del anticuerpo presente en la muestra.

VALIDACIÓN

Una vez optimizado el ensayo, se evalúa para determinar si es selectivo, su exactitud, si es preciso, sensible y específico.

- Exactitud: en los ensayos dicotómicos, hace referencia a la sensibilidad (Se) y especificidad (Esp), es decir, la capacidad de detectar a los verdaderamente positivos (Se) y la capacidad de detección de los verdaderamente negativos (Esp).
- Precisión: también es conocido como reproducibilidad o coeficiente de variación (CV), ya sea intra o inter ensayo. Se calcula mediante la desviación estándar de la media de los resultados

obtenidos. Los CV intra e inter ensayo no deben superar el 20%, aunque Lee *et al* (2005) establecen como rango aceptable valores entre el 25 y 30%.

- Selectividad.
- Límite de detección (OIE, 2018b; Findlay *et al.*, 2000; AOAC, 2002).

Anexo 2. Prevalencias zona norte

Cuadro 50. Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de DVB en los estados de la república que conforman la zona norte

Norte	Prevalencia (%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Baja California	25.0	28	0.47*	0.25	0.90
Chihuahua	60.0	45	1.15	0.90	1.46
Coahuila	34.5	55	0.65*	0.45	0.94
Durango	49.7	145	0.94	0.80	1.12
Nuevo León	63.8	116	1.23**	1.07	1.42
Sonora	53.5	101	1.02	0.85	1.23
Zacatecas	38.5	39	0.73	0.49	1.09

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 51. Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de IBR en los estados de la república que conforman la zona norte

Norte	Prevalencia (%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Baja California	17.9	28	0.51	0.23	1.14
Chihuahua	37.8	45	1.16	0.81	1.67
Coahuila	30.9	55	0.89	0.60	1.33
Durango	29.0	145	0.83	0.64	1.08
Nuevo Leon	53.4	116	1.59**	1.33	1.90
Sonora	40.6	101	1.18	0.93	1.51
Zacatecas	15.4	39	0.44*	0.21	0.92

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 52. Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de LEB en los estados de la república que conforman la zona norte

Norte	Prevalencia				
	(%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Baja California	14.3	28	0.31*	0.12	0.76
Chihuahua	51.1	45	1.06	0.78	1.43
Coahuila	25.5	55	0.51*	0.31	0.82
Durango	33.1	145	0.69*	0.54	0.88
Nuevo León	51.7	116	1.13	0.94	1.35
Sonora	56.4	101	1.23**	1.03	1.47
Zacatecas	51.3	39	1.11	0.82	1.51

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 53. Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% superior e inferior) de PI3 en los estados de la república que conforman la zona norte

Norte	Prevalencia				
	(%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Baja California	17.9	28	0.37*	0.17	0.82
Chihuahua	55.6	45	1.16	0.89	1.51
Coahuila	18.2	55	0.37*	0.21	0.66
Durango	44.8	145	0.93	0.77	1.12
Nuevo León	62.9	116	1.33**	1.15	1.54
Sonora	62.4	101	1.31**	1.12	1.54
Zacatecas	30.8	39	0.64	0.40	1.02

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 54. Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de VRSB en los estados de la república que conforman la zona norte

Norte	Prevalencia				
	(%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Baja California	17.9	28	0.33*	0.15	0.74
Chihuahua	60.0	45	1.13	0.89	1.44
Coahuila	36.4	55	0.68	0.48*	0.97
Durango	46.9	145	0.88	0.74	1.05
Nuevo León	62.9	116	1.20**	1.04	1.38
Sonora	51.5	101	0.97	0.80	1.18
Zacatecas	38.5	39	0.77	0.53	1.12

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Anexo 3. Prevalencias zona golfo

Cuadro 55. Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de DVB en los estados de la república que conforman la zona golfo

<u>Golfo</u>	Prevalencia (%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Tabasco	66.9	163	1.30**	1.16	1.46
Tamaulipas	54.9	173	1.05	0.91	1.21
Veracruz	32.3	31	0.61	0.37	1.02

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 56. Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de IBR en los estados de la república que conforman la zona golfo

<u>Golfo</u>	Prevalencia (%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Tabasco	58.3	163	1.05	0.85	1.30
Tamaulipas	49.1	173	1.04	0.85	1.28
Veracruz	25.8	31	0.56	0.27	1.15

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 57. Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de LEB en los estados de la república que conforman la zona golfo

<u>Golfo</u>	Prevalencia (%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Tabasco	46.6	163	1.01	0.85	1.20
Tamaulipas	42.8	173	0.92	0.77	1.10
Veracruz	29.0	31	0.63	0.36	1.09

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia.

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 58. Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de PI3 en los estados de la república que conforman la zona golfo

<u>Golfo</u>	Prevalencia (%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Tabasco	58.3	163	1.23**	1.07	1.41
Tamaulipas	49.1	173	1.02	0.87	1.20
Veracruz	45.2	31	0.94	0.64	1.39

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 59. Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de VRSB en los estados de la república que conforman la zona golfo

Golfo	Prevalencia (%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Tabasco	58.3	163	1.11	0.97	1.27
Tamaulipas	49.1	173	0.92	0.79	1.08
Veracruz	25.8	31	0.48*	0.27	0.88

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Anexo 4. Prevalencias zona pacífico

Cuadro 60. Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de DVB en los estados de la república que conforman la zona pacífico

<u>Pacífico</u>	Prevalencia				
	(%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Chiapas	46.6	88	0.91	0.73	1.13
Colima	56.2	89	1.07	0.89	1.29
Guerrero	58.8	68	1.12	0.92	1.38
Jalisco	65.5	165	1.27**	1.13	1.43
Michoacán	68.9	61	1.32**	1.11	1.57
Morelos	44.4	36	0.85	0.59	1.22
Nayarit	51.7	207	0.98	0.86	1.13
Oaxaca	61.8	102	1.19**	1.01	1.39
Sinaloa	62.5	48	1.20	0.96	1.49

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 61. Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de IBR en los estados de la república que conforman la zona pacífico

<u>Pacífico</u>	Prevalencia				
	(%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Chiapas	22.7	88	0.65*	0.44	0.96
Colima	29.2	89	0.84	0.61	1.17
Guerrero	32.4	68	0.94	0.66	1.32
Jalisco	44.8	165	1.32**	1.11	1.58
Michoacán	52.5	61	1.54**	1.20	1.96
Morelos	25.0	36	0.72	0.41	1.27
Nayarit	38.2	207	0.96	0.79	1.18
Oaxaca	47.1	102	1.38**	1.12	1.71
Sinaloa	47.9	48	1.40**	1.04	1.89

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 62. Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de LEB en los estados de la república que conforman la zona pacífico

<u>Pacífico</u>	Prevalencia				
	(%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Chiapas	30.7	88	0.66*	0.48	0.90
Colima	41.6	89	0.90	0.70	1.15
Guerrero	44.1	68	0.95	0.73	1.25
Jalisco	56.4	165	1.22**	1.06	1.41
Michoacán	70.5	61	1.54**	1.31	1.83
Morelos	50.0	36	1.08	0.78	1.51
Nayarit	58.5	207	1.29**	1.14	1.46
Oaxaca	60.8	102	1.33**	1.13	1.57
Sinaloa	68.8	48	1.50**	1.24	1.83

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 63. Prevalencia, riesgo relativo e intervalos e confianza (IC 95% inferior y superior) de PI3 en los estados de la república pertenecientes a la zona pacífico

<u>Pacífico</u>	Prevalencia				
	(%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Chiapas	36.4	88	0.75*	0.57	0.99
Colima	44.9	89	0.93	0.74	1.18
Guerrero	55.9	68	1.17	0.94	1.45
Jalisco	58.2	165	1.23**	1.07	1.41
Michoacán	73.8	61	1.55**	1.33	1.81
Morelos	44.4	36	0.92	0.64	1.33
Nayarit	44.0	207	0.91	0.77	1.07
Oaxaca	56.9	102	1.19**	1.00	1.42
Sinaloa	54.2	48	1.13	0.87	1.47

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 64. Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de VRSB en los estados de la república pertenecientes a la zona pacífico

Pacífico	Prevalencia				
	(%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Chiapas	46.6	88	0.87	0.70	1.10
Colima	57.3	89	1.08	0.90	1.30
Guerrero	60.3	68	1.11	0.91	1.36
Jalisco	66.7	165	1.29**	1.15	1.45
Michoacán	75.4	61	1.44**	1.24	1.66
Morelos	50.0	36	0.94	0.68	1.31
Nayarit	51.2	207	0.96	0.84	1.11
Oaxaca	61.8	102	1.17**	1.00	1.37
Sinaloa	70.8	48	1.26**	1.03	1.55

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia, hiperendemia y holoendemia.

** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Anexo 5. Prevalencias zona centro

Cuadro 65. Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de DVB en los estados de pertenecientes a la zona centro de la república mexicana

<u>Centro</u>	Prevalencia (%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Aguascalientes	29.1	86	0.86*	0.78	0.94
Estado de México	94.4	18	0.55*	0.39	0.76
Guanajuato	66.4	113	1.81**	1.61	2.04
Hidalgo	40.5	84	1.28**	1.12	1.47
Puebla	53.1	209	0.77	0.59	1.00
Querétaro	50.9	110	1.04	0.92	1.19
San Luis Potosí	24.8	113	0.97	0.80	1.17
Tlaxcala	15.8	19	0.46*	0.33	0.64

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia, hiperendemia y holoendemia.

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 66. Prevalencias, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de IBR en los estados de la república que conforman la zona centro

<u>Centro</u>	Prevalencia (%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Aguascalientes	17.4	86	0.87	0.73	1.03
Estado de México	50.0	18	0.46*	0.29	0.75
Guanajuato	45.1	113	1.45	0.91	2.31
Hidalgo	28.6	84	1.32**	1.07	1.64
Puebla	36.8	209	0.82	0.58	1.16
Querétaro	40.0	110	1.07	0.89	1.29
San Luis Potosí	13.3	113	1.17	0.92	1.48
Tlaxcala	0.0	19	0.00*		

Los valores se destacan según color, como: hipoendemia, mesoendemia e hiperendemia.

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 67. Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de LEB en los estados de la república que conforman la zona centro

<u>Centro</u>	Prevalencia				
	(%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Aguascalientes	18.6	86	0.97	0.87	1.08
Estado de México	94.4	18	0.39*	0.25	0.62
Guanajuato	54.0	113	2.06**	1.83	2.32
Hidalgo	34.5	84	1.18	0.99	1.40
Puebla	51.7	209	0.74	0.55	1.00
Querétaro	50.9	110	1.13	0.98	1.30
San Luis Potosí	42.5	113	1.11	0.92	1.34
Tlaxcala	26.3	19	0.92	0.74	1.14

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia, hiperendemia y holoendemia.

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 68. Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de PI3 en los estados de la república mexicana que conforman la zona centro

<u>Centro</u>	Prevalencia				
	(%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Aguascalientes	20.9	86	0.43*	0.28	0.65
Estado de México	83.3	18	1.74**	1.41	2.15
Guanajuato	62.8	113	1.33**	1.14	1.54
Hidalgo	47.6	84	0.99	0.79	1.24
Puebla	53.6	209	1.13	0.99	1.29
Querétaro	47.3	110	0.98	0.80	1.20
San Luis Potosí	19.5	113	0.39*	0.27	0.58
Tlaxcala	10.5	19	0.22*	0.06	0.81

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia, hiperendemia y holoendemia.

