

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE AGRONOMIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA



TESIS

**SEROPREVALENCIA MOLECULAR DE CEPAS EMERGENTES DEL VIRUS
LENGUA AZUL EN VACUNOS DEL DISTRITO DE CHALLABAMBA -
PAUCARTAMBO – CUSCO**

PRESENTADA POR:

BACH. MARYNES TUPAYACHI
HUAYHUA

**PARA OPTAR AL TÍTULO
PROFESIONAL DE INGENIERO
ZOOTECNISTA**

ASESORES:

DR. WALTER GUILLERMO VERGARA
ABARCA

M.SC. SANTOS WILTON CALDERÓN RUIZ

ING. FIORELA GUZMÁN FIGUEROA

**FINANCIADO POR: YACHAYNINCHIS
WIÑARINANPAQ**

CUSCO – PERÚ

2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, Asesor del trabajo de investigación/tesis titulada: SEROPREVALENCIA MOLECULAR DE CEPAS EMERGENTES DEL VIRUS LENGUA AZUL EN VACUNOS DEL DISTRITO DE CHALLABAMBA - PAUCARTAMBO - CUSCO

presentado por: MARYNES TURAYACHI HUAYHUA con DNI Nro.: 46472102 presentado por: con DNI Nro.: para optar el título profesional/grado académico de INGENIERO ZOOTECNISTA

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 2 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 4 %.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 29 de Diciembre de 2024

Firma

Post firma

Nro. de DNI 31016563

ORCID del Asesor 0000 - 0002 - 6688 - 7471

ORCID: 0000 - 0001 - 8091 - 5814 - DNI: 70991650

ORCID: 0000 - 0002 - 9913 - 5831 - DNI: 26960866

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oid: 27259:418988991

MARYNES TUPAYACHI HUAYHUA

SEROPREVALENCIA MOLECULAR DE CEPAS EMERGENTES DEL VIRUS LENGUA AZUL EN VACUNOS DEL DISTRITO DE CHALL

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::27259:418988991

113 Páginas

Fecha de entrega

29 dic 2024, 10:53 a.m. GMT-5

16,614 Palabras

Fecha de descarga

29 dic 2024, 11:50 a.m. GMT-5

90,843 Caracteres

Nombre de archivo

TESIS FINAL MARYNES TUPAYACHI HUAYHUA-2024.docx

Tamaño de archivo

8.3 MB

4% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Exclusiones

- N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

- 4%  Fuentes de Internet
- 2%  Publicaciones
- 2%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, quienes me enseñaron a ser fuerte durante este arduo proceso de investigación, a mis padres, mis hermanos y a mi pareja, quienes siempre estuvieron a mi lado, brindándome palabras de aliento y motivación en los momentos más desafiantes. A mis docentes y compañeros, cuya sabiduría y orientación han sido fundamentales en mi formación académica. Gracias a todos aquellos que creyeron en mí y me inspiraron para alcanzar esta meta. Este logro es también de ustedes.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por estar presente en mi vida, permitirme vivir, disfrutar cada día, guiarme, por darme fortaleza y enseñarme a no rendirme.

Son muchas las personas que han contribuido en el proceso y conclusión de este trabajo de investigación; agradezco al Dr. Ing. Walter Guillermo Vergara Abarca y M.SC. M.V. Santos Wilton Calderón Ruiz e Ing. Fiorela Guzmán Figueroa, quienes me asesoraron en la ejecución de esta investigación.

Al laboratorio institucional de investigación de “Sanidad Animal M.V. Atilio Pacheco”, de la Escuela Profesional de Zootecnia – UNSAAC, lugar donde se ejecutó el presente trabajo de investigación.

Expreso mi más profundo agradecimiento a la universidad nacional de San Antonio abad del Cusco (UNSAAC), por el apoyo brindado a través del esquema financiero n° 014-2021 en el marco del programa Wachayninchis Wiñarinpapaq, que permitió la realización del proyecto “Detección molecular y serológica de cepas emergentes del virus lengua azul en rumiantes domésticos, alpacas y llamas del departamento del Cusco”.

A todos los integrantes del proyecto “Detección molecular y serológica de cepas emergentes del virus lengua azul en rumiantes domésticos, alpacas y llamas del departamento del Cusco”: Yari Zarate Quispe, Magali Román Ccansaya y Beli Usca Llamocca, mi profundo agradecimiento por el apoyo y afecto desde el día que nos conocimos.

A Lenin Ordoñez, por su apoyo en la coordinación con los productores de vacunos del distrito de Challabamba para realizar la toma de muestras.

A mis familiares por su apoyo, cariño, comprensión y paciencia, mi profundo agradecimiento a ellos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN	1
I. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN	3
II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	4
2.1. OBJETIVOS	4
2.1.1. Objetivo general	4
2.1.2. Objetivos específico	4
2.2. JUSTIFICACIÓN	5
III. MARCO TEÓRICO	6
3.1. Antecedentes.....	6
3.2. Bases teóricas.....	7
3.2.1. Población de vacunos en la región Cusco	7
3.2.2. Agente etiológico de la enfermedad de la lengua azul	8
3.2.2.1. Historia del virus lengua azul	8
3.2.3.2. Clasificación taxonómica.....	9
3.2.3.3. Morfología del virus lengua azul	10
3.2.3.4. Inicio de la replicación viral	12

3.2.3.5. Serotipos del virus lengua azul	13
3.2.2. Vector mosquito <i>Culicoides ssp</i>	14
3.2.3. Patogenia del virus lengua azul	14
3.2.3.1. Hospederos.....	14
3.2.3.2 Transmisión del virus.....	15
3.2.3.3. Replicación del vector en los tejidos	16
3.2.3.4. Inmunidad	16
3.2.3.5. Signos clínicos y lesiones en el ganado vacuno.....	17
3.2.4. Distribución geográfica	17
3.2.5. Importancia económica.....	17
3.2.6. Diagnósticos diferenciales a la enfermedad de la lengua azul	18
3.2.7. Pruebas de diagnóstico	19
3.2.8. Prevención y control.....	20
3.2.8.1. Vacunas.....	21
3.2.9. Bases conceptuales	21
3.2.9.1. Antígeno.....	21
3.2.9.2. Anticuerpo.....	22
3.2.9.3. Reacción antígeno – anticuerpo	22
3.2.9.4. Seroprevalencia.....	22
IV. MATERIALES Y METODOS	23
4.1. Tipo de investigación.....	23
4.2. Ámbito de investigación	23
4.2.1. Ubicación espacial.....	23
4.2.2. Ubicación política.....	23
4.2.3. Ubicación geográfica.....	24

4.2.3.1. Límites geográficos.....	24
4.3. Materiales de estudio.	24
4.3.1. Población	24
4.3.1.1. Tamaño de muestra	24
4.3.2. Materiales, equipos e instrumentos	26
4.3.2.1. Materiales para la toma de sangre.....	26
4.3.2.2. Equipo y materiales para la obtención de suero y almacenamiento de sangre entera.....	26
4.3.2.3. Materiales, equipos e instrumentos para análisis serológico y molecular	27
4.3.2.4. Materiales de escritorio.....	28
4.4. Metodología.....	28
4.4.1. Colección de muestras de Sangre	28
4.4.2. Obtención y almacenamiento del suero sanguíneo.....	29
4.4.3. Almacenamiento de muestras de sangre entera	30
4.4.4. Análisis serológico mediante la prueba ELISA competitiva.....	30
4.4.4.1. Preparación de reactivo y muestras de suero	30
4.4.4.2. Preparación de la solución de lavado.....	30
4.4.4.3. Procedimiento de la prueba de ELISA competitiva.....	31
4.4.4.4. Validación de la prueba	34
4.4.4.5. Cálculo e interpretación de resultados	34
4.4.4.6. Determinación de la seroprevalencia de anticuerpos contra el virus lengua azul	34
4.4.5. Análisis molecular	35
4.4.5.1. Extracción de ácidos nucleicos	35
4.4.5.2. Procedimiento de la amplificación.....	42