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 69. Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de VRSB en los estados de la república que conforman la zona centro

Centro	Prevalencia				
	(%)	n	RR	IC inf.	IC sup.
Aguascalientes	34.9	86	0.65*	0.49	0.87
Estado de México	88.9	18	1.68**	1.42	1.99
Guanajuato	73.5	113	1.41**	1.25	1.58
Hidalgo	46.4	84	0.87	0.69	1.10
Puebla	55.5	209	1.08	0.95	1.22
Querétaro	56.4	110	1.07	0.90	1.26
San Luis Potosí	29.2	113	0.54*	0.40	0.72
Tlaxcala	15.8	19	0.30*	0.10	0.84

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia, hiperendemia, y holoendemia.

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Anexo 6. Prevalencias zona península

Cuadro 70. Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de DVB en los estados de la república que conforman la zona península

<u>Península</u>	Prevalencia		RR	IC inf.	IC sup.
	(%)	n			
Campeche	53.3	60	0.80	0.61	1.04
Quintana Roo	44.4	63	0.84	0.64	1.12
Yucatán	48.5	33	0.92	0.65	1.32

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 71. Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de IBR en los estados de la república que conforman la zona península

<u>Península</u>	Prevalencia		RR	IC inf.	IC sup.
	(%)	n			
Campeche	31.7	60	0.72	0.48	1.06
Quintana Roo	27.0	63	0.78	0.52	1.17
Yucatán	48.5	33	1.41	0.99	2.01

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia.

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 72. Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de LEB en los estados de la república que conforman la zona península

<u>Península</u>	Prevalencia		RR	IC inf.	IC sup.
	(%)	n			
Campeche	38.3	60	0.65*	0.46	0.91
Quintana Roo	30.2	63	0.65*	0.44	0.94
Yucatán	39.4	33	0.85	0.56	1.30

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia.

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 73. Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de PI3 en los estados de la república que conforman la zona península

<u>Península</u>	Prevalencia		RR	IC inf.	IC sup.
	(%)	n			
Campeche	53.3	60	0.87	0.67	1.14
Quintana Roo	34.9	63	0.72	0.51	1.01
Yucatán	45.5	33	0.95	0.65	1.38

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 74. Prevalencia, riesgo relativo e intervalos de confianza (IC 95% inferior y superior) de VRSB en los estados de la república que conforman la zona península

<u>Península</u>	Prevalencia		RR	IC inf.	IC sup.
	(%)	n			
Campeche	58.3	60	0.86	0.68	1.11
Quintana Roo	47.6	63	0.90	0.69	1.16
Yucatán	51.5	33	0.97	0.70	1.35

Los valores se destacan según color, como: mesoendemia e hiperendemia.

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Anexo 7. Odds ratios

ODDS RATIOS PARA DVB

Cuadro 75. Odds ratio para las variables temperatura y DVB, con un IC 95%

Temperatura	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Cálido muy cálido (CMC)	1.04	0.91	1.19
Semi cálido (SC)	1.10	0.94	1.28
Templado (T)	0.77*	0.64	0.92
Semi frío (SF)	1.51	0.66	3.46

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 76. Odds ratio para las variables humedad y DVB con un IC 95%

Humedad	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Muy árido	0.39*	0.25	0.61
Árido	0.91	0.61	1.35
Seco	0.87	0.74	1.04
Subhúmedo (w0)	1.01	0.80	1.26
Subhúmedo (w1)	1.04	0.87	1.23
Subhúmedo (w2)	1.31**	1.06	1.62
Húmedo (f)	1.00	0.77	1.31
Húmedo (m)	1.18	0.91	1.53

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 77. Odds ratio para las variables clima y DVB con un IC 95%

Clima	Odds ratio	IC inferior	IC superior
CMC_árido	1.17	0.92	1.50
CMC_subhúmedo	0.92	0.77	1.10
CMC_húmedo	1.19	0.95	1.48
SC_árido	0.68*	0.53	0.88
SC_subhúmedo	1.47**	1.21	1.79
SC_húmedo	0.85	0.59	1.22
T_árido	0.65*	0.51	0.83
T_subhúmedo	0.94	0.72	1.22
T_húmedo	1.13	0.30	4.23
SF_subhúmedo	1.61	0.71	3.66

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 78. Odds ratio para las variables fin zootécnico y DVB con un IC 95%

Fin zootécnico	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Cárnico	0.97	0.86	1.09
Doble propósito	1.07	0.92	1.24

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 79. Odds ratio para las variables tipo de empadre y DVB con un IC 95%

Tipo de empadre	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Continuo	1.03	0.92	1.15
Estacional	0.57*	0.39	0.84

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 80. Odds ratio para las variables tipo de servicio y DVB con un IC 95%

Tipo de servicio	Odds ratio	IC inferior	IC superior
IA	1.50**	1.05	2.14
Monta	0.99	0.88	1.11

** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 81. Odds ratio para las variables número de parto y DVB con un IC 95%

Número de parto	Odds ratio	IC inferior	IC superior
1	0.98	0.79	1.20
2	0.93	0.76	1.14
3	0.93	0.77	1.12
4	1.12	0.91	1.37
5	1.10	0.84	1.45
6	1.30	0.93	1.84
7	1.01	0.62	1.62
8	0.43	0.17	1.08
9	0.72	0.31	1.68

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 82. Odds ratio para las variables sistema de pastoreo y DVB con un IC 95%

Sistema de pastoreo	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Rotacional	1.03	0.92	1.16
Alterno	0.91	0.75	1.11
Continuo	0.86	0.67	1.11
Otro	1.30	0.87	1.95

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

ODDS RATIOS PARA IBR

Cuadro 83. Odds ratio para las variables temperatura e IBR con un IC 95%

Temperatura	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Cálido muy cálido (CMC)	0.97	0.84	1.12
Semi cálido (SC)	1.18**	1.00	1.38
Templado (T)	0.83	0.68	1.02
Semi frío (SF)	0.63	0.25	1.60

** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 84. Odds ratio para las variables humedad e IBR con un IC 95%

Humedad	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Muy árido	0.47*	0.28	0.80
Árido	0.91	0.59	1.38
Seco	0.99	0.83	1.19
Subhúmedo (w0)	0.81	0.64	1.04
Subhúmedo (w1)	1.15	0.96	1.38
Subhúmedo (w2)	1.22	0.98	1.51
Húmedo (f)	0.97	0.73	1.28
Húmedo (m)	0.91	0.69	1.20

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 85. Odds ratio para las variables clima e IBR con un IC 95%

Clima	Odds ratio	IC inferior	IC superior
CMC_árido	1.24	0.97	1.60
CMC_subhúmedo	0.91	0.76	1.10
CMC_húmedo	0.89	0.70	1.12
SC_árido	0.90	0.69	1.19
SC_subhúmedo	1.36**	1.12	1.65
SC_húmedo	1.10	0.75	1.60
T_árido	0.66*	0.50	0.87
T_subhúmedo	1.04	0.79	1.37
T_húmedo	0.95	0.24	3.80
SF_subhúmedo	0.74	0.31	1.77

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 86. Odds ratio para las variables fin zootécnico e IBR con un IC 95%

Fin Zootécnico	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Cárnico	1.00	0.88	1.13
Doble propósito	1.00	0.86	1.17

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 87. Odds ratio para las variables tipo de empadre e IBR con un IC 95%

Tipo de empadre	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Continuo	1.04	0.92	1.17
Estacional	0.42*	0.26	0.68

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 88. Odds ratio para las variables tipo de servicio e IBR con un IC 95%

Tipo de servicio	Odds ratio	IC inferior	IC superior
IA	1.34	0.94	1.90
Monta	0.99	0.87	1.12

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 89. Odds ratio para las variables número de parto e IBR con un IC 95%

Número de parto	Odds ratio	IC inferior	IC superior
1	0.96	0.77	1.19
2	1.07	0.87	1.32
3	0.98	0.81	1.20
4	1.00	0.80	1.24
5	1.09	0.82	1.45
6	1.08	0.76	1.53
7	0.68	0.39	1.17
8	0.60	0.22	1.65
9	0.90	0.36	2.21

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 90. Odds ratio para las variables sistema de pastoreo e IBR con un IC 95%

Sistema de pastoreo	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Rotacional	1.01	0.89	1.14
Alternativo	0.96	0.78	1.18
Continuo	0.92	0.71	1.21
Otro	1.31	0.87	1.97

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

ODDS RATIOS PARA LEB

Cuadro 91. Odds ratio para las variables temperatura y LEB con un IC 95%

Temperatura	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Cálido muy cálido (CMC)	0.99	0.87	1.14
Semi cálido (SC)	1.19	1.02	1.39
Templado (T)	0.83	0.37	1.88
Semi frío (SF)	0.77*	0.64	0.93

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 92. Odds ratio para las variables humedad y LEB con un IC 95%

Humedad	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Muy árido	0.42*	0.26	0.68
Árido	1.04	0.70	1.54
Seco	0.88	0.74	1.05
Subhúmedo (w0)	1.06	0.85	1.33
Subhúmedo (w1)	1.12	0.94	1.33
Subhúmedo (w2)	1.19	0.97	1.47
Húmedo (f)	0.96	0.74	1.26
Húmedo (m)	0.97	0.75	1.26

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 93. Odds ratio para las variables clima y LEB con un IC 95%

Clima	Odds ratio	IC inferior	IC superior
CMC_árido	1.15	0.90	1.47
CMC_subhúmedo	0.96	0.80	1.14
CMC_húmedo	0.95	0.76	1.19
SC_árido	0.85	0.65	1.10
SC_subhúmedo	1.40**	1.16	1.70
SC_húmedo	1.09	0.76	1.57
T_árido	0.59*	0.45	0.76
T_subhúmedo	1.11	0.85	1.44
T_húmedo	0.33	0.07	1.60
SF_subhúmedo	0.91	0.41	2.02

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 94. Odds ratio para las variables fin zootécnico y LEB con un IC 95%

Fin zootécnico	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Cárnico	0.98	0.87	1.10
Doble propósito	1.04	0.90	1.22

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa

Cuadro 95. Odds ratio para las variables tipo de empadre y LEB con un IC 95%

Tipo de empadre	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Continuo	1.04	0.92	1.16
Estacional	0.45*	0.30	0.69

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 96. Odds ratio para las variables tipo de servicio y LEB con un IC 95%

Tipo de servicio	Odds ratio	IC inferior	IC superior
IA	1.36	0.96	1.92
Monta	0.99	0.88	1.12

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 97. Odds ratio para las variables número de parto y LEB con un IC 95%

Número de parto	Odds ratio	IC inferior	IC superior
1	0.94	0.77	1.16
2	1.04	0.85	1.28
3	0.92	0.76	1.11
4	1.10	0.90	1.35
5	1.03	0.78	1.35
6	1.22	0.87	1.71
7	0.90	0.56	1.46
8	0.72	0.30	1.74
9	0.55	0.22	1.34

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 98. Odds ratio para las variables sistema de pastoreo y LEB con un IC 95%

Sistema de pastoreo	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Rotacional	0.97	0.86	1.10
Alternativo	1.03	0.85	1.26
Continuo	0.94	0.73	1.21
Otro	1.67**	1.11	2.50

** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

ODDS RATIOS PARA PI3

Cuadro 99. Odds ratio para las variables temperatura y PI3 con un IC 95%

Temperatura	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Cálido muy cálido (CMC)	1.07	0.93	1.22
Semi cálido (SC)	1.09	0.94	1.27
Templado (T)	0.91	0.41	2.05
Semi frío (SF)	0.75*	0.62	0.90

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 100. Odds ratio para las variables humedad y PI3 con un IC 95%

Humedad	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Muy árido	0.44*	0.28	0.70
Árido	1.00	0.67	1.48
Seco	0.83*	0.70	0.99
Subhúmedo (w0)	0.93	0.74	1.16
Subhúmedo (w1)	1.08	0.91	1.28
Subhúmedo (w2)	1.24**	1.00	1.53
Húmedo (f)	1.04	0.80	1.36
Húmedo (m)	1.30**	1.00	1.68

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 101. Odds ratio para las variables clima y PI3 con un IC 95%

Clima	Odds ratio	IC inferior	IC superior
CMC_árido	1.21	0.95	1.55
CMC_subhúmedo	0.94	0.79	1.12
CMC_húmedo	1.21	0.97	1.51
SC_árido	0.69*	0.53	0.90
SC_subhúmedo	1.33**	1.10	1.62
SC_húmedo	1.01	0.70	1.46
T_árido	0.59*	0.46	0.76
T_subhúmedo	1.01	0.78	1.32
T_húmedo	2.16**	0.54	8.66
SF_subhúmedo	1.00	0.45	2.19

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 102. Odds ratio para las variables fin zootécnico y PI3 con un IC 95%

Fin zootécnico	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Cárnico	0.96	0.85	1.09
Doble propósito	1.08	0.93	1.25

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 103. Odds ratio para las variables tipo de empadre y PI3 con un IC 95%

Tipo de empadre	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Continuo	1.04	0.92	1.17
Estacional	0.45*	0.30	0.68

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 104. Odds ratio para las variables número de parto y PI3 con un IC 95%

Número de parto	Odds ratio	IC inferior	IC superior
1	1.01	0.82	1.24
2	1.05	0.86	1.28
3	0.93	0.77	1.13
4	0.97	0.79	1.19
5	1.12	0.85	1.47
6	1.16	0.83	1.63
7	0.97	0.60	1.56
8	0.42	0.16	1.09
9	0.88	0.38	2.04

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 105. Odds ratio para las variables sistema de pastoreo y PI3 con un IC 95%

Sistema de pastoreo	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Rotacional	1.02	0.90	1.15
Alternativo	0.94	0.78	1.15
Continuo	0.94	0.73	1.21
Otro	1.12	0.75	1.67

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

ODDS RATIOS PARA VRSB

Cuadro 106. Odds ratio para las variables temperatura y VRSB con un IC 95%

Temperatura	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Cálido muy cálido (CMC)	1.02	0.89	1.17
Semi cálido (SC)	1.06	0.91	1.24
Templado (T)	1.47	0.64	3.38
Semi frío (SF)	0.85	0.71	1.02

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 107. Odds ratio para las variables humedad y VRSB con un IC 95%

Humedad	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Muy árido	0.34*	0.21	0.54
Árido	1.00	0.67	1.48
Seco	0.93	0.78	1.11
Subhúmedo (w0)	0.96	0.77	1.20
Subhúmedo (w1)	1.09	0.91	1.29
Subhúmedo (w2)	1.34**	1.08	1.65
Húmedo (f)	0.93	0.71	1.22
Húmedo (m)	1.01	0.78	1.31

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 108. Odds ratio para las variables clima y VRSB con un IC 95%

Clima	Odds ratio	IC inferior	IC superior
CMC_árido	1.16	0.91	1.49
CMC_subhúmedo	0.98	0.82	1.17
CMC_húmedo	1.00	0.80	1.25
SC_árido	0.69*	0.53	0.89
SC_subhúmedo	1.37**	1.12	1.66
SC_húmedo	0.86	0.59	1.23
T_árido	0.74*	0.58	0.95
T_subhúmedo	1.01	0.78	1.32
T_húmedo	1.77	0.44	7.09
SF_subhúmedo	1.57	0.69	3.57

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional. ** Indica mayor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 109. Odds ratio para las variables fin zootécnico y VRSB con un IC 95%

Fin zootécnico	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Cárnico	0.95	0.84	1.07
Doble propósito	1.11	0.96	1.29

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 110. Odds ratio para las variables tipo de empadre y VRSB con un IC 95%

Tipo de empadre	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Continuo	1.03	0.92	1.16
Estacional	0.50*	0.35	0.77

* Indica menor probabilidad de seropositividad en relación a la media poblacional.

Cuadro 111. Odds ratio para las variables número de parto y VRSB con un IC 95%

Número de parto	Odds ratio	IC inferior	IC superior
1	1.01	0.82	1.24
2	0.98	0.80	1.19
3	0.95	0.79	1.15
4	1.00	0.81	1.23
5	1.15	0.87	1.51
6	1.32	0.94	1.87
7	0.88	0.55	1.42
8	0.53	0.22	1.28
9	0.49	0.20	1.17

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Cuadro 112. Odds ratio para las variables sistema de pastoreo y VRSB con un IC 95%

Sistema de pastoreo	Odds ratio	IC inferior	IC superior
Rotacional	1.00	0.89	1.13
Alternativo	0.93	0.76	1.13
Continuo	0.98	0.76	1.26
Otro	1.50	0.99	2.27

No se encontraron riesgos con probabilidad significativa.

Anexo 8. Resultados de seropositividad relacionado a cada zona ganadera

ZONA NORTE

Al realizar el análisis de prevalencias en los estados de la república mexicana que conforman la zona norte se observa que casi todos los niveles promedio de seropositividad pueden clasificarse como mesoendémicos (Anexo 2, cuadros: 50, 51, 52, 53 y 54), en parte debido a que Baja California muestra bajas seroprevalencias para todas las enfermedades (en el rango de 14.3 a 25%). Sin embargo, existen zonas de alta prevalencia en los estados de Nuevo León, Chihuahua y Sonora para DVB (con valores de 53.5 a 63.8%), LEB (valores entre 51.1 a 56.4%), PI3 (valores entre 55.6 y 62.9%) y VRSB (con valores de 51.5 a 62.9%), que pueden clasificarse como prevalencias hiperendémicas.

En el análisis de odds ratio para evaluar la asociación entre las variables estado de la república y seropositividad se observó lo siguiente:

- Baja California presenta las menores prevalencias para todas las enfermedades, y existe una asociación significativamente negativa entre dicho estado y la presentación de las enfermedades en todos los casos, excepto para IBR que, aunque la asociación es negativa no es significativa, lo que indicaría que en esta entidad existe menor probabilidad de encontrar animales seropositivos.
- Coahuila presenta la misma tendencia de baja prevalencia para todas las enfermedades, junto con asociaciones significativamente negativas para cuatro de las cinco enfermedades, con la única excepción del caso de IBR.
- Nuevo León, presenta las prevalencias más altas, con excepción del caso de LEB, para la que Sonora posee la mayor prevalencia (51.7 vs 56.4, respectivamente). Sin embargo, el número de infectados en Nuevo León para dicha enfermedad es lo suficientemente alto, para ser considerado como hiperendémico. Más aún, en este estado existen factores de asociación significativamente positivos para las 4 enfermedades en las que la prevalencia es mayor (DVB, IBR, PI3 y VRSB), es decir que en dicho estado se favorece la presencia de animales seropositivos.
- Chihuahua y Sonora presentan niveles hiperendémicos para DVB, LEB, PI3 y VRSB. Sin embargo, solamente en el caso de Sonora y de PI3 existe una asociación significativamente positiva.

ZONA GOLFO

En los estados de la zona golfo, de forma general las cinco enfermedades se observan en niveles mesoendémicos a hiperendémicos (entre el 25.8 y el 66.9%), con un aumento en las prevalencias en el estado de Tabasco, en donde las asociaciones medidas por los odds ratios indican que Tabasco presentan niveles hiperendémicos para DVB, IBR, PI3 y VRSB. Sin embargo, solo existe una asociación significativamente positiva para DVB y PI3. Contrastantemente, Veracruz muestra niveles de mesoendemia para todas las enfermedades, observando los niveles significativamente más bajos de la región golfo para DVB, IBR y VRSB (Ver anexo 3, cuadros: 55, 56, 57, 58 y 59).

ZONA PACÍFICO

En esta zona se encuentran los niveles generales promedio más altos de prevalencias para la mayoría de las enfermedades que van del 30.7 al 75.4%, excepto para la enfermedad de IBR que sigue manteniendo niveles de mesoendemia con porcentajes de seropositividad de 22.7 a 47.9% y sólo en el caso de Michoacán permanece como hiperendemia (52.5%) (ver anexo 4, cuadros: 60, 61, 62, 63 y 64). Lo anterior indica que la zona pacífico se considera como hiperendémica para cuatro de las 5 enfermedades estudiadas: PI3, LEB, DVB y VRSB. Especialmente el estado de Michoacán presenta prevalencias altas para PI3, LEB y VRSB, condición que lo sitúa en nivel de holoendemia para ellas.

La asociación medida con odds ratios indica relaciones significativamente positivas para DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB en los estados de Jalisco y Michoacán. En tanto que para Oaxaca, Nayarit y Sinaloa hay asociaciones significativamente positivas para LEB. Para IBR únicamente existe asociación positiva significativa para Oaxaca. Contrariamente, se observa un odds ratio negativo o protector en el estado de Chiapas para la seropositividad de IBR, LEB y PI3, indicando una menor probabilidad de observar seropositividad a estas enfermedades en dicho estado.

ZONA CENTRO

En el anexo 5 (Cuadros: 65, 66, 67, 68 y 69) se muestran las prevalencias de las cinco enfermedades en los estados de la zona centro, en los que se observa una gran variabilidad, desde ausencia de seropositividad a IBR en Tlaxcala, hasta niveles holoendémicos para cuatro enfermedades en el Estado de México.

Es así como el Estado de México muestra las mayores prevalencias de todas las enfermedades, alcanzando niveles holoendémicos para DVB, LEB, PI3 y VRSB con porcentajes de

seropositividad que van de 83.3 a 94.4% y asociaciones significativamente positivas, lo que indica que existen factores de riesgo en el estado que favorecen la presentación de estas infecciones. Además, en dicho estado también se muestra la mayor seropositividad a IBR siendo el único estado de la zona en el que el nivel de la enfermedad alcanza el grado de hiperendémico. En este mismo sentido, se observan niveles de hiperendémicos en Guanajuato para las seroprevalencias de DVB, LEB, PI3 y VRSB encontrándose asociaciones significativamente positivas excepto para LEB. Finalmente, aunque Puebla y Querétaro muestran niveles de hiperendemia para las enfermedades de DVB, LEB y VRSB, no se observan asociaciones significativas.

Contrariamente, en el estado de Tlaxcala se observan niveles hipoendémicos para PI3 y ausencia de IBR, con asociaciones significativamente negativas. Niveles mesoendémicos con asociaciones significativamente negativas se observan para los estados de Aguascalientes y San Luis Potosí para las seroprevalencias de DVB, PI3 y VRSB indicando menor probabilidad de ocurrencia de las enfermedades en estas entidades.

ZONA PENÍNSULA

En la zona peninsular, de manera general se observa que casi todas las enfermedades son mesoendémicas para Quintana Roo y Yucatán, excepto VRSB para este último. Mientras que para el estado de Campeche la seropositividad para DVB, PI3 y VRSB alcanza niveles hiperendémicos que no muestran asociaciones significativas. Por otro lado, LEB que se ubica en niveles mesoendémicos solamente muestra asociaciones negativas significativas para los estados de Campeche y Quintana Roo (Ver en el anexo 6 los cuadros: 70, 71, 72, 73 y 74).