4.4.5.3. Fase de amplificación en el termociclador.....	44
4.4.5.4. Validación del ensayo.	45
4.4.5.5. Interpretación de acuerdo al Ciclo umbral (Ct).	45
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	46
5.1. Seroprevalencia de anticuerpos contra el virus lengua azul en los vacunos del distrito de Challabamba.	46
5.2. Genoma del virus lengua azul en los vacunos del distrito de Challabamba.	49
VI. CONCLUSIONES.....	53
VII. RECOMENDACIONES	54
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	55
ANEXOS.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Programación en el termociclador.	44
Tabla 2. Programación estándar.	44
Tabla 3. Validación y resultados esperados.	45
Tabla 4. Interpretación de las muestras.	45
Tabla 5. I placa, valores de la DO de los controles y muestras de suero.	46
Tabla 6. II placa, valores de la DO de los controles y muestras de suero.	46
Tabla 7. Resultados de S/N% de los controles y muestras de suero, I placa.	47
Tabla 8. Resultados de S/N% de los controles y muestras de suero, II placa.	47
Tabla 9. Seroprevalencia de anticuerpos contra el VLA en vacunos por categorías.	48
Tabla 10. Resultados de amplificación en el Software StepOneplus de material genético para VLA y NTPcen.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático que representa la estructura de la partícula viral.	10
Figura 2. Ciclo de replicación del virus lengua azul.....	13
Figura 3. Transmisión del virus lengua azul.....	15
Figura 4. Toma de muestras de sangre de los vacunos del distrito de Challabamba, previa venopunción caudal.	29
Figura 5. Centrifugación de muestras de sangre.....	29
Figura 6. Homogenización de muestras de suero.	30
Figura 7. Distribución de diluyente 2.	31
Figura 8. Distribución del control positivo.....	31
Figura 9. Preparado de la solución conjugada 1X.	32
Figura 10. Distribución del conjugado 1X.....	32
Figura 11. Distribución de solución de lavado.	33
Figura 12. Lectura de la densidad óptica.	33
Figura 13. Rotulado de los tubos para el preparado de la solución de lisis.....	36
Figura 14. Transferencia de muestras a los viales.	36
Figura 15. Distribución de buffer RL a todos los viales.....	37
Figura 16. Adición de etanol absoluto 96-100%.	37
Figura 17. Centrifugación de las columnas.	38
Figura 18. Ensamblaje de las columnas al tubo de recogida.	38
Figura 19. Adición del etanol absoluto.....	39
Figura 20. Inserción de la columna a un tubo de elución.	40
Figura 21. Calentado de elución A.	40
Figura 22. Distribución de elución A.....	41
Figura 23. Muestra purificada.....	41

Figura 24. Descongelación del master mix.....	42
Figura 25. Adición de muestra.	42
Figura 26. Desnaturalización en el termociclador.	43
Figura 27. Distribución de master mix a los tubos PCR.....	43
Figura 28. Sellado de los tubos PCR.	44
Figura 29. Resultado de las curvas de amplificación en el Software StepOneplus de material genético para VLA y NTPcen.....	51

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Calculo para determinar la seroprevalencia de anticuerpos contra el VLA en vacunos del distrito de Challabamba.	67
Anexo 2. Panel fotográfico del trabajo de investigación.	68
Anexo 3. Resultados de diagnóstico de anticuerpos contra el VLA en vacunos del distrito de Challabamba.	82
Anexo 4. Ficha clínica para el muestreo.....	87
Anexo 5. Plantilla de ubicación de las muestras en la placa ELISA competitiva.	88
Anexo 6. Plantilla de para ensayo PCR.	89

GLOSARIO

ARN	: Ácido ribonucleico
DO	: Densidad optica
EDTA	: Ácido etilendiamino tetraacético
ELA	: Enfermedad de la lengua azul
ELISA	: Ensayo inmunoadsorción ligado a enzima
ELISAc	: Ensayo inmunoadsorción ligado a enzima de competición
LA	: Lengua azul
NAC	: Control negativo de amplificación
NEC	: Control negativo de extracción
NTPCen	: Control positivo no diana endógeno
OMSA	: Organización Mundial de Salud Animal
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
Ph	: Potencial de Hidrogeno
RT-PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
RT-qPCR	: Reacción en cadena de la polimerasa de cuantificación con transcripción reversa
SENASA	: Servicio Nacional de Sanidad Agraria
TPC-BTV	: Control positivo diana
VLA	: Virus lengua azul

RESUMEN

El virus lengua azul (VLA) se transmite principalmente a través de vectores del género *Culicoides ssp.* Los vacunos infectados no presentan signos clínicos, por lo que son considerados asintomáticos y, en consecuencia, se les conoce como reservorios del virus. El objetivo principal de esta investigación fue determinar seroprevalencia molecular de cepas emergentes del virus lengua azul en vacunos del distrito de Challabamba – Paucartambo – Cusco. La investigación se llevó a cabo de febrero a junio de 2024. Se realizó en dos etapas: la primera consistió en el análisis serológico de las 119 muestras de suero de vacunos procedentes del distrito de Challabamba mediante el método de ELISA de competición, con el fin de seleccionar animales seropositivos a VLA; y en la segunda etapa, se realizó la recolección de 13 muestras de sangre del hato seroreactor para el análisis molecular mediante RT-qPCR en tiempo real. La seroprevalencia de anticuerpos contra (VLA) en vacunos fue de $0.84 \pm 0.015\%$ (1/119). No se detectó el genoma viral en vacunos del hato seropositivo a anticuerpos de VLA. En conclusión, se encontró presencia de anticuerpos contra el VLA, pero no del genoma viral del VLA en vacunos del distrito de Challabamba.

Palabras claves: ELISA de competición, RT-qPCR en tiempo real, vacunos, virus lengua azul.

ABSTRACT

Bluetongue virus (BTV) is primarily transmitted by vectors belonging to the *Culicoides* *ssp* genus. Infected cattle do not manifest clinical signs, and thus are considered to be asymptomatic. Consequently, they are regarded as reservoirs of the virus. The principal objective of this research was to ascertain the molecular seroprevalence of emerging strains of bluetongue virus in cattle in the district of Challabamba-Paucartambo-Cusco. The research was conducted from February to June 2024. The study was conducted in two phases. Initially, the competitive ELISA method was employed to analyze 119 serum samples from cattle in the Challabamba district, with the objective of identifying animals that had been exposed to BTV. Subsequently, 13 blood samples from the seroreactor herd were subjected to molecular analysis through RT-qPCR in real time. The seroprevalence of BTV antibodies in cattle was $0.84 \pm 0.015\%$ (1/119). No viral genome was detected in cattle from the BTV antibody seropositive herd. It can therefore be concluded that the presence of BTV antibodies but not the viral genome was found in cattle from the Challabamba district.

Keywords: Bluetongue virus, cattle, competitive ELISA, real-time RT-qPCR.

INTRODUCCIÓN

Lengua azul (LA) es una enfermedad vírica no contagiosa que afecta a los rumiantes domésticos y silvestres. Se transmite por mosquito del género *Culicoides* y es endémica en zonas tropicales y subtropicales donde el virus persiste, expandiéndose a mayores altitudes y latitudes fuera de su hábitat geográfico conocido (40°N y 35°S). Esto ocasiona severas pérdidas económicas en la salud animal, la reproducción y se convierte en una restricción para el comercio internacional de ovinos y otros rumiantes domésticos en pie y de germoplasma (Purse *et al.*, 2005). Debido a su patogenicidad y gran capacidad de transmisión y difusión, forma parte de las enfermedades de la lista de la Organización Mundial de la Salud Animal (OMSA). Desde un punto de vista socioeconómico, es muy costosa, principalmente por los sacrificios obligatorios y otros gastos relacionados con la prevención, erradicación e indemnización (Rosell, 2004).

En los últimos años, el cambio climático y el calentamiento global han generado la expansión de mosquitos vectores (Hunter, 2003). Entre la amplia gama de mosquitos vectores, se cree que los mosquitos *Culicoides*, son particularmente sensibles a cambios climáticos (Purse *et al.*, 2008), son considerados como poiquilotermos y utilizan una gran variedad de hábitats en áreas semiacuáticas para su desarrollo; las tasas demográficas e interacciones con los hospederos son sensibles a variaciones de temperatura y humedad (Purse *et al.*, 2015). Esto sugiere que la altitud y bajas temperaturas constituyen una barrera para la biología del vector transmisor del virus (Jurado *et al.*, 2020).

En la Amazonía peruana se han reportado especies *Culicoides ssp.*; su clima tropical es un ambiente óptimo para el vector y facilita la infección del virus lengua azul (VLA) en los huéspedes (Felippe *et al.*, 2008; López *et al.*, 2022). La geografía del territorio peruano está cubierta en más de un 57% por bosques y valles interandinos (MINAM, 2016). En nuestro país, se determinó serológicamente la presencia del VLA a nivel nacional en ganado vacuno

(Incil, 2023). Por tal motivo, el presente trabajo de investigación evalúa la presencia del VLA en vacunos del distrito de Challabamba, por la prueba de ELISA de competición, detección de anticuerpos serológicos y RT-PCR para detección del genoma viral.

I. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN

Challabamba es un distrito eminentemente ganadero, principalmente en la producción de vacunos. Actualmente, no realizan controles sanitarios sobre la presencia de enfermedades virales en el mencionado lugar, razón por la cual los ganaderos de la zona manifiestan que sus animales presentan problemas de baja producción de leche, abortos, agrietamiento del pezón, conjuntivitis y presencia de neumonías que no responden al tratamiento, ocasionando grandes pérdidas económicas. Además, existen investigaciones que reportan la presencia de VLA en la sierra peruana y en la región Cusco (Incil, 2023) y también se ha registrado la presencia del virus en la región selva (Ramos, 2023). Por lo tanto, podría existir la enfermedad en el distrito mencionado y la migración del vector principal, debido a cambios climáticos y al calentamiento global que se está dando a nivel mundial (Navarro *et al.*, 2019). Los problemas mencionados repercuten negativamente en la producción y rentabilidad del ganadero y las investigaciones reportadas nos ayudan a evidenciar que ya existía la enfermedad en el lugar mencionado, por lo que nos planteamos como objetivo general determinar la seroprevalencia molecular de cepas emergentes del virus lengua azul (VLA) en vacunos del distrito de Challabamba – Paucartambo – Cusco.