Anexo 9. Resultados de seropositividad en el año 2012

Cálculo de porcentajes de prevalencias aparentes para las enfermedades de DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB, realizado con la información de casos y población susceptible, proporcionada por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SENASICA), para el año 2012.

Cuadro 113. Frecuencias de seropositividad para DVB, IBR, LEB, PI3 y VRSB en cada zona ganadera de la república mexicana según la información proporcionada por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SENASICA) en el año 2012

	DVB	IBR	LEB	PI3	VRSB
Prevalencia/zona	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Norte	0.6	9.2	0.6	2.3	0.0
Pacífico	4.9	2.2	0.3	0.2	0.2
Centro	3.3	2.9	0.1	2.5	7.0
Golfo	0.8	1.4	0.0	6.4	11.1
Península	0.0	0.8	0.7	0.0	0.0
Generales	4.6	2.4	0.3	0.2	0.3

Los valores se destacan según color, como: hipoendemia o mesoendemia.

Cuadro 114. Número de muestras analizadas por estado de la república mexicana

Estado	Número de muestras
Aguascalientes	86
Baja California	28
Campeche	76
Chiapas	88
Chihuahua	45
Coahuila	55
Colima	89
Durango	145
Estado de México	18
Guanajuato	113
Guerrero	68
Hidalgo	84
Jalisco	165
Michoacán	61
Morelos	36
Nayarit	207
Nuevo León	116
Oaxaca	102
Puebla	209
Querétaro	110
Quintana Roo	63
San Luis Potosí	113
Sinaloa	48
Sonora	101
Tabasco	163
Tamaulipas	173
Tlaxcala	19
Veracruz	31
Yucatán	33
Zacatecas	39
Totales	2684

En los siguientes cuadros los resultados se destacan según color como: hipoendemia, mesoendemia, hiperendemia y holoendemia.

DVB

Cuadro 115. Porcentaje de prevalencias para DVB en el año 2012

ZONA	ESTADO	CASOS	# ANIMALES SUSCEPTIBLES	% PREVALENCIA
NORTE	BAJA CALIFORNIA	9	41	22.0
	CHIHUAHUA	2	1,808	0.1
	COAHUILA	24	595	4.0
	DURANGO	0	1,790	0.0
	NUEVO LEÓN	1	1,949	0.1
	SONORA	0	3	0.0
	ZACATECAS	0	0	0.0
	TOTAL ZONA	36	6,186	0.6
PACÍFICO	CHIAPAS	10	2,275	0.4
	COLIMA	0	200	0.0
	GUERRERO	1	257	0.4
	JALISCO	10,250	128,412	8.0
	MICHOACÁN	11	713	1.5
	MORELOS	0	0	0.0
	NAYARIT	7	1,355	0.5
	OAXACA	0	0	0.0
	SINALOA	15	74,818	0.0
	TOTAL ZONA	10,294	208,030	4.9
CENTRO	AGUASCALIENTES	15	4,391	0.3
	ESTADO DE MÉXICO	20	2,565	0.8
	GUANAJUATO	14	1,685	0.8
	HIDALGO	17	959	1.8
	PUEBLA	0	3	0.0
	QUERÉTARO	2	3,172	0.1
	SAN LUIS POTOSI	415	537	77.3
	TLAXCALA	3	1,200	0.3
TOTAL ZONA	486	14512.0	3.3	
GOLFO	TABASCO	6	4,000	0.2
	TAMAULIPAS	2	1,156	0.2
	VERACRUZ	36	391	9.2
TOTAL ZONA	44	5547.0	0.8	
PENÍNSULA	CAMPECHE	1	3,000	0.0
	QUINTANA ROO	0	0	0.0
	YUCATÁN	0	0	0.0
	TOTAL ZONA	1	3000.0	0.0
TOTAL NACIONAL	21,720	468,550	4.6	

IBR

Cuadro 116. Porcentaje de prevalencias para IBR en el año 2012

ZONA	ESTADO	CASOS	# ANIMALES SUSCEPTIBLES	% PREVALENCIA
NORTE	BAJA CALIFORNIA	0	0	0.0
	CHIHUAHUA	229	2,459	9.3
	COAHUILA	88	493	17.8
	DURANGO	150	185	81.1
	NUEVO LEÓN	16	2,090	0.8
	SONORA	0	0	0.0
	ZACATECAS	0	0	0.0
	TOTAL ZONA	483	5,227	9.2
PACÍFICO	CHIAPAS	28	2,288	1.2
	COLIMA	1	200	0.5
	GUERRERO	0	61	0.0
	JALISCO	3,252	70,158	4.6
	MICHOACÁN	21	652	3.2
	MORELOS	0	0	0.0
	NAYARIT	6	1,645	0.4
	OAXACA	0	0	0.0
	SINALOA	27	74,810	0.0
	TOTAL ZONA	3,335	149,814	2.2
CENTRO	AGUASCALIENTES	12	990	1.2
	ESTADO DE MÉXICO	18	20	90.0
	GUANAJUATO	21	1,399	1.5
	HIDALGO	11	145	7.6
	PUEBLA	0	3	0.0
	QUERÉTARO	0	0	0.0
	SAN LUIS POTOSÍ	14	37	37.8
	TLAXCALA	0	0	0.0
	TOTAL ZONA	76	2,594	2.9
GOLFO	TABASCO	8	4,000	0.2
	TAMAULIPAS	6	1,150	0.5
	VERACRUZ	65	494	13.2
	TOTAL ZONA	79	5644.0	1.4
PENÍNSULA	CAMPECHE	16	3,300	0.5
	QUINTANA ROO	0	0	0.0
	YUCATÁN	14	457	3.1
	TOTAL ZONA	30	3757.0	0.8
TOTAL NACIONAL		7,946	326,558	2.4

LEB

Cuadro 117. Porcentaje de prevalencias para LEB en el año 2012

ZONA	ESTADO	CASOS	# ANIMALES SUSCEPTIBLES	% PREVALENCIA
NORTE	BAJA CALIFORNIA	0	0	0.0
	CHIHUAHUA	0	30	0.0
	COAHUILA	0	145	0.0
	DURANGO	0	0	0.0
	NUEVO LEÓN	4	441	0.9
	SONORA	0	0	0.0
	ZACATECAS	0	0	0.0
	TOTAL ZONA	4	616	0.6
PACÍFICO	CHIAPAS	0	63	0.0
	COLIMA	0	0	0.0
	GUERRERO	0	0	0.0
	JALISCO	49	18,632	0.3
	MICHOACÁN	1	153	0.7
	MORELOS	0	0	0.0
	NAYARIT	0	0	0.0
	OAXACA	0	0	0.0
	SINALOA	0	0	0.0
	TOTAL ZONA	50	18,848	0.3
CENTRO	AGUASCALIENTES	0	0	0.0
	ESTADO DE MÉXICO	0	0	0.0
	GUANAJUATO	1	200	0.5
	HIDALGO	0	0	0.0
	PUEBLA	0	0	0.0
	QUERÉTARO	1	2,000	0.1
	SAN LUIS POTOSÍ	0	521	0.0
	TLAXCALA	0	0	0.0
TOTAL ZONA	2	2,721	0.1	
GOLFO	TABASCO	0	98	0.0
	TAMAULIPAS	0	0	0.0
	VERACRUZ	0	5	0.0
TOTAL ZONA	0	103.0	0.0	
PENÍNSULA	CAMPECHE	0	1	0.0
	QUINTANA ROO	0	0	0.0
	YUCATÁN	3	407	0.7
	TOTAL ZONA	3	408.0	0.7
TOTAL NACIONAL	112	44,576	0.3	

PI3

Cuadro 118. Porcentaje de prevalencias para PI3 en el año 2012

ZONA	ESTADO	CASOS	# ANIMALES SUSCEPTIBLES	% PREVALENCIA
NORTE	BAJA CALIFORNIA	0	0	0.0
	CHIHUAHUA	0	1	0.0
	COAHUILA	0	0	0.0
	DURANGO	0	0	0.0
	NUEVO LEÓN	3	130	2.3
	SONORA	0	0	0.0
	ZACATECAS	0	0	0.0
	TOTAL ZONA	3	131	2.3
PACÍFICO	CHIAPAS	0	0	0.0
	COLIMA	0	0	0.0
	GUERRERO	0	61	0.0
	JALISCO	75	5,618	1.3
	MICHOACÁN	0	6	0.0
	MORELOS	0	0	0.0
	NAYARIT	8	640	1.3
	OAXACA	0	0	0.0
	SINALOA	40	74,400	0.1
	TOTAL ZONA	123	80,725	0.2
CENTRO	AGUASCALIENTES	5	230	2.2
	ESTADO DE MÉXICO	0	0	0.0
	GUANAJUATO	3	85	3.5
	HIDALGO	0	3	0.0
	PUEBLA	0	0	0.0
	QUERÉTARO	0	0	0.0
	SAN LUIS POTOSÍ	0	0	0.0
	TLAXCALA	0	0	0.0
	TOTAL ZONA	8	318	2.5
GOLFO	TABASCO	0	0	0.0
	TAMAULIPAS	2	496	0.4
	VERACRUZ	36	102	35.3
	TOTAL ZONA	38	598.0	6.4
PENÍNSULA	CAMPECHE	0	0	0.0
	QUINTANA ROO	0	0	0.0
	YUCATÁN	0	0	0.0
	TOTAL ZONA	0	0.0	0.0
TOTAL NACIONAL		344	163,544	0.2

VRSB

Cuadro 119. Porcentaje de prevalencias para VRSB en el año 2012

ZONA	ESTADO	CASOS	# ANIMALES SUSCEPTIBLES	% PREVALENCIA
NORTE	BAJA CALIFORNIA	0	0	0.0
	CHIHUAHUA	0	371	0.0
	COAHUILA	0	0	0.0
	DURANGO	0	0	0.0
	NUEVO LEÓN	0	0	0.0
	SONORA	0	0	0.0
	ZACATECAS	0	0	0.0
	TOTAL ZONA	0	371	0.0
PACÍFICO	CHIAPAS	0	0	0.0
	COLIMA	0	0	0.0
	GUERRERO	0	0	0.0
	JALISCO	84	5,067	1.7
	MICHOACÁN	4	5	80.0
	MORELOS	0	0	0.0
	NAYARIT	6	640	0.9
	OAXACA	0	0	0.0
	SINALOA	27	74,400	0.0
	TOTAL ZONA	121	80,112	0.2
CENTRO	AGUASCALIENTES	8	203	3.9
	ESTADO DE MÉXICO	8	10	80.0
	GUANAJUATO	3	85	3.5
	HIDALGO	2	2	100.0
	PUEBLA	0	0	0.0
	QUERÉTARO	0	0	0.0
	SAN LUIS POTOSI	0	0	0.0
	TLAXCALA	0	0	0.0
	TOTAL ZONA	21	300	7.0
GOLFO	TABASCO	0	0	0.0
	TAMAULIPAS	6	6	100.0
	VERACRUZ	2	66	3.0
	TOTAL ZONA	8	72.0	11.1
PENÍNSULA	CAMPECHE	0	0	0.0
	QUINTANA ROO	0	0	0.0
	YUCATÁN	0	0	0.0
	TOTAL ZONA	0	0.0	0.0
TOTAL NACIONAL		300	161,710	0.2