II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

2.1. OBJETIVOS

2.1.1. Objetivo general

Determinar la seroprevalencia molecular de cepas emergentes del virus lengua azul en vacunos del distrito de Challabamba – Paucartambo – Cusco.

2.1.2. Objetivos específico

1. Determinar la seroprevalencia de anticuerpos contra el virus lengua azul en los vacunos del distrito de Challabamba.
2. Detectar el genoma del virus lengua azul en los vacunos del distrito de Challabamba.

2.2. JUSTIFICACIÓN

En la provincia de Paucartambo, especialmente en el distrito de Challabamba, la actividad pecuaria es significativa, siendo la producción de leche y sus derivados un pilar fundamental para el desarrollo productivo y económico del distrito. En este contexto, la presencia de enfermedades virales, especialmente virus lengua azul (VLA), podría ocasionar grandes pérdidas en la producción y en la economía pecuaria.

En el distrito mencionado, no existen investigaciones relacionadas con la enfermedad de la lengua azul, ni hay reportes del vector principal. Por lo tanto, los productores desconocen la existencia de la enfermedad, su propagación, las medidas preventivas y las formas de control.

Este trabajo de investigación, a través de pruebas serológicas y moleculares, permitirá identificar a los vacunos que presentan la enfermedad de la lengua azul y reportar los resultados sobre dicha enfermedad a las autoridades correspondientes y a los productores del distrito. Asimismo, contribuirá al conocimiento sobre la enfermedad y sus consecuencias en la producción de vacunos, de modo que los productores puedan adoptar todas las medidas preventivas necesarias para evitar la transmisión de la enfermedad.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Antecedentes

Incil (2023), estableció la seroprevalencia de VLA en bovinos del Perú y determinó los factores de riesgo. Para ello, utilizó 3 425 muestras de suero de bovinos procedentes de todo el país y la base de datos proporcionadas por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). Mediante la prueba de ELISA competitiva, determinó la seroprevalencia a nivel nacional de 19.1% (653/3 425), en el sur del Perú del 0.49% (9/1 851), y en las regiones como Huancavelica, Cusco y Puno una seroprevalencia de 4.41% (3/68), 1.75% (4/228) y 0.29% (2/685) respectivamente. Asimismo, demostró que los principales factores de riesgo son la altitud, temperatura, humedad y precipitación.

Ramos (2023), determinó la distribución espacial de VLA y seroprevalencia en bovinos de los departamentos de Madre de Dios, Ucayali, Loreto, San Martín y Amazonas de la selva del Perú. Confirmando la presencia del virus en bovinos en la región selva en un 85.12% mediante el método de ELISA competitiva. Asimismo, la prueba de Chi cuadrado reveló una asociación significativa entre la frecuencia de anticuerpos contra VLA, la edad de los animales ($p = 0.025$), y la variable altitud ($p < 0.001$). Demostró que el principal factor es la distribución espacial, donde la mayor población de bovinos positivos a anticuerpos contra VLA se ubicaron en altitudes menores a 1 000 m s.n.m.

Acevedo *et al.* (2023), aislaron e identificaron el VLA a partir de la sangre de un ternero naturalmente infectado. El virus lo aislaron en huevos embrionados de pollo y en cultivo celular a partir de la sangre del ternero a los 21 días de edad, que resultó positiva a la presencia de virus por un ensayo de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa anidada (nRT-PCR). Evidenciaron que los embriones inoculados mostraron mortalidad embrionaria, disminución de la talla, coloración rojiza y edema como indicativo de multiplicación viral. En el cultivo celular, observaron focos de células redondeadas y

retráctiles. La identificación del virus lo realizaron con Kit comercial de RT-PCR en tiempo real, para la detección específica del VLA.

López *et al.* (2022), determinaron la prevalencia del VLA en ovinos mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR) en tiempo real. Evaluaron 366 ovinos de las 10 provincias de la región San Martín, Perú. Tomaron muestras de sangre de la vena yugular y llevaron a cabo el proceso de extracción y purificación de ARN con el kit QIAmp®. Posteriormente, realizaron la transcripción reversa donde obtuvieron el ADNc y finalmente realizaron la RT-PCR en tiempo real, demostraron 2 ovinos positivos con valor de ciclo umbral (Ct) de 35.21 y 35.57, siendo la prevalencia de 0.54% (2/366) de VLA en sistema de crianza extensiva.

Navarro *et al.* (2019), identificaron *Culicoides ssp.* como vectores del VLA en granjas de ovinos de la ciudad de Pucallpa, provincia Coronel Portillo, Ucayali. Realizaron el estudio en etapas: la primera consistió en el análisis serológico de 46 muestras de suero mediante la prueba de ELISA competitiva, donde determinaron que tres granjas resultaron seropositivas a *Orbivirus* en un 46.7%; 81.3% y 20%, demostraron que el 96% fue positiva a VLA. En la segunda etapa capturaron los mosquitos *Culicoides*, siendo las especies más identificadas *Culicoides insignis* en 94.8% (7 519/7 930); en menor abundancia el *Culicoides foxi*, *Culicoide ocumarensis*, *Culicoide pseudodiabolicus* y reportaron a *Culicoides lutzi* como nuevo registro. Adicionalmente, tomaron 15 muestras de sangre de ovinos y determinaron presencia del genoma viral en una muestra (1/15) por método de RT-PCR en tiempo real.

3.2. Bases teóricas

3.2.1. Población de vacunos en la región Cusco

Según el IV censo nacional agropecuario, se registraron un total de 5 156 044 cabezas de ganado vacuno (INEI, 2012). La distribución de la población de ganado vacuno en la región sierra es de 3 705 822 cabezas, en la región de Cusco 396 392 cabezas, en la provincia de

Paucartambo 23 755 y en el distrito de Challabamba una población de 6 530 de ganado vacuno (INEI, 2012).

La crianza de ganado vacuno en la sierra está orientada a la producción de carne, leche y trabajo (yunta). Esta producción está orientada al mercado local, al autoconsumo y al abastecimiento a centros de engorde estas actividades son fuentes de ahorro para los ganaderos. La mayoría de vacunos son de tipo criollo con mayor o menor grado de mejora con otras razas, los principales departamentos que abastecen a centros de engorde son Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Puno, Arequipa, Junín y la selva (MIDAGRE, 2015).

3.2.2. Agente etiológico de la enfermedad de la lengua azul

Según la organización mundial de la salud animal (OIE), la lengua azul es una enfermedad vírica de rumiantes domésticos y silvestres, es particularmente dañina en las ovejas pueden morir en un 50%, en los vacunos y caprinos rara vez causa enfermedad se les considera asintomáticos, aunque puede afectar la capacidad reproductiva. Los brotes de lengua azul pueden causar grandes pérdidas económicas debido al impacto en la salud del vacuno y pérdida de mercados pues existen restricciones estrictas al movimiento de animales para limitar la propagación de la enfermedad (Gorchs y Lager, 2001).

3.2.2.1. Historia del virus lengua azul

El VLA fue descrita por primera vez a principios de 1900 como fiebre o fiebre cantaral palúdica en Sudáfrica. El nombre de la bluetongue (BT) es la forma anglicanizada del afrikáans bloutong, acuñada por los granjeros Boers, las escrituras originales del BT se publicaron a finales del siglo XIX e inicio del siglo XX (Spreull, 1905). El primer registro bien documentado del VLA fue reportada fuera de África, en ovinos en Chipre en 1943 (Gambles, 1949). Posteriormente fue reconocida en países como Israel, Portugal, España, India, Pakistán, Estados Unidos, América del Sur y otros países (Du Toit, 1944; Vega *et al.*, 2004).

En 1944 se reveló que el VLA es transmitida por la picadura de insectos del género *Culicoides ssp* (Sánchez *et al.*, 2008). El virus se propaga al picar a un animal infectado con VLA y vuelve a picar a un animal sano, esta es la razón por la que la enfermedad es más prevalente en zonas geográficas donde las condiciones climáticas son favorables para su desarrollo (Gorchs y Lager, 2001). En 1984, se demostró serológicamente la presencia del VLA en los ovinos del Perú (Rosadio *et al.*, 1984), y en 2023 se confirmó a nivel nacional la presencia del virus en vacunos (Incil, 2023) y en la región selva (Ramos, 2023).

El VLA se ha expandido en países ubicados fuera del rango de 40°N y 35°S, debido a la migración de *Culicoides spp.* hacia latitudes cada vez más altas donde los rumiantes son susceptibles. El cambio climático, impulsado por el calentamiento global, podría facilitar la propagación del virus más allá de los límites (Purse *et al.*, 2005; Acevedo *et al.*, 2020).

3.2.3.2. Clasificación taxonómica

VLA se clasifica taxonómicamente dentro del género *Orbivirus* de la familia *Reoviridae*; el genoma del VLA está compuesta por 10 segmentos lineales de ARN de doble cadena (Maan *et al.*, 2015).

Dominio: *Riboviria*

Reino: *Orthornavirae*

Filo: *Duplornaviricota*

Clase: *Resentoviricetes*

Orden: *Reovirales*

Familia: *Reoviridae*

Subfamilia: *Sedoreoviridae*

Género: *Orbivirus*

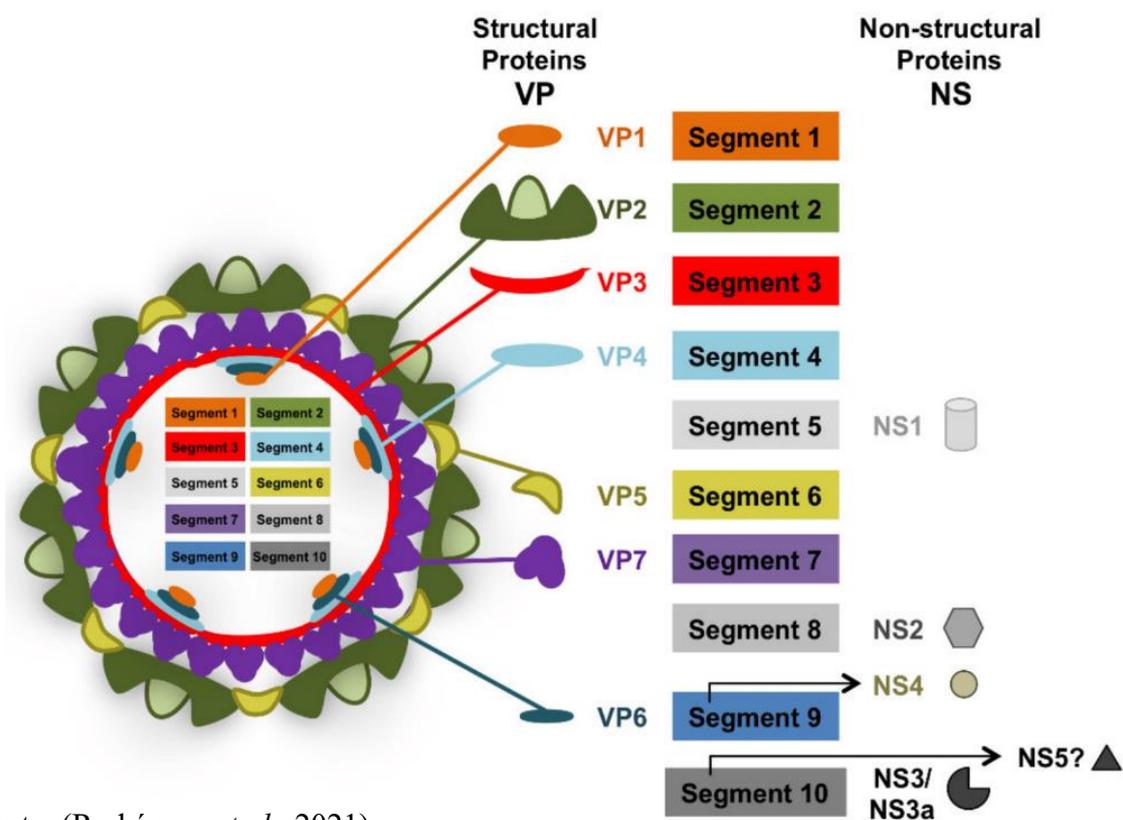
Especie: **Virus Lengua azul**

3.2.3.3. Morfología del virus lengua azul

El VLA es un virus que no posee envoltura, compuesto por 10 segmentos de ARN lineal de doble cadena, con un tamaño aproximado de 80-90 nm de diámetro (Mertens *et al.*, 2015). Está Formado por 7 proteínas estructurales (VP1 a VP7) y 4 proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3/NS3a y NS4) que forman parte de la estructura del virus (Belhouchet *et al.*, 2011). Nuevas investigaciones predicen que los *Orbivirus* codifican una quinta proteína no estructural adicional, el NS5 (Mohd *et al.*, 2023).

El VLA tiene tres capas proteicas, la cápside externa está compuesta por dos capas consecutivas de proteínas: siendo la más externa VP2 y la ligeramente menos expuesta VP5 ambas proteínas se unen a una capa subyacente compuesta por la VP7, la proteína VP3 recubre el núcleo y las tres proteínas estructurales restantes (VP1, VP4 y VP6) forman el interior enzimático del virus, junto con el ARN genómico (Wu y Roy, 2022; Mertens *et al.*, 2004).

Figura 1. Diagrama esquemático que representa la estructura de la partícula viral.



Fuente: (Rodríguez *et al.*, 2021).

- **Proteínas estructurales**

La proteína VP2 es la más externa de la cápside viral; 120 moléculas forman 60 trímeros, y cada monómero consta de tres dominios distintos (centro, cuerpo y punta) de forma triskelion (tres espirales entrelazadas). es responsable a la unión celular del receptor (Wu y Roy, 2022). Los extensos datos de secuencia y el perfil inmunológico han demostrado que la VP2 es altamente variable determinando el serotipo (Mertens *et al.*, 2015).

La proteína VP5, al igual que el VP2, se encuentra contrastada en la parte externa del virión, el pH ácido provoca un cambio brusco de conformación para posibilitar la penetración en la membrana y la liberación del núcleo viral en el citoplasma, iniciando la transcripción de ARN genómicos (Wu *et al.*, 2019).

Los dos proteínas fundamentales VP3 y VP7; desempeñan un papel importante en la integridad estructural del núcleo del virus, la proteína más antigénica es la proteína VP7 (Anthony *et al.*, 2007). Se ocupan de la protección del núcleo y los segmentos de ARN genómico de doble cadena (Schwartz *et al.*, 2008).

Las tres proteínas centrales menores de transcripción como VP1, VP4 y VP6. La proteína VP1 puede extender la síntesis de ARN a través del cebador y tiene una actividad óptima entre 27 – 37 °C, lo que permite una replicación eficiente en células de insectos y mamíferos (Roy, 2008). La proteína VP4 presenta una estructura cristalina, presenta una arquitectura modular alargada que estabiliza el ARNm y brinda una eficiente traducción (Sutton *et al.*, 2007). La proteína VP6 desempeña una función de unión a ATP y muestra funciones de ATPasa y helicasa (Roy, 2008; Schwartz *et al.*, 2008).

- **Proteínas no estructurales**

Las dos proteínas no estructurales del VLA, como NS1 y NS2, son las más grandes y más expresadas en los infectados celulares. Mientras que las dos proteínas NS3 y NS3a son

apenas detectadas en células de mamíferos, pero se sintetizan en grandes cantidades en las células de insectos está relacionada principalmente con el VLA (Schwartz *et al.*, 2008).

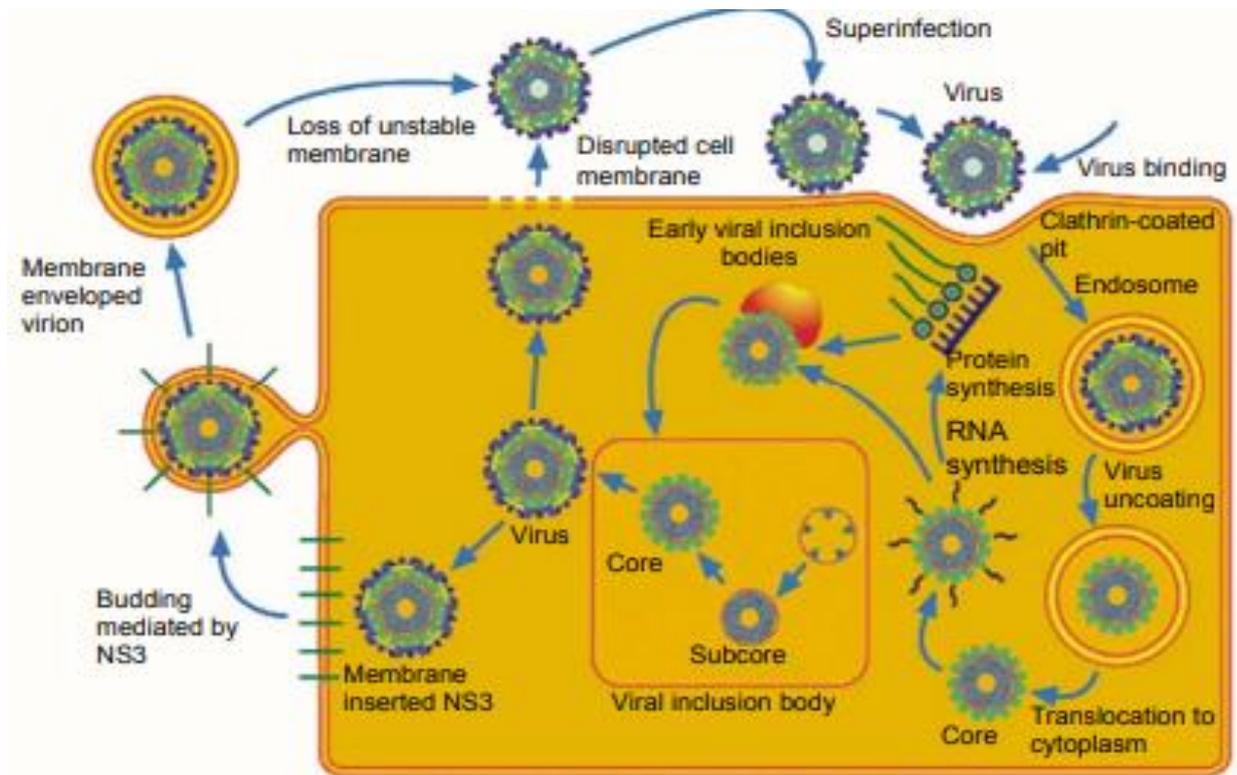
La NS1 está compuesta por una gran cantidad de túbulos específicos del virus, con un diámetro de 52.3 nm y un longitud de 1 000 nm (Agüero *et al.*, 2002). La parte principal del virus es el NS2. La expresión en las células es suficiente para crear de cuerpos de inclusión y atrae VP3; es esencial para la replicación del virus y ensamblaje del virus (Lymperopoulos *et al.*, 2003). la proteína principal que regula el tráfico, la salida y la maduración del virus es el NS3 (Labadie *et al.*, 2020; Balasuriya *et al.*, 2008).