REFERENCIAS

- Abad-Zavaleta, J., Ríos-Utrera, A., Rosete-Fernández, J., García-Camacho, A., & Zárate-Martínez, J. (2016). Prevalencia de rinotraqueitis infecciosa bovina y diarrea viral bovina en hembras en tres épocas del año en la zona centro de Veracruz. *Nova Scientia*, 8(1), 213–227. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-07052016000100213&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
- Alkheraif, A. (2018). "Type 2 Bovine Viral Diarrhea Virus NP^{ro} Suppresses Type I Interferon Pathway Signaling in Bovine Cells and Augments Bovine Respiratory Syncytial Virus Replication". *Dissertations & Theses in Veterinary and Biomedical Science*. 24. <http://digitalcommons.unl.edu/vetscidiss/24>.
- Andrade, O. S. & Chicaiza, G. (2015). Prevalencia de anticuerpos a Parainfluenza Bovina (PI-3) en ganaderías lecheras de dos parroquias del cantón Cuenca, Ecuador 209–2010. http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/23837/1/Actas_Producción%20Animal_30.
- Almeida, I., Almeida, Y., Donatele, D., Clipes, R., Barioni, G., Zanini, M., & Di Filippo, P. (2021). Seroprevalence and associated factors of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea in dairy cows in the Caparaó region, Espírito Santo, Brazil. *Ciência Rural*, 51(12). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200220>.
- Almeida, L., Miranda, I., Hein, H. E., Neto, W. S., Costa, E. F., Marks, F. S., Rodenbusch, C. R., Canal, C. W., & Corbellini, L. G. (2013). Herd-level risk factors for bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds from Southern Brazil. *Research in Veterinary Science*, 95(3), 901–907. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2013.08.009>.
- Alvarado, I., & Hernández, I. (2015). Prevalencia y factores de riesgo de PI3 en bovinos de diferentes sistemas de producción. *Memorias de XXXIX Congreso Nacional e Internacional de Buiatría*.
- Anderson, S., Wakeley, P., Wibberley, G., Webster, K., & Sawyer, J. (2011). Development and evaluation of a Luminex multiplex serology assay to detect antibodies to bovine herpes virus 1, parainfluenza 3 virus, bovine viral diarrhoea virus, and bovine respiratory syncytial virus, with comparison to existing ELISA detection methods. *Journal of Immunological Methods*, 366(1–2), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.01.010>.
- Angeloni, S., Das, S., De Jager, W., & Dunbar, S. (2022). xMAP® Cookbook, a collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP® Technology for Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Authors. Recuperado el 3 de febrero de 2019. www.luminexcorp.com.
- APHIS (Servicio de inspección sanitaria de plantas y animales, por sus siglas en inglés) <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/animal-and-animal-product-import-information>.
- Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). (2002). AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals (pp. 1–38). www.AOAC.org.
- Baker, J. C., Ellis, J. A., & Clark, E. G. (1997). Bovine respiratory syncytial virus. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 13(3), 425–454. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30307-8](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30307-8).
- Bastarache, J. A., Koyama, T., Wickersham, N. E., Mitchell, D. B., Mernaugh, R. L., & Ware, L. B. (2011). Accuracy and reproducibility of a multiplex immunoassay platform: A validation study. *Journal of Immunological Methods*, 367(1–2), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.01.005>.
- Bartlett, P. C., Ruggiero, V. J., Hutchinson, H. C., Droscha, C. J., Norby, B., Sporer, K. R. B., & Taxis, T. M. (2020). Current developments in the epidemiology and control of enzootic bovine leukosis as caused by bovine leukemia virus. In *Pathogens* (Vol. 9, Issue 12, pp. 1–13). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121058>.
- Barajas, R. J. A. (2012). Banco de sueros en medicina veterinaria y zootecnia. *Expresiones veterinarias*. https://www.expresionesveterinarias.com/2012/11/banco-de-sueros-en-medicina-veterinaria_23.html.
- Bastarache, J. A., Koyama, T., Wickersham, N. E., Mitchell, D. B., Mernaugh, R. L., & Ware, L. B. (2011). Accuracy and reproducibility of a multiplex immunoassay platform: A validation study. *Journal of Immunological Methods*, 367(1–2), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.01.005>.
- Becher, P., Ramirez, R. A., Orlich, M., Rosales, S. C., König, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirmeier, H., & Thiel, H. J. (2003). Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, 311(1), 96–104. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00192-2](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00192-2).

- Berriatua, E., Juste, R., & Aduriz Gorka. (2005). Control de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) en la CAPV. https://www.euskadi.eus/gobierno-vasco/contenidos/informacion/resultados_investigacion/es_9873/adjuntos/rinotraqueitis.pdf.
- Bertolotti, L., Muratore, E., Nogarol, C., Caruso, C., Lucchese, L., Profiti, M., Anfossi, L., Masoero, L., Nardelli, S., & Rosati, S. (2015). Development and validation of an indirect ELISA as a confirmatory test for surveillance of infectious bovine rhinotracheitis in vaccinated herds. *BMC Veterinary Research*, 11(1)300. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0612-5>.
- Betancur H. C., Orrego U. A., & González T.M. (2010). Estudio seroepidemiológico del virus de parainfluenza 3 en bovinos del municipio de Montería (Colombia) con trastornos reproductivos. *Revista de Medicina Veterinaria*, 20, 63–70. <https://doi.org/10.19052/mv.583>.
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol*, 326, 245–254. [https://doi.org/10.1016%2Fs0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016%2Fs0076-6879(00)26058-8)
- Bosco, D. J., Clegg, T. A., Doherty, M. L., & More, S. J. (2012). Bovine viral diarrhoea virus seroprevalence and vaccination usage in dairy and beef herds in the Republic of Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 65(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-65-16/TABLES/4>.
- Bowland, S. L., & Shewen, P. E. (2000). Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 41(1), 33. PMID: [PMC1476343](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1476343/).
- Buehring, G. C., Shen, H. M., Jensen, H. M., Jin, D. L., Hudes, M., & Block, G. (2015). Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case-control study. *PLoS ONE*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134304>.
- Centre for Agricultural Bioscience International (CABI). (2021). Bovine parainfluenza 3 infection Invasive species compendium. CAB International. Consultado en abril de 2019. <https://doi.org/https://www.cabi.org/isc/datasheet/91744>.
- Can, M., Ataseven, V. S., & Yalçın, C. (2016). Estimation of production and reproductive performance losses in dairy cattle due to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) infection. *Veterinarski Arhiv*, 86(4), 499–513. <https://www.researchgate.net/publication/305567033>.
- Chen, C. T. (2021). Environmental issues and export competitiveness in U.S. animal agriculture [Iowa State University]. <https://dr.lib.iastate.edu/bitstreams/58587cdd-808f-4c92-98d5-7d2eb59d86c1/download>.
- Chowdhury, F., Williams, A., & Johnson, P. (2009). Validation and comparison of two multiplex technologies, Luminex® and Mesoscale Discovery, for human cytokine profiling. *Journal of Immunological Methods*, 340(1), 55–64. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2008.10.002>.
- Cinquanta, L., Fontana, D. E., & Bizzaro, N. (2017). Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Autoimmunity Highlights*, 8(1). <https://doi.org/10.1007/s13317-017-0097-2>.
- Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioural sciences* (2nd ed.). Hillsdale, NJ: Lawrence Elbaum.
- Cowley, DJ, Clegg, T. A., Doherty, M. L., & More, S. J. (2012). Bovine Viral diarrhoea virus seroprevalence and vaccination usage in dairy and beef herds in the Republic of Ireland. *Irish veterinary journal*. 65: 16. <http://www.irishvetjournal.org/content/65/1/16>.
- Crowther, J. R. (2009). *The ELISA Guidebook. Series Methods in molecular biology*. Humana Totowa, NJ 2nd ed. ISBN: 978-1-61737-884-3 Published: 19 November 2010. P 566. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-254-4>.
- Cruz, A., & Camargo, B. (2001). *Glosario de términos en parasitología y ciencias afines*. Instituto de Biología, Programa Universitario de Investigación en Salud. 345pp ISBN: 968-856-878-3.
- Dahl, G. E., Tao, S., & Laporta, J. (2020). Heat Stress Impacts Immune Status in Cows Across the Life Cycle. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00116>.
- Department Agricultural, Trade and Consumer protection DATCP Consultado en julio de 2023. <https://datcp.wi.gov/Pages/Homepage.aspx>.
- Day, M., & Schultz, R. (2014). *Veterinary immunology. Principles and Practice* (Taylor & Francis Group LLC, Ed.; 2a ed.). CRC Press. 336 pp. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/b16892>.
- Dayaram, A., Franz, M., Schattschneider, A., Damiani, A. M., Bischofberger, S., Osterrieder, N., & Greenwood, A. D. (2017). Long term stability and infectivity of herpesviruses in water. *Scientific Reports*, Apr 21;7:46559. <https://doi.org/10.1038/srep46559>. PMID: PMC5399353.
- De la Trinidad, S. H. (2010). Seroprevalencia y factores de riesgo de Rinotraqueítis infecciosa bovina en ranchos ganaderos de la Choapas, Minatitlán y Moloacan ubicados en la zona sur del estado de Veracruz, México. Tesis de Licenciatura.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Veracruzana, Veracruz, Ver. 48p.

<http://cdigital.uv.mx/handle/12345678/698>.

- DISCONTTOOLS. (2020). Discontools e-book. <https://www.discontools.eu/>.
- DOF SAGARPA (2012). ACUERDO por el que se establece la campaña nacional para el control de la garrapata *Boophilus* spp., Diario Oficial de la Federación. México, DOF, [10-09-2012]. Disponible en versión PDF en dof.gob.mx.
- DOF (2015). ACUERDO por el que se modifican y adicionan diversas disposiciones del similar por el que se establece la Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus* spp, Diario Oficial de la Federación. México, DOF, [28-01-2015]. Disponible en versión PDF en dof.gob.mx.
- DOF (2018). Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. Diario Oficial de la Federación. México, DOF, [29-11-2018]. Disponible en versión PDF en dof.gob.mx.
- DOF (2022): Acuerdo por el que se dan a conocer las Reglas de Operación del Programa de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, para el ejercicio fiscal 2023. Diario Oficial de la Federación. México, DOF, [30-12-2022]. Disponible en versión PDF en dof.gob.mx.
- EFSA sitio: <https://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa>. Consultado en 12 abril 2023.
- EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare) (2017) More S, Bøtner A, Butterworth A, Calistri P, Depner K, Edwards S, Garin-Bastuji B, Good M, Gortazar Schmidt C, Michel V, Miranda MA, Nielsen SS, Raj M, Sihvonen L, Spoolder H, Stegeman JA, Thulke H-H, Velarde A, Willeberg P, Winckler C, Baldinelli F, Broglia A, Dhollander S, Beltr an-Beck B, Kohnle L and Bicout D, 2017. Scientific Opinion on the assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): bovine viral diarrhoea (BVD). EFSA Journal 2017;15(8):4952, 45 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4952>.
- EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare) (2017a), More S, Bøtner A, Butterworth A, Calistri P, Depner K, Edwards S, Garin-Bastuji B, Good M, Gortazar Schmidt C, Michel V, Miranda MA, Nielsen SS, Raj M, Sihvonen L, Spoolder H, Stegeman JA, Thulke H-H, Velarde A, Willeberg P, Winckler C, Baldinelli F, Broglia A, Dhollander S, Beltr an-Beck B, Kohnle L, Morgado J and Bicout D, 2017. Scientific Opinion on the assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): infectious bovine rhinotracheitis (IBR). EFSA Journal 2017;15(7):4947, 25 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4947>.
- EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare). (2015). Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. EFSA Journal 2015;13(7): 4188, 63 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4188.
- Erskine, R., & Sordillo, L. (2009). Bovine Leukosis Virus Update I: Prevalence, Economic Losses, and Management. Michigan Dairy Review, 14(1). <http://nahms.aphis.usda.gov>.
- Espinosa, L. (2019). Evaluación de pools como herramienta para el monitoreo seroepidemiológico a nivel de hato de DVB, IBR, Leucosis y Neosporosis en regiones ganaderas del trópico mexicano. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fauquet, C., Stanley, J. (2005). Revising the way we conceive and name viruses below the species level: A review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. Arch Virol 150, 2151–2179. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0583-0>.
- Ferella, A., Sol, M., Aguirreburualde, P., Margineda, C., Aznar, N., Sammarruco, A., Jose, M., Santos, D., & Mozgovej, M. (2018). Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in feedlot cattle from Córdoba and Santa Fe, Argentina. Revista Argentina de Microbiología 50 (3): 275 - 279. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.07.004>.
- Findlay, J. W. A., Smith, W. C., Lee, J. W., Nordblom, G. D., Das, I., Desilva, B. S., Khan, M. N., & Bowsher, R. R. (2000). Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. In Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (Vol. 21) 1249-1273. www.elsevier.com/locate/jpba.
- French, A. J., Longest, A. K., Pan, J., Vikesland, P. J., Duggal, N. K., Marr, L. C., & Lakdawala, S. S. (2023). Environmental Stability of Enveloped Viruses Is Impacted by Initial Volume and Evaporation Kinetics of Droplets. MBio, 14(2)13pp. <https://doi.org/10.1128/mbio.03452-22>.
- Fulton RW, Ridpath JF, Saliki JT, Briggs RE, Confer AW, Burge LJ, Purdy CW, Loan RW, Duff GC, Payton ME. (2002). Bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. Can J Vet Res. Jul;66(3):181-90. PMID: 12146890; PMCID: PMC227002.
- Fulton, R. W., d'Offay, J. M., Eberle, R., Moller, R. R., Campen, R. V., O'Toole, D., Chase, C., Miller, M M., Sprowls, R., Nydam, D. V. (2015). Bovine herpesvirus-1: Evaluation of genetic diversity of subtypes derived from field strains of