La expresión genética de NS4 está relacionada con su localización nuclear y factor esencial para determinar la virulencia viral. Además, NS4 no tiene efectos sobre la traducción celular ni el empalme del ARNm (Ratinier *et al.*, 2016). El cierre celular es promovido por el supuesto NS5 que contribuye en el deterioro de la respuesta celular del huésped de VLA (Rodríguez *et al.*, 2021).

3.2.3.4. Inicio de la replicación viral

El VLA inicia la infección de la célula huésped a través de una partícula viral ingresa al citosol de la célula huésped (Patel *et al.*, 2016). La infección por la partícula del VLA se establece cuando la capa interna se transloca después de la absorción del virus, un proceso llevado a cabo por las dos proteínas de la cápside externa, VP2 y VP5 endosomal; la proteína VP2 se une al ácido siálico de la superficie y facilita la endocitosis mediada clatrina del virión, mientras que la proteína VP5 penetra en la membrana de la célula huésped y entrega la cápside interna en el citosol huésped (Forzan *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2016). El proceso consta de dos etapas distintas: el VP2 detecta el pH (6.5-6.0) en la endosoma; el VP5 detecta un pH más bajo (5.5) y adquiere actividad de fusión de membrana, lo que permite que el núcleo escape a través de la membrana endosomal (Forzan *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2016).

Figura 2. Ciclo de replicación del virus lengua azul.



Fuente: (Mertens *et al.*, 2004).

3.2.3.5. Serotipos del virus lengua azul

A nivel mundial, hasta la fecha, se han notificado 28 serotipos distintos de VLA mediante ensayos serológicos (Bumbarov *et al.*, 2020) y 23 serotipos en India (Saminathan *et al.*, 2020). Los diferentes serotipos del virus mostraron un 22.2% de similitud en aminoácidos y un 26.8% en nucleótidos, lo que permitió una identificación y diferenciación clara de los serotipos (Maan *et al.*, 2010).

La mayoría de los segmentos del genoma del VLA pueden segregarse en el subcontinente Indio, China, Japón, Taiwán, Indonesia, Australia, Europa, Turquía y Cuenca del Mediterráneo, en el continente africano, Estados Unidos, Brasil y Guatemala y la región del Caribe, en función de la geografía (Saminathan *et al.*, 2020). El diagnóstico de VLA es crucial para el control y erradicación de la enfermedad, garantizando el comercio libre de animales y productos derivados (van Rijn, 2019).

3.2.2. Vector mosquito *Culicoides ssp*

El vector competente de VLA es el mosquito hembra de género *Culicoides ssp*, en castellano se conocen con el nombre de jejenes, son infecciosos y se alimentan de sangre. Los vectores son de pequeño tamaño, entre 1 y 3 mm, con patas muy cortas y alas con manchas claras y oscuras que permite identificación a nivel de especie (Lucientes *et al.*, 2008). De las 1 400 especies de *Culicoides ssp*, solo se conoce que unas 30 transmiten la enfermedad de la lengua azul (Saminathan *et al.*, 2020). Los vectores principales son los *C. imicola*, *C. obsoletus*, *C. dewulfi* y *C. pulicaris* (Lucientes *et al.*, 2008).

Las condiciones ambientales favorables, como la temperatura, humedad, precipitación, velocidad del viento, zonas pantanosas, el final de verano y el final de otoño proporcionan supervivencia y reproducción de los vectores *Culicoides ssp*, que coincide directamente con la transmisión de VLA y el brote del serotipo 8 (Saminathan *et al.*, 2020). El cambio climático y calentamiento global ha permitido la colonización de nuevos hábitats del vector y la propagación del virus (Subhadra *et al.*, 2023).

3.2.3. Patogenia del virus lengua azul

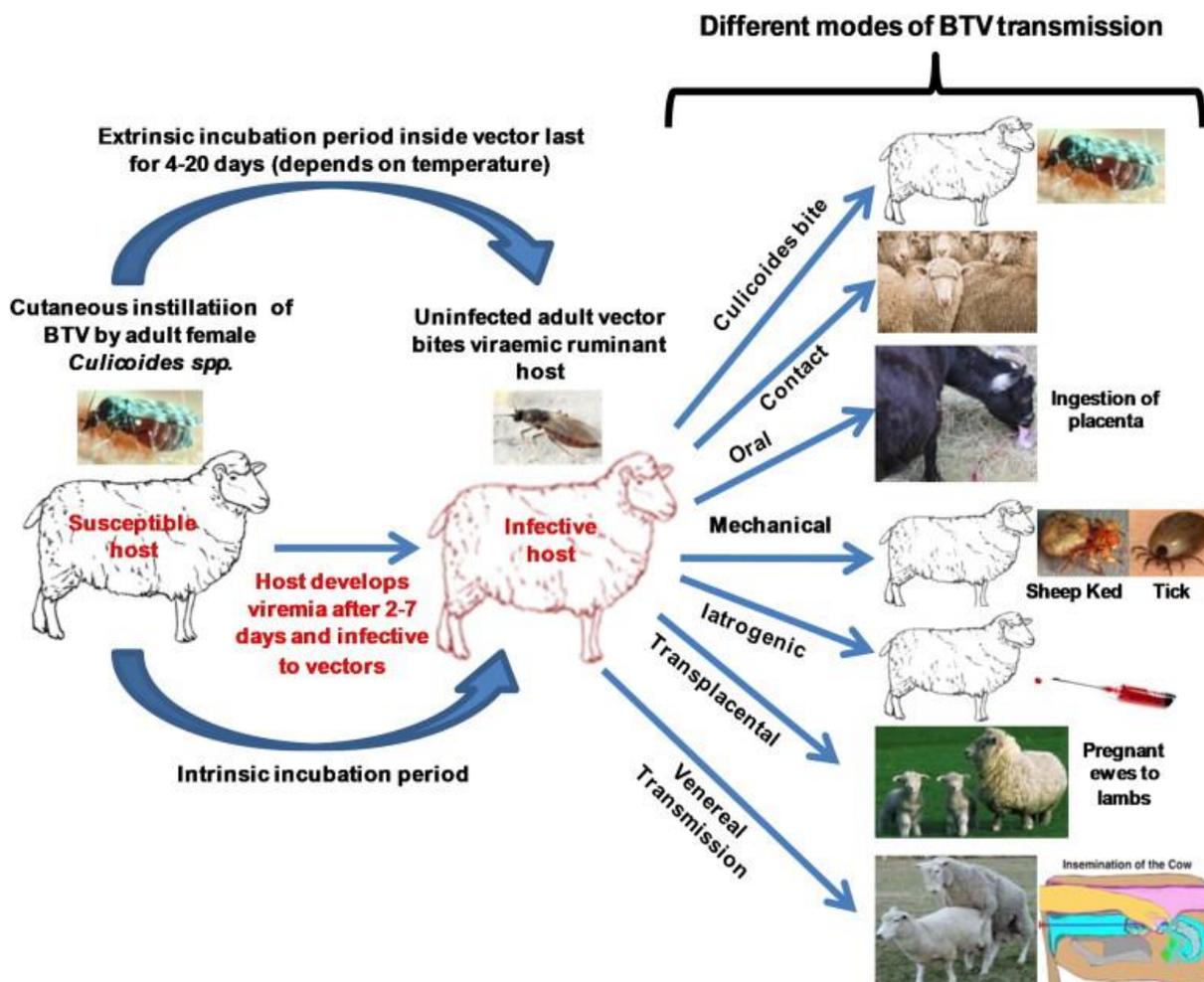
3.2.3.1. Hospederos

La distribución del VLA afecta una amplia variedad de rumiantes domésticos y silvestres, incluyendo ovinos, cabras, vacunos, camélidos, búfalos, ciervos, antílopes y alces. Las especies más sensibles son los ovinos; el venado de cola blanca, la alpaca y la llama pueden presentar una fase clínica aguda e incluso mortal, mientras en el ganado vacuno y caprino se les considera como asintomáticos o subclínicos (Van den Bergh *et al.*, 2018). La viremia persiste en los ovinos durante 30 días, y en el vacuno de 90-120 días se le considera reservorio del virus (Subhadra *et al.*, 2023).

3.2.3.2 Transmisión del virus

El VLA es transmitido por el mosquito del género *Culicoides spp.*; actualmente, existe nuevas investigaciones que demuestran otras vías de infección sin la presencia del vector. En Europa, se ha demostrado que el brote del serotipo 8 atraviesa la barrera transplacentaria, infectando del feto (Clercq *et al.*, 2008).