- varied clinical syndromes and their relationship to vaccine strains. *Vaccine*. 33(4): 549-558. <https://doi.org/10.1128/mbio.03452-22>.
- Galván, M., Sarmiento, R., & Manjarrez, M. (2013). Modulación de la síntesis de interferones en la infección por paramixovirus. *Revisión Neumol Cir Torax*, 72(3), 241–255. www.medigraphic.org.mx.
- García, C. A., & Herrera, C. V. (2016). Universidad De La República de Uruguay. Facultad de Veterinaria: "Detección del virus de leucosis bovina enzoótica en la República de Uruguay. Tesis de Doctorado.
- Gary, F., Clauss, M., Bonbon, E., & Myers, L. (2021). Good emergency management practice - The essentials. In *Good emergency management practice - The essentials*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cb3833en>.
- Givens, M. D. (2018). Review: Risks of disease transmission through semen in cattle. In *Animal* (Vol. 12, Issue s1, pp. s165–s171). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000708>.
- Gnad, D., Sargeant, J. M., Chenoweth, P. J., & Walz, D. P. H. (2004). Prevalence of bovine leukemia virus in young, purebred beef bulls for sale in Kansas. *Intern. J Appl Res Vet Med*. 2(3), 215-219. <http://www.jarvm.com/articles/Vol2Iss3/GNADJARVMVol2No304.pdf>.
- Gomez-Romero, N., Ridpath, J. F., Basurto-Alcantara, F. J., & Verdugo-Rodríguez, A. (2021). Bovine Viral Diarrhea Virus in Cattle from Mexico: Current Status. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.673577>.
- González-Guerra A. & González-Guerra E. (2020). *Epidemiología. Más Dermatol*. 32: 37-38.
- González-Padilla, E. Lassasa, A., Pedernera, M., & Gutierrez, C. (2019). Cow-calf management practices in Mexico: Farm organization and infrastructure. *Veterinaria México OA*, 6(3)17pp. doi: <https://doi.org/10.22201/fmvz.24486760e.2019.3.677>.
- Goyal, S. M. & Ridpath, J. F. (2008) Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control, *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control*. 261pp. doi: 10.1002/9780470344453.
- Graham, H., Chandler, D. J., & Dunbar, S. A. (2019). The genesis and evolution of bead-based multiplexing. In *Methods* (Vol. 158, pp. 2–11). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.01.007>.
- Grange, R. D., Thompson, J. P., Lambert, D. G., & Mahajan, R. P. (2014). Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. In *British Journal of Anaesthesia* (Vol. 112, Issue 2, pp. 213–216). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/bja/aet293>.
- Gregg, M. (2008). *Field Epidemiology* (M. Gregg, Ed.; 3rd ed.). Oxford University Press.
- 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(1–2), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.12.012>.
- Gupta, S., Sharma, A., Joy, A., Rowland Dunshea, F., Singh Chauhan, S., & Sarwan Kumar Himachal Pradesh Krishi Vishvavidalya, C. (2023). The Impact of Heat Stress on Immune Status of Dairy Cattle and Strategies to Ameliorate the Negative Effects. *Animals*, 13(107), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ani13010107>.
- Gutiérrez, S., Lützelshwab, C., Barrios, C., & Juliarena, M. (2020). Bovine Leukosis: An updated review. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, 31(3). <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V31I3.16913>.
- Gutiérrez, G., Alvarez, I., Fondevila, N., Politzki, R., Lomónaco, M., Rodríguez, S., Dos Santos, M.J., Trono, K. (2009) Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. *Veterinary Microbiology*, 137(3-4), 224-234.
- Hanon, J. B., De Baere, M., de la Ferté, C., Roelandt, S., Guillot, G., Van der Stede, Y., & Cay, B. (2018). Serological monitoring on milk and serum samples in a BVD eradication program: A field study in Belgium showing antibody ELISA performances and epidemiological aspects. *Preventive Veterinary Medicine*, 160, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.07.008>.
- Hawcroft, D., Hector, T., & Rowell, F. (1987). *Quantitative Bioassay: Analytical Chemistry by Open Learning*. Wiley Editorial.
- Hay, S. I., Guerra, C. A., Tatem, A. J., Noor, A. M., & Snow, R. W. (2004). The global distribution and population at risk of malaria: Past, present, and future. In *Lancet Infectious Diseases*, 4: 6, 327–336. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01043-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01043-6).
- Health for animals: Global animal health association. World Veterinary Association. In: https://www.healthforanimals.org/animalhealthmatters/es/chapter_2a.php#chapter-2a.

- Hopkins, S. G., & DiGiacomo, R. F. (1997). Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 13(1), 107–128. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30367-4](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30367-4).
- Houe, H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*, 64(2–3), 89–107. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00262-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00262-4).
- Houe, H., & Meyling, A. (1991). Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Preventive Veterinary Medicine*, 11(1), 9–16. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(05\)80040-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(05)80040-6).
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) Censo Agropecuario, www.inegi.org.mx. 2019.
- Irimia, E., Mincu, M., Pogurschi, E. N., Hodnik, J. J., & Santman-Berends, I. M. G. A. (2021). Enzootic Bovine Leukosis: Surveillance Measures and Control Program in the Northern Dobruja Area of Romania Between 2017 and 2020. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.687287>.
- Iscaro, C., Cambiotti, V., Petrini, S., & Feliziani, F. (2021). Control programs for infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in European countries: An overview. In *Animal Health Research Reviews*, 22: 2, 136–146). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S1466252321000116>.
- Kim, W.-S., Nejad, J. G., & Lee, H.-G. (2023). Impact of Cold Stress on Physiological, Endocrinological, Immunological, Metabolic, and Behavioral Changes of Beef Cattle at Different Stages of Growth. *Animals*, 13(6), 1073 <https://doi.org/10.3390/ani13061073>.
- Kohara, J., Takeuchi, M., Hirano, Y., Sakurai, Y., & Takahashi, T. (2018). Vector control efficacy of fly nets preventing bovine leukemia virus transmission. In *Journal of Veterinary Medical Science* (Vol. 80, Issue 10, pp. 1524–1527). Japanese Society of Veterinary Science. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0199>.
- Kono, Y., Sentsui, H., Miyamoto, T., Morozumi, K., & Sakamoto, Y. (1982). Changes in antibody titers in cattle infected clinically and subclinically with bovine leukemia virus. *International Journal of Cancer*, 30(5), 655–657. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910300517>.
- Kuczewski, A., Orsel, K., Barkema, H.W., Mason, S., Erskine, R., van der Meer, F. (2021). Invited review: Bovine leukemia virus-Transmission, control, and eradication. *J Dairy Sci.* Jun;104(6):6358-6375. doi: 10.3168/jds.2020-18925. Epub 2021 Mar 23. PMID: 33741150.
- Kumar SK, P. K. (2018). Herd-level risk factors for bovine viral diarrhea infection in cattle of Tamil Nadu. *Tropical animal health and production*, 50, 793 -799.
- Labadie, T., Batéjat, C., Leclercq, I., & Manuguerra, J. C. (2020). Historical Discoveries on Viruses in the Environment and Their Impact on Public Health. In *Intervirolgy* (Vol. 63, Issues 1–6, pp. 17–32). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000511575>.
- Lane J, Jubb T, Shephard R, Webb-Ware, J., & Fordyce, G. (2015). Priority list of endemic diseases for the red meat industries. Final Report.B.AHE.0010. Meat and Livestock Australia. 282 páginas. [School of Veterinary Science Publications. Queensland Alliance for Agriculture and Food Innovation.](https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:360734) <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:360734>.
- Lara, G., & Alvarado, D. (2020). Livestock and products annual. <https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Livestock+and+Products+Annual+Mexico+City+Mexico+08-01-2020>.
- Lash GE, Scaife PJ, Innes BA, Otun HA, Robson SC, Searle RF, Bulmer JN. (2006). Comparison of three multiplex cytokine analysis systems: Luminex®, SearchLight and FAST Quant. *J Immunol Methods*. Feb 20;309(1-2):205-8. doi: 10.1016/j.jim.2005.12.007. PMID: 16436279.
- Lassala, A., Hernández-Cerón, J., Pedernera, M., González-Padilla, E., & Gutiérrez, C. G. (2020). Cow-calf management practices in Mexico: Reproduction and breeding. *Veterinaria Mexico*, 7(1). <https://doi.org/10.22201/fmvz.24486760e.2020.1.839>.
- Lértora, W. J. (2003). Diarrea Viral Bovina: actualización. *Rev. Vet FCV UNNE*, 14(1), 1–11. www.producción-animal.com.ar.

- Lindenbach, B.D., Thiel, H. J., Rice, C. M. (2007). Flaviviridae: The viruses and their replication. D.M. Knipe, P.M. Howley (Eds.) *Fields Virology* (5th edn.), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2007), pp. 1101-1152.
- López, T. (2014). Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros. Tesis de Maestría en Ciencias de La producción y de la salud animal. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Makoschey, B., & Berge, A. C. (2021). Review on bovine respiratory syncytial virus and bovine parainfluenza – usual suspects in bovine respiratory disease – a narrative review. In *BMC Veterinary Research* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02935-5>.
- Marginada, C.A., Ferella, A., Perez Aguirreburualde, M.S., Sammarruco, A., Gonzalez, D.D., Toledo, G., Dus Santos, M.J., & Mozgovej, M. (2019). Estudio de la respuesta inmune frente a la vacunación con virus respiratorio sincitial bovino (VRSB) inactivado en bovinos. Evaluación de la inmunidad pasiva. RIA. *Revista de investigaciones agropecuarias*, 45(1), 81-87. Recuperado en 28 de junio de 2023, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-23142019000100081&lng=es&tlng=es.
- Marini, M. del R. (2008) Identificación del virus de la diarrea viral bovina mediante Inmunohistoquímica en abortos bovinos de la cuenca lechera santafesina y comparación con los resultados obtenidos con el aislamiento viral y la inmunofluorescencia directa. Universidad Nacional Del Litoral.
- Marzocca, M. P. (2003) Caracterización de antígenos recombinantes de la glicoproteína E2 del virus de la diarrea viral bovina y su utilización como vacunas y reactivos de diagnóstico Director de Tesis. Universidad de Buenos Aires.
- Meng B, Lever AML. The Interplay between ESCRT and Viral Factors in the Enveloped Virus Life Cycle. *Viruses*. 2021 Feb 20;13(2):324. doi: 10.3390/v13020324. PMID: 33672541; PMCID: PMC7923801.
- Milián-Suazo, F., Hernández-Ortiz, R., Hernández-Andrade, L., Alvarado-Islas, A., Díaz-Aparicio, E., Mejía-Estrada, F., Palomares-Reséndiz, E. G., Reyes, I. B., & Zendejas-Martínez, H. (2016). Journal of Veterinary Medicine and Animal Health Seroprevalence and risk factors for reproductive diseases in dairy cattle in Mexico. 8(8), 89–98. <https://doi.org/10.5897/JVMAH2016.0483>.
- Miller, J. M., & Van der Maaten, M. J. (1982). Bovine Leukosis — Its Importance to the Dairy Industry in the United States. *Journal of Dairy Science*, 65(11), 2194–2203. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82482-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82482-X).
- Ministerio de Agricultura, P. y A. (2021). PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA Y CONTROL DE LA LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA 2021-2025. www.mapa.es.
- Moennig, V., & Becher, P. (2018). Control of bovine viral diarrhoea. In *Pathogens* (Vol. 7, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010029>.
- Molina, S., Castaño, H., Arboleda, J., Cadavid, J., & Zapata, O. (1998). Estudio serológico para el virus de parainfluenza-3 en el hato BON en el Departamento de Antioquia. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 11(2), 81–86. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/view/326035/20783339>.
- Monroy, J., Larios, F., Madewell, B., & Trigo, F. (1987). Estudio seroepizootológico de la Leucosis bovina en México. *Téc. Pec. Méx.*, 25(2), 151–154.
- Montaño M. F. G., Godoy L. R. F., Rentería, T. B. E., Montaño M. F. H., Melendrez, J. L., Valenzuela, R. M. P., Arango M. L. P., Corral, A. M., & Sánchez, L. R. S. (2018). Estimación parcial de pérdidas económicas asociadas a la presencia de leucosis viral bovina en un hato lechero del valle de Mexicali. Instituto de investigaciones en Ciencias Veterinaria, Universidad Autónoma de Baja California. Engormix https://www.engormix.com/lecheria/leucosis-lecheria/estimacion-parcial-perdidas-economicas_a42010/.
- Morris, D. H., Yinda, K. C., Gamble, A., Rossine, F. W., Huang, Q., Bushmaker, T., Fischer, R. J., Jeremiah Matson, M., van Doremalen, N., Vikesland, P.J., Marr, LC., Munster, VJ., & Lloyd-Smith, JO. (2021). Mechanistic theory predicts the effects of temperature and humidity on inactivation of sars-cov-2 and other enveloped viruses. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.65902>.
- Murphy, F., Gibbs, E., Horzinek, M., & Studdert, M. (1999). *Veterinary virology* (3rd ed.). Academic Press.
- Muykens, B., Thiry, J., Kirten, P., Schynts, F., & Thiry, E. (2007). Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. In *Veterinary Research* (Vol. 38, Issue 2, pp. 181–209). <https://doi.org/10.1051/vetres:2006059>.
- Nájera, H. (2020). Construcción de la glicoproteína B recombinante de rinotraqueitis infecciosa bovina para probarla como antígeno en un sistema de diagnóstico inmunológico Luminex.

- National Research Council (US) Committee on Achieving Sustainable Global Capacity for Surveillance and Response to Emerging Diseases of Zoonotic Origin. Sustaining Global Surveillance and Response to Emerging Zoonotic Diseases, Keusch, G. T., Papaioanou, M., Gonzalez, M. C., Scott, K. A., Tsai, P., Eds.; National Academies Press: Washington, DC, USA, 2009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK215320/>.
- NOM (1996). NORMA Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. DOF [08-20-1996].
- NOM (2010). NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA-2010, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores.
- NOM (2012). NORMA Oficial Mexicana NOM-017-SSA-2012, Para la vigilancia epidemiológica.
- OIE: (2015). Animal Health: a multifaceted challenge. Obtenido de http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Key_Documents/ANIMAL-HEALTH-EN-FINAL.pdf.
- OIE (2016). World Organisation for Animal Health. The economics of animal health: direct and indirect costs of animal disease outbreaks. Paris, France. 2016. https://bulletin.woah.org/?panorama=05-1-02-2021-1_tt.
- OIE. (2018a). Diarrea Viral Bovina. Capítulo 3.4.7. En Manual terrestre de la OIE (27th ed., pp. 1–24). Obtenido de https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.07_BVD.pdf.
- OIE. (2018b). Leucosis bovina enzoótica. Capítulo 3.4.9. En Manual Terrestre de la OIE. Obtenido de https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.09_Leucosis_bovina_enzoótica.pdf.
- OIE. (2018c). Principios y métodos de validación de pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Capítulo 1.1.2. En Manual Terrestre de la OIE. Obtenido de https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/temporary_esp/2022/1.1.02_VALIDATION_Spanish.pdf.
- OIE / Organización Mundial de Sanidad Animal. (2022). Código Sanitario para los Animales Terrestres. Versión en línea. www.woah.org.
- OIE / Organización Mundial de Sanidad Animal. (2023). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Última actualización 21/02/23. Obtenido de https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/E_summry.htm.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (2010). Ganadería bovina en América Latina: Escenarios 2008-2009 y tendencias del sector. Santiago de Chile. 2010 <https://www.fao.org/3/i3788s/i3788s.pdf>.
- Padalino, B., Cirone, F., Zappaterra, M., Tullio, D., Ficco, G., Giustino, A., Ndiana, L. A., & Pratelli, A. (2021). Factors Affecting the Development of Bovine Respiratory Disease: A Cross-Sectional Study in Beef Steers Shipped From France to Italy. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.627894>.
- Pal, A., & Chakravarty, A. K. (2020). Disease resistance for different livestock species. In *Genetics and Breeding for Disease Resistance of Livestock* (pp. 271–296). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816406-8.00019-x>.
- Peel, D. (2022, October 17). Mexican beef and cattle industry development continues. Oklahoma State University. <https://www.drovers.com/news/industry/peel-mexican-beef-and-cattle-industry-development-continues>.
- Peters, A. R., Thevasagayam, S. J., Wiseman, A., & Salt, J. S. (2004). Duration of immunity of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV, and BRSV in experimentally infected calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 66(1–4), 63–77. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.08.001>.
- Polsky, L., & von Keyserlingk, M. A. G. (2017). Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *Journal of Dairy Science*, 100(11), 8645–8657. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12651>.
- Potgieter, L. N. (1995). Immunology of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 11(3), 501–520. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30464-3](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30464-3).
- Pulido, M., González, W., Bayona, H., & Chavarro, G. (2017). Determinación de Leucosis enzoótica bovina mediante las claves hematológicas de Göttingen y ELISA en Boyacá, Colombia. *Revista de La Facultad de Ciencias Veterinarias*, 58(1), 10–16.
- Raaperi, K., Orro, T., & Viltrop, A. (2014). Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. In *Veterinary Journal* (Vol. 201, Issue 3, pp. 249–256). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tvj.2014.05.040>.
- Ramírez, G., Vera, V., Villamil, L. (1999). Diarrea viral bovina – DVB: Inmunosupresión y efectos en la reproducción bovina. *El Cebú*. 32-40.
- Rasmussen, S., & Goodman, R. (2019). *THE CDC FIELD EPIDEMIOLOGY MANUAL* (4th ed.). Oxford University Press.

- Ravindran, R., Khan, I. H., Krishnan, V. V., Ziman, M., Kendall, L. V., Frasier, J. M., Bates, R., Griffey, S. M., Fahey, J. R., & Luciw, P. A. (2010). Validation of multiplex microbead immunoassay for simultaneous serodetection of multiple infectious agents in laboratory mouse. *Journal of Immunological Methods*, 363(1), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.10.003>.
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493–497. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A118408/2/27-3-493.PDF.GIF>.
- Requisitos y protocolo de cuarentena para exportar ganado bovino. www.gob.mx
<https://www.gob.mx/senasica/documentos/protocolos-para-la-exportacion-zoosanitarios?state=published>. Consultado el 31/07/2023.
- Richter, V., Lebl, K., Baumgartner, W., Obritzhauser, W., Käsbohrer, A., & Pinior, B. (2017). A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *The Veterinary Journal*, 220, 80–87. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2017.01.005>.
- Ridpath, J. (2012). Preventive strategy for BVDV infection in North America. In *Japanese Journal of Veterinary Research* (Vol. 60).
- Rijsewijk F. A., Kaashoek M. J., Langeveld J. P., Meloen R., Judek J., Bienkowska-Szewczyk K., Maris-Veldhuis M. A., & Oirschot J. T. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains, *J. Gen. Virol.* (1999) 80:1477–1483.
- Rivera, H. (2008). Artículo de revisión: Evolución del conocimiento sobre la enfermedad de la Diarrea Viral Bovina y su agente etiológico evolution of the understanding of bovine viral diarrhea and its etiological agent. *Rev Inv Vet Perú* (Vol. 19, Issue 1).
- Robertson, O. H., Puck, T. T., & Wise, H. (1946). The construction and operation of experimental rooms for the study of airborne infection. *J. Exp Med. Dec*; 84(6): 559–67.
- Rodríguez, S.M., Florins, A., Gillet, N., de Brogniez, A., Sánchez-Alcaraz, M.T., Boxus, M., Boulanger, F., Gutiérrez, G., Trono, K., Alvarez, I., Vagnoni, L., Willems, L. (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses*. Jul;3(7):1210-48. doi: 10.3390/v3071210. Epub 2011 Jul 19. PMID: 21994777; PMCID: PMC3185795.
- Rocha-Valdez, L., González-Ávalos, R., Avila-Cisneros, R., Peña-Revuelta, B., & Rocha- Quiñones, J. (2020). El efecto económico causado por aborto en vacas Holstein de primer parto. *Abanico Agroforestal*, 2. <https://doi.org/10.37114/abaagrof/2020.9>.
- Rojas, M., Loza, R., Rodríguez, C., Figueroa, M., Aguilar, RF, Lagunes, Q., Morales, A., Santillán, F., Socci, E., & Álvarez, M. (2021). Background and perspectives of certain priority diseases affecting cattle farming in Mexico. In *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias* (Vol. 12, pp. 111–148). INIFAP-CENID Parasitología Veterinaria. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5848>.
- Rondón, I. (2006). Diarrea viral bovina: patogénesis e inmunopatología. *Rev. MVZ Córdoba*, 11(1), 694–704.
- Rosete, F. J., Ríos, U. A., Zárate, M. J., Olazarán, J. S., Granados, Z. L., Frago, I. A., Banda, R. V., & Socci, E. G. (2018). Prevalence of antibodies against bovine viral diarrhea in non-vaccinated cows from the States of Puebla, Tabasco and Veracruz, Mexico. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 9(3), 555–566. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i3.4599>.
- Samudio E. y De Gracia A. (2019). *Manual Regional de Buenas Prácticas para la Gestión de Emergencias Sanitarias para los países de la región OIRSA*. San Salvador, El Salvador. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. Nº de páginas: 119.
- Santman-Berends, I. M. G. A., Mars, M. H., Weber, M. F., van Duijn, L., Waldeck, H. W. F., Biesheuvel, M. M., van den Brink, K. M. J. A., Dijkstra, T., Hodnik, J. J., Strain, S. A. J., de Roo, A., Veldhuis, A. M. B., & van Schaik, G. (2021). Control and Eradication Programs for Non-EU Regulated Cattle Diseases in the Netherlands. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.670419>.
- Sacco, R. E., McGill, J. L., Pillatzki, A. E., Palmer, M. V., & Ackermann, M. R. (2014). Respiratory syncytial virus infection in cattle. *Veterinary Pathology*, 51(2), 427–436. <https://doi.org/10.1177/0300985813501341>.
- Sandvik, T. (1999) Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle'. In *Veterinary Microbiology*. doi: 10.1016/S0378-1135(98)00264-8.
- SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural) | 16 de marzo de 2020 | Comunicado. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/la-produccion-de-carne-de-res-en-mexico-mantiene-un-crecimiento-anual-sostenible-del-2-5-agricultura>.