También se ha evidenciado la transmisión venérea a través del semen de rumiantes infectados (Rojas *et al.*, 2021), y se notificó la transmisión oral en terneros alimentados con calostro y la ingesta de placenta (Menzies *et al.*, 2008). La transmisión mecánica como vector, la garrapata y la vía iatrogénica los equipos quirúrgicos contaminados con sangre, también son relevantes (Saminathan *et al.*, 2020).



3.2.3.3. Replicación del vector en los tejidos

Los *Culicoides ssp* son vectores biológicos del VLA; los mosquitos se infectan al picar a un huésped infectado a través de la ingesta de la sangre. El virus se replica inicialmente en las células del intestino medio y escapa a la cavidad corporal de los vectores, llegando a las glándulas salivales cada 4-6 días, el vector está listo para transmitir el virus a otro huésped a través de la mordedura (Wilson y Mellor, 2009). Sin embargo, las altas temperaturas son perjudiciales para la supervivencia del vector (Wilson *et al.*, 2008).

El VLA es inoculado en la piel del rumiante a través de mordedura del vector, en el rumiante a los 2-3 días, se reproduce la replicación inicial en los ganglios linfáticos. Luego, el virus llega a la circulación sanguínea, comenzando la viremia e infectando las células dendríticas, linfocitos, monocitos y macrófagos que diseminan el virus a sitios secundarios como el bazo y los pulmones, donde se lleva a cabo la replicación secundaria, con una duración de 4 a 20 días, infectando las células endoteliales (Schulz *et al.*, 2016; Wilson y Mellor, 2009).

3.2.3.4. Inmunidad

La inmunidad celular confiere protección heterotópica; diversos estudios han demostrado que, por medio de la vacunación, el nivel de anticuerpos neutralizantes no siempre se correlaciona con el grado de protección de los animales. Además, algunas vacunas inactivadas pueden proporcionar protección incluso en ausencia de niveles detectables de anticuerpos neutralizantes; se evidenció el papel de la respuesta inmune celular en la protección de los animales (Sanches *et al.*, 2009).

El estudio de la inmunidad antiviral y de las respuestas de las células T., el VLA es un *Orbovirus* de la familia *Reoviridae* que afecta a los rumiantes, es el que afecta la inmunidad adaptativa en los huéspedes naturales (Rodríguez *et al.*, 2021).

3.2.3.5. Signos clínicos y lesiones en el ganado vacuno

En el ganado vacuno infectado por VLA, por lo general no desarrolla signos clínicos evidentes; principalmente actúa como reservorio, siendo rara la enfermedad visible en vacuno. La infección transplacentaria en etapas tempranas de gestación puede causar la mortalidad del feto o que nazcan con defectos y los fetos infectados en ciclo final de gestación generalmente sobreviven (Rey *et al.*, 2008).

El brote del VLA serotipo 8, previamente desconocido en la Unión Europea (UE), causa la enfermedad clínica en algunos animales dentro de rebaños de ganado. Manifiestan fiebre, conjuntivitis, úlceras y congestión en mucosa oral, secreciones oculares y nasales, aspecto "agrietado" del hocico, coronitis, edema y lesiones necróticas en labios y lengua, necrosis de la glándula mamaria y baja producción de leche (Maclachlan *et al.*, 2015; Darpel *et al.*, 2007).

3.2.4. Distribución geográfica

La enfermedad de la lengua azul se ha reportada prácticamente en todos los continentes, con excepción de la Antártida. Históricamente, la distribución ha sido, en climas templados y tropicales, la distribución del vector específicamente entre las latitudes 40°N y 35°S (Acevedo *et al.*, 2020).

El clima es uno de los principales factores que impulsan la distribución del virus lengua azul; en Europa, se considera que la distribución a consecuencia del calentamiento global (Samy y Peterson, 2016).

3.2.5. Importancia económica

La enfermedad de lengua azul causa y provoca graves pérdidas económicas directas, incluyendo la presencia de síntomas en los animales, alta morbilidad, mortalidad, abortos, anomalías fetales, reducción en la producción de leche y la tasa de fertilidad, ausencia de gestaciones, pérdidas de producción de carne en rumiantes; las pérdidas económicas indirectas se deben a las restricciones de desplazamiento de los rumiantes, compra de vacunación masiva,

diagnóstico, vigilancia, control de vectores y tratamiento de animales (Grewar, 2016; Gethmann *et al.*, 2020).

La expansión del VLA en Europa ha obligado a reevaluar la importancia de las especies *Culicoides ssp* en la transmisión, así como las vías de transmisión y la transmisión transplacentaria, para facilitar la persistencia del virus. El actual brote europeo de BTV-8 ha causado mayores daños económicos que cualquier brote de serotipos anteriores (Gethmann *et al.*, 2020).

3.2.6. Diagnósticos diferenciales a la enfermedad de la lengua azul

El diagnóstico diferencial se realiza con otros procesos patológicos similares a la enfermedad de la lengua azul, así como:

- La fiebre aftosa es un virus que rara vez causa lesiones oculares; no hay presencia de secreción nasal. Los brotes del virus no son estacionarios, es altamente contagioso y causa una mayor morbilidad; los virus son esporádicos puede ser estacional debido a los vectores (Saminathan *et al.*, 2020).
- Estomatitis vesicular es otra enfermedad causada por el género *Vesiculovirus* de la familia *Rhabdoviridae* que podría confundirse con el VLA. Las lesiones características son ulceraciones, costras epiteliales de la boca, el hocico, las fosas nasales y en los pezones (Williamson *et al.*, 2008).
- Otras enfermedades como: enfermedades causadas por el virus en ganado bovino, la fiebre catarral maligna, la rinotraqueítis infecciosa bovina y diarrea viral bovina; estas tres enfermedades comparten algunas similitudes, presentan síntomas respiratorios, fiebre y afectan la reproducción (Saminathan *et al.*, 2020). La enfermedad parasitaria, la cenurosis *por Oestrus ovis* (estornudos, salivación excesiva, irritación en los ojos y ruidos respiratorios) en ovinos. El virus que causa la enfermedad hemorrágica epizootica es transmitido por el género *Culicoides*, causa síntomas y lesiones

hemorrágicas similares a VLA, principalmente en ciervos y ganado vacuno (Williamson *et al.*, 2008).

3.2.7. Pruebas de diagnóstico

El diagnóstico consiste en el aislamiento del virus y su identificación a partir de muestras de sangre, semen, tejido y de animales muertos o fetos abortados. Existen diversas pruebas y técnicas para el diagnóstico de VLA.

- **Inmunodifusión en gel de agar (AGID):** La prueba de AGID es un método cualitativo relativamente fácil de realizar gracias a su metodología simple; sin embargo, carece de sensibilidad y especificidad. Su desventaja radica en la dificultad de interpretar sus resultados; un resultado de suero positivo debe ser analizado nuevamente con una prueba específica de VLA, como la prueba de ELISA, debido a su alta especificidad. Por lo tanto, AGID se considera como una prueba alternativa a la prueba ELISA (Darpel *et al.*, 2007)
- **Inmunofluorescencia (IF):** Grupos de investigación han implementado anticuerpos monoclonales (MAbs) que se unen especialmente a diferentes *Orbivirus*, generalmente a la proteína VP7, lo que permite la identificación del virus; el suero sanguíneo identificados a VLA se utilizan como anticuerpos en procedimientos de IF para identificar VLA, con anticuerpos secundarios unidos a diferentes fluoróforos. (Reyes, 2021).
- **Microscopía electrónica:** Las partículas del serogrupo VLA son detectadas mediante microscopía electrónica de transmisión, pero se requieren técnicas de inmunomicroscopía para identificar VLA (Reyes, 2021).
- **ELISA competitivo (ELISAc):** Es una técnica implementada para detección de anticuerpos; se utilizan muestras de suero o plasma con el fin identificar la presencia del virus (Reyes, 2021). ELISAc es recomendada como la prueba oficial para el

monitoreo serológico de anticuerpos contra VLA, según lo establecido por la OIE, debido a su sensibilidad de 97.6% y especificidad de 98.0% (Chand, *et al.*, 2017).

- **Detección del genoma viral:** Es utilizada para detectar el genoma viral y los serotipos de VLA mediante el método de PCR, las pruebas de RT – qPCR tiempo real, han sido implementadas en diversos ensayos para la detección de VLA (Reyes, 2021).

RT – PCR, es una técnica que acopla la amplificación y la detección en uno solo, uniendo el producto de la PCR con una señal de intensidad de fluorescencia. Presenta características como su alta especificidad, gran rango de detección y rapidez. Los ensayos de la PCR en tiempo real son entre 10 000 y 100 000 veces más sensibles y detectan diferencias de una sola copia del ADN o ARN (Aguilera *et al.*, 2014). La prueba de PCR consiste en el aislamiento del ARN viral a partir de muestras de sangre completa y un método que incluye la desnaturalización inicial del ARN genómico de doble cadena y la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT – qPCR) en tiempo real, se detectaron los 28 serotipos de VLA (van Rijn *et al.*, 2012).

3.2.8. Prevención y control

El control y prevención de la infección por virus de lengua azul en rumiantes han adquirido mayor importancia debido a los efectos económicos de la enfermedad de VLA y a las restricciones de desplazamiento y al comercio de los animales (Gethmann *et al.*, 2020).

La estrategia crítica para el control de las enfermedades transmitidas por vectores es reducir la población de vectores o reducir el número de picaduras potencialmente infecciosas; también se puede usar la inmunización profiláctica a base de vacunas vivas o atenuadas y vacunas inactivadas de serotipo específico; finalmente, se debe realizar el monitoreo de animales mediante exámenes clínicos (Saminathan *et al.*, 2020).

3.2.8.1. Vacunas

Los autores recomiendan tratar lengua azul como si fueran 28 enfermedades distintas, ya que los síntomas, lesiones, morbilidad y mortalidad varían mucho de un serotipo a otro y necesitan incluso vacunas diferentes (Lucientes *et al.*, 2008). La vacunación se demostró ser una técnica eficaz de control y erradicación de los serotipos 2 y 4 del virus lengua azul en España (Sanches *et al.*, 2009).

- **Vacunas vivas atenuadas:** las vacunas de virus vivos modificados (MLV) del VLA tienen muchas ventajas, como que se requieren dosis bajas y rentables de virus atenuados para desencadenar respuestas inmunitarias protectoras y una dosis única es suficiente para estimular los anticuerpos neutralizantes (Savini *et al.*, 2004). Las desventajas del uso de vacunas MLV contra el VLA en áreas endémicas son la recurrencia de enfermedades clínicas en animales vacunados como la viremia, baja producción de leche y aborto en animales (Monaco *et al.*, 2004).
- **Vacunas inactivadas:** las vacunas inactivadas o muertas contra el VLA son mucho más seguras debido a la ausencia de recurrencia de la enfermedad, viremia en animales vacunados y reversión de la virulencia (Zientara *et al.*, 2010). La desventaja es que requieren múltiples dosis para su eficacia, por lo que suelen resultar más caras, se necesitan grandes cantidades de dosis para desencadenar la inmunidad protectora y en animales vacunados la inmunidad es corta (Mayo *et al.*, 2017).

3.2.9. Bases conceptuales

3.2.9.1. Antígeno

Antígeno es una sustancia o molécula que el sistema inmunológico del cuerpo reconoce como extraño y desencadena una respuesta del sistema inmunológico. los antígenos son parte de patógenos como virus, bacterias, paracitos también pueden ser sustancias no infecciosas como proteínas (Verne, 2007).

3.2.9.2. Anticuerpo

Los anticuerpos son proteínas producidas por el sistema inmunológico para combatir específicamente a los antígenos (García, 2011).

3.2.9.3. Reacción antígeno – anticuerpo

Los anticuerpos son producidos por el sistema inmunitario en respuesta a la presencia de un antígeno, los anticuerpos se unen específicamente al antígeno y pueden neutralizar directamente o marcarlo para la destrucción por otras células del sistema inmune. Esta interacción es fundamental para la respuesta inmunológica del cuerpo ante infecciones (García, 2011).

3.2.9.4. Seroprevalencia

Es un término utilizado en la epidemiología; la seroprevalencia se utiliza para estimar la extensión de una enfermedad en una población que tiene anticuerpos en un momento determinado, se determina también a los animales que hayan estado expuestos a la enfermedad en el pasado, aunque no estén enfermos en la actualidad (Limia *et al.*, 2019).

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1. Tipo de investigación

- **Cuantitativa:** La esencia del estudio se fundamenta en la cuantificación y el análisis de datos numéricos para interpretar los resultados (Hernández-Sampieri y Mendoza, 2018).
- **No experimental:** Se observaron y analizaron los datos sin manipular las variables, manteniendo las condiciones. De tipo trasversal debido a que la recolección de datos se realizó en un único momento (Hernández-Sampieri y Mendoza, 2018).
- **Descriptivo:** Se centró en detallar las características y fenómenos de la población estudiada, ofreciendo una visión clara de la situación (Hernández-Sampieri y Mendoza, 2018).

4.2. Ámbito de investigación

4.2.1. Ubicación espacial

El presente trabajo de investigación se realizó de febrero a junio de 2024 en vacunos del distrito de Challabamba, el mismo que se realizó en dos etapas:

En la primera etapa, se tomaron muestras de sangre de los vacunos del distrito de Challabamba. La obtención de suero y el análisis serológico mediante el método ELISA de competición en el Laboratorio Institucional de Investigación de “Sanidad Animal M.V. Atilio Pacheco” de la Escuela Profesional de Zootecnia, Área de Sanidad Animal - UNSAAC.

En la segunda etapa, se tomaron muestras de sangre de vacunos del hato que resultó seropositivo, y se llevó a cabo el análisis molecular usando el método RT-qPCR en tiempo real, también en el mismo laboratorio.

4.2.2. Ubicación política

Región : Cusco

Departamento : Cusco

Provincia : Paucartambo

Distrito : Challabamba

4.2.3. Ubicación geográfica

El distrito de Challabamba está situada a altitudes que oscilan entre 1 850 m s.n.m. a 4 487 m s.n.m.; se ubica entre las siguientes coordenadas: 12° 48', 36.2'' a 13° 14', 20.8'' de latitud sur y 71° 43' 10.2'' a 71° 56' 02.0'' de longitud oeste; se encuentra en la margen derecha del río Paucartambo o llamado río Mapacho (UNESCO, 2012).

4.2.3.1. Límites geográficos

Norte : Distrito de Yanatile

Este : Distrito de Kcosñipata - Parque Nacional del Manu

Oeste : Distrito de Lares y Calca

Sur : Distritos de Colquepata y Paucartambo

Fuente: (UNESCO, 2012).

El distrito de Challabamba se clasifica como un bosque montano pluviestacional húmedo, donde se encuentra arbustos con altura de 1 a 5 m que constituyen la vegetación natural en áreas húmedas, una notable disminución de lluvias de 2 a 3 meses al año (UNESCO, 2012).

4.3. Materiales de estudio.

4.3.1. Población

La población de estudio está integrada por vacunos machos y hembras de diferentes edades del distrito Challabamba.

4.3.1.1. Tamaño de muestra

El tamaño de la muestra se determinó considerando un nivel de confianza del 92% y un porcentaje de error del 8%, utilizando el muestreo aleatorio simple al azar no paramétrico (Aguilar, 2005). Se tomó en cuenta una población de 6 530 cabezas de ganado vacuno (INEI, 2012). La zona es eminentemente agropecuaria.

$$n = \frac{N \times Z^2(p \times q)}{(N-1) \times E^2 + Z^2(p \times q)}$$

Dónde:

n: Tamaño de muestra

N: Tamaño de la poblacional

Z: 1.76 nivel de confianza que se da a la muestra

p: animales positivos a VLA 0.5

q: animales negativos a VLA 0.5

E: error experimental 0.08

$$n = \frac{N \times Z^2(p \times q)}{(N - 1) \times E^2 + Z^2(p \times q)}$$

$$n = \frac{6530(1.76)^2(0.5)(0.5)}{(6530 - 1)(0.08)^2 + (1.76)^2(0.5)(0.5)}$$

$$n = \frac{6530(3.0976)(0.25)}{(6529)(0.0064) + (3.0976)(0.25)}$$

$$n = \frac{6529(0.7744)}{41.7856 + 0.7744}$$

$$n = \frac{5056.0576}{42.56}$$

$$n = 118.798346$$

$$n = 119$$

El distrito de Challabamba tiene una población de 6 530 cabezas de vacuno. El tamaño de muestra es igual a 119.

4.3.2. Materiales, equipos e instrumentos

4.3.2.1. Materiales para la toma de sangre

- Agujas vacutainer 18G
- Tubos vacutainer con separador de suero
- Tubos vacutainer con anticoagulante EDTA
- Casquetes para agujas vacutainer
- Alcohol de 70°
- Torundas de algodón
- Gradillas
- Baterías de hielo
- Plumón indeleble
- Guantes descartables
- Cooler refrigerante
- Soga
- Mocheta
- Ficha clínica

4.3.2.2. Equipo y materiales para la obtención de suero y almacenamiento de sangre entera

- Centrífuga (Nuve NF200)
- Crioviales 1.5 mL
- Plumón indeleble
- Congeladora -20 °C (Electrolux)
- Ultracongeladora de -86 °C (Biobase)
- Guantes, gorros y barbijo desechables
- Mandil

- Porta crioviales

4.3.2.3. Materiales, equipos e instrumentos para análisis serológico y molecular

- Incubadora (JITERBUG – 4 BIOKEL)
- Cabina de flujo laminar (Telstar Bio II A)
- Lector de microplacas ELISA (Biotek EPOCH 2)
- Vórtex (GENIE 2)
- Incubadora de microplacas ELISA (Stat Fax – 2 200)
- Micropipeta multicanal de (10- 200 μ L; y 100 – 1 000 μ L)
- Micropipeta Unicanal de (1- 5 μ L, 10 – 20 μ L; 10- 200 μ L; y 100 – 1 000 μ L)
- Termociclador en tiempo real (RT- qPCR (Applied Biosystems)
- Centrifuga (Thermo – SCIENTIFIC)
- Termobloque (USA – SCIENTIFIC)
- Cabina de flujo laminar (BIOBASE)
- Mini centrifuga
- Puntas de pipeta desechable de 300 y 1 000 μ L
- Microplaca de predilución de 96 pocillos
- Placa de PCR de 96 pocillos
- Microtubos de PCR compatible con el termociclador
- Agua destilada
- Agua libre de nucleasas
- Etanol absoluto 96 – 100%
- Papel toalla
- Probetas de 100 – 1 000 mL
- Parafilm
- Crioviales de 1.5 – 2 mL

- Guantes, gorra y barbijo y mandil desechables.
- Mandil
- Gafas de laboratorio
- Kit de ELISA de competición para la detección anticuerpos de VLA en muestras de suero.
- Kit de extracción de NORGEN´S para el aislamiento y purificación de ARN total.
- Kit Amplificación ID Gene TM Bluetongue Duplex (IDBTv) en un kit de RT-PCR para la identificación de ARN.