- SADER (2023). <https://www.gob.mx/agricultura>.
- SADER (2023a). <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/acuerdan-mexico-y-estados-unidos-protocolo-para-movilizacion-de-ganado-de-alto-registro-certificado>.
- SAGARPA. (2018). Ley Federal de Sanidad Animal. D.O.F. el 25 de julio de 2007.
- Sambrook, J., & Maniatis, F. (1985). *Molecular Cloning: a laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory. www.cshlpress.org.
- Sánchez Conde, M., & España, M. (2010). Infecciones víricas. In *Medicine* (Vol. 10, Issue 59).
- Sánchez, O. (2010). Dinámica de la infección de los virus del complejo respiratorio bovino; IBR, DVB, PI3 y VRSB y evaluación de la respuesta a la vacunación en hatos de la cuenca del Valle del Mezquital, Hidalgo [UNAM]. http://132.248.9.195/ptb2010/mayo/0657902/0657902_A1.pdf.
- Sánchez, Y., & Rodríguez, J. (2012). Simultaneidad serológica de neospora caninum con brucella abortus y los virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina y diarrea viral bovina en bovinos pertenecientes al Estado de Hidalgo, México. *Rev. Salud Anim.*, 34(2). <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v34n2/rsa06212.pdf>.
- Sarmiento-Silva, R. E., Nakamura-Lopez, Y., & Vaughan, G. (2012). Epidemiology, molecular epidemiology and evolution of bovine respiratory syncytial virus. In *Viruses* (Vol. 4, Issue 12, pp. 3452–3467). <https://doi.org/10.3390/v4123452>.
- Sarrazin S, V. A. (2013). Serological and virological BVDV prevalence and risk factor analysis for herds to be BVDV seopositive in Belgian cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 28 - 37.
- Schirmmeier, H., Nther Strebelow, G., Depner, K., Hoffmann, B., & Beer, M. (2004). Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *Journal of General Virology*, 85, 3647–3652. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80238-0>.
- Schwzyer, M. & Ackermann, M. (1996). Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Veterinary Microbiology*, 53, 17–29. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80238-0>.
- Segura Correa J. C., & Honhold, N. (2000). *Métodos de muestreo para la producción y la salud animal*. Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán.
- SENASICA (2023) <https://www.gob.mx/senasica>.
- SIAP-SAGARPA. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. *Inventario ganadero*. 2022.
- Sieglwart, N., Hilbe, M., Hässig, M., & Braun, U. (2006). Increased risk of BVDV infection of calves from pregnant dams on communal Alpine pastures in Switzerland. *Veterinary journal*. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2005.07.018>.
- Silva, B., Aragão, B. B., & Pinheiro, J. W. (2021). Economic impacts of Bovine alphaherpesvirus 1 infection in Brazil: Meta-analysis based on epidemiological indicators. In *Semina: Ciências Agrárias* (Vol. 42, Issue 6, pp. 3355–3378). Universidade Estadual de Londrina. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n6p3355>.
- SIVE. (2023). *Informes anuales y semestrales a la OIE*.
- SIVE. (2021). Acuerdo mediante el cual se dan a conocer las medidas aplicables en materia de epidemiología y de vigilancia epidemiológica en animales terrestres y el uso de la información del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en los Estados Unidos Mexicanos [14-06-2021].
- Solis-Calderon, J. J., Segura-Correa, V. M., Segura-Correa, J. C., & Alvarado-Islas, A. (2003). Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, 57(4), 199–208. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(02\)00230-1](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(02)00230-1).
- Ståhl, K., Beer, M., Schirmmeier, H., Hoffmann, B., Belák, S., & Alenius, S. (2010). Atypical 'HoBi'-like pestiviruses—Recent findings and implications thereof. *Veterinary Microbiology*, 142(1–2), 90–93. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2009.09.048>.
- Ståhl, K., Kampa, J., Alenius, S., Persson, A., Baule, C., Aiumlamai, S., & Belák, S. (2007). Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi'-like pestivirus—Implications for BVD control and for the safety of biological products. *Veterinary Research*, 38, 517–523. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007012>.
- Ståhl, K., Rivera, H., Vågsholm, I., & Moreno-López, J. (2002). Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. *Preventive Veterinary Medicine*, 56, 193–202. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(02\)00161-7](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(02)00161-7).
- Sullender W. M. (2000). Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev.* Jan;13(1):1-15, table of contents. doi: 10.1128/CMR.13.1.1. PMID: 10627488; PMCID: PMC88930. doi: [10.1128/cmr.13.1.1-15.2000](https://doi.org/10.1128/cmr.13.1.1-15.2000).
- Summer, A., Lora, I., Formaggioni, P., & Gottardo, F. (2019). Impact of heat stress on milk and meat production. *Animal Frontiers*, 9(1), 39–46. <https://doi.org/10.1093/af/vfy026>.

- Suzan, V., Onuma, M., Aguilar, R., & Murakami, Y. (1983). Prevalence of Bovine Herpesvirus-1, Parainfluenza-3, Bovine Rotavirus, Bovine viral diarrhoea, Bovine Adenovirus-7, Bovine Leukemia virus and Blue Tongue Virus antibodies in cattle in Mexico. *Jpn. J. Vet. Res*, 31, 125–132. PMID: 6316006.
- TAEP <https://www.tn.gov/agriculture/farms/taep.html>.
- Torres, D. (2020). Evaluación del antígeno recombinante E2 y viriones en el diagnóstico serológico del virus de diarrea viral bovina mediante ELISA indirecto. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 65 páginas. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3570600>.
- Trigo, F. J. (1987). El complejo respiratorio en bovinos y ovinos. In *Ciencia Veterinaria*.
- ViralZone. (2009). Viralzone. <https://viralzone.expasy.org>.
- Van Campen, H. (2010). Epidemiology and control of BVD in the U.S. *Veterinary Microbiology*, 142(1–2), 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.049>.
- Van Roon, A. M., Mercat, M., van Schaik, G., Nielen, M., Graham, D. A., More, S. J., Guelbenzu-Gonzalo, M., Fourichon, C., Madouasse, A., & Santman-Berends, I. M. G. A. (2020). Quantification of risk factors for bovine viral diarrhoea virus in cattle herds: A systematic search and meta-analysis of observational studies. *Journal of Dairy Science*, 103(10), 9446–9463. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18193>.
- Vizcaíno-Salazar, G. J. (2017). Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico analítico y de laboratorio. *Medicina & Laboratorio*. 23: (7-8) 365-386. <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/05/883697/importancia-calculo-sensibilidad-y-especificidad.pdf>.
- Votteler, J., & Sundquist, W. I. (2013). Virus budding and the ESCRT pathway. In *Cell Host and Microbe*. 14; (3), pp. 232–241. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.08.012>.
- WAHIS. (2020). Base de datos del sistema mundial de información zoonosaria. Versión 1. <http://wahis.woah.org/#/home>.
- Walker P. J., Siddell S. G., Lefkowitz E. J., Mushegian A. R., Adriaenssens E. M., Alfenas-Zerbini P., Dempsey D. M., Dutilh B. E., García M. L., Curtis Hendrickson R., Junglen S., Krupovic M., Kuhn J. H., Lambert A. J., Łobocka M., Oksanen H. M., Orton R. J., Robertson D. L., Rubino L., Sabanadzovic S., Simmonds P., Smith D. B., Suzuki N., Van Doorslaer K., Vandamme A. M., Varsani A., Zerbini F. M. (2022). *Arch Virol*. 2022 Aug 23. doi: 10.1007/s00705-022-05516-5. Epub ahead of print. PMID: 35999326.
- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, 85(2), 328–345. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2009.10.008>.
- Weinstock D, Bhudevi B, Castro AE. (2001). Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum. *J Clin Microbiol*. 2001 Jan;39(1):343-6. doi: 10.1128/JCM.39.1.343-346.2001. PMID: 11136796; PMCID: PMC87727.
- Wellemans, G. (1977). Laboratory Diagnosis Methods for bovine respiratory syncytial virus. *Veterinary Science Communications*, 1, 179–189. <https://doi.org/10.1007%2FBF02267648>.
- Wernike, K., Schirrmeyer, H., Strebelow, H. G., & Beer, M. (2017). Eradication of bovine viral diarrhoea virus in Germany- Diversity of subtypes and detection of live-vaccine viruses. *Veterinary Microbiology*, 208, 25–29. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2017.07.009>.
- Wernike, K., & Beer, M. (2019). Diagnostics in the context of an eradication program: Results of the German bovine viral diarrhoea proficiency trial. *Veterinary Microbiology*, 239, 108452. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2019.108452>.
- Yan, B. F., Chao, Y. J., Chen, Z., Tian, K. G., Wang, C. B., Lin, X. M., Chen, H. C., & Guo, A. Z. (2008). Serological survey of bovine herpesvirus type 1 infection in China. *Veterinary Microbiology*, 127(1–2), 136–141. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2007.08.025>.
- Youngquist, R., & Threlfall, W. (1997). *Current therapy in large animal theriogenology*. Saunders Elsevier.
- Zanella, R. (2016). Genomic tools and animal health. In *Veterinary Sciences* (Vol. 3, Issue 3). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/vetsci3030021>.
- Zárate, M. F., Preisegger, G., Abranchik, P., Milano, F., y García, J. P. (2022). Malformaciones músculo-esqueléticas bovinas de alta incidencia poblacional en Tandil, Argentina. Tesina de la orientación Sanidad Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias UNCPBA.
- Zhou, Y., Li, X., Ren, Y., Hou, X., Liu, Y., Wei, S., Dai, G., Meng, Y., Hu, L., Liu, Z., Jia, W., Zhu, Z., & Wu, R. (2020). Phylogenetic analysis and characterization of bovine herpesvirus-1 in cattle of China, 2016–2019. *Infection, Genetics and Evolution*, 85. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104416>.