4.3.2.4. Materiales de escritorio

- Bolígrafo.
- Cuaderno.
- Fichas para registrar.
- Marcador indeleble.
- Laptop personal.

4.4. Metodología

4.4.1. Colección de muestras de Sangre

La colección de muestras de sangre en el distrito de Challabamba se llevó a cabo de manera cuidadosa y metódica. A continuación, se describe el proceso: se obtuvo el consentimiento de los ganaderos antes de iniciar el muestreo. La toma de muestra se realizó mediante venopunción caudal, desinfectando el área con alcohol para no contaminar las muestras de sangre. Los materiales utilizados fueron tubos vacutainer de 7 mL con separador de suero para la primera etapa y tubos vacutainer de 3 mL con anticoagulante EDTA para la segunda etapa, todos los tubos fueron rotulados con datos de cada animal muestreado, asegurando su trazabilidad y facilitando el análisis posterior. Asimismo, se completaron las fichas clínicas con la información relevante de cada animal muestreado. Por lo tanto, las

muestras se trasladaron en un cooler al Laboratorio Institucional de Investigación de “Sanidad Animal M.V. Atilio Pacheco”, de la Escuela Profesional de Zootecnia, Facultad de Agronomía y Zootecnia- UNSAAC, donde fueron almacenadas y centrifugadas.

Figura 4. Toma de muestras de sangre de los vacunos del distrito de Challabamba, previa venopunción caudal.



4.4.2. Obtención y almacenamiento del suero sanguíneo

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 15 000 rpm durante 10 minutos. El suero resultante se envasó en viales criogénicos de volumen 1.5 mL y se conservaron en una congeladora a -20 °C hasta el momento del análisis serológico.

Figura 5. Centrifugación de muestras de sangre.



4.4.3. Almacenamiento de muestras de sangre entera

En la segunda etapa se realizó muestreo del hato con vacunos seropositivos a anticuerpos contra el virus lengua azul; las muestras de sangre entera fueron alicuotadas en viales criogénicos de volumen de 1.5 mL, los cuales se almacenaron en una ultracongelada de -86 °C.

4.4.4. Análisis serológico mediante la prueba ELISA competitiva

Los análisis serológicos se realizaron mediante la prueba de ELISA competitiva (iD.vet, 2023). Este método detecta la presencia de anticuerpos de muestras analizadas de manera efectiva.

4.4.4.1. Preparación de reactivo y muestras de suero

Las muestras de suero y los reactivos fueron descongeladas a temperatura ambiente a 18 °C y se homogenizaron las muestras y los controles en un agitador vortex.

Figura 6. Homogenización de muestras de suero.



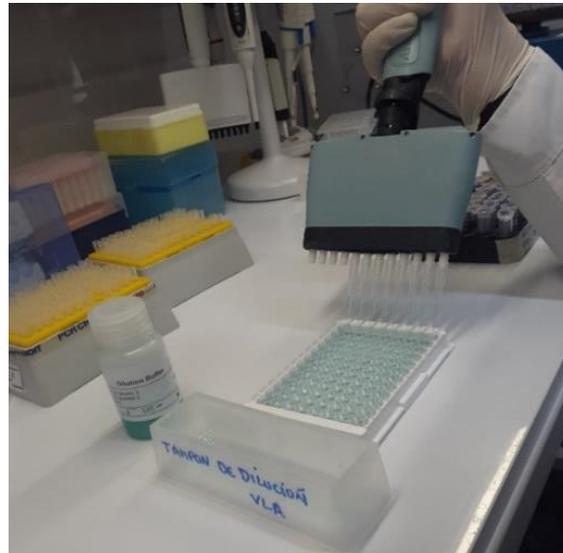
4.4.4.2. Preparación de la solución de lavado.

Antes de su uso, solución de lavado concentrada 20X se llevó a una temperatura de 18 °C. La preparación de la solución de lavado, consiste en diluir la solución de lavado concentrada (20X) en agua destilada: 1/20.

4.4.4.3. Procedimiento de la prueba de ELISA competitiva

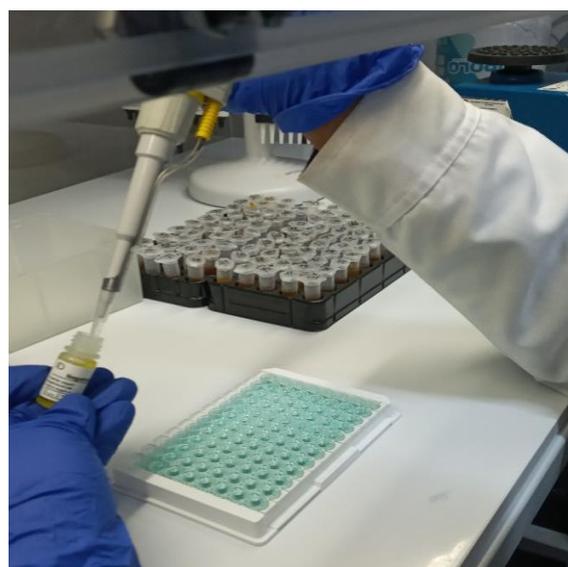
1. Se transfirió 50 μ L del diluyente 2 a cada pocillo de la microplaca ELISA.

Figura 7. Distribución de diluyente 2.



2. En seguida se añadió 50 μ L del control positivo en los pocillos A1 y B1, 50 μ L del control negativo en los pocillos C1 y D1 y se colocaron las muestras de suero en los pocillos restantes, utilizando puntas diferentes para evitar la contaminación. Inmediatamente se cubrió la microplaca con papel parafina.

Figura 8. Distribución del control positivo.



3. Se llevó a cabo la primera incubación durante 45 minutos a 25 °C.

4. Durante la incubación, se preparó el conjugado 1X, que consistió en diluir conjugado 10X en diluyente 2: 1/10.

Figura 9. Preparado de la solución conjugada 1X.



5. Se adicionó 100 μ L del conjugado 1X en todos los pocillos de la microplaca y se cubrió inmediatamente con papel parafina.

Figura 10. Distribución del conjugado 1X.



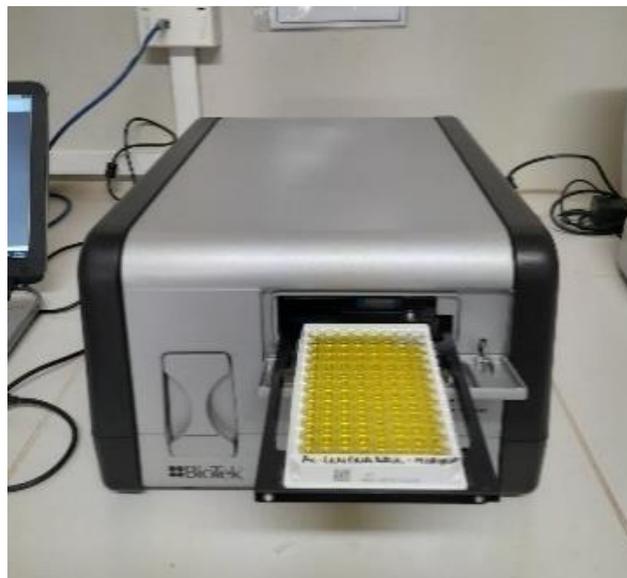
6. Se realizó una segunda incubación durante 30 minutos a 25 °C.
7. Posterior a la incubación, inmediatamente se vaciaron los pocillos y se transfirió 300 μ L de la solución de lavado a los pocillos, repitiendo este proceso tres veces.

Figura 11. Distribución de solución de lavado.



8. Se transfirió 100 μL de la solución de revelación a cada pocillo.
9. Tercera incubación, durante 15 minutos a 25°C en oscuras.
10. Pasado los 15 minutos se transfirió 100 μL de solución de parada a todos los pocillos, donde se determinó la reacción de las muestras evaluadas.
11. En lector de microplacas ELISA, finalmente se realizó la lectura a 450 nm de longitud de onda.

Figura 12. Lectura de la densidad óptica.



4.4.4.4. Validación de la prueba

Se realizó la respectiva lectura de las densidades ópticas (DO) mediante el Software Gen 5 del equipo lector de las microplacas ELISA de la marca BIOTEK. Consecuentemente, se llevaron a cabo los siguientes cálculos de validación:

- La densidad óptica media del control negativo (DO_{CN}) es superior a 0.7.

$$DO_{CN} > 0.7$$

- El cociente entre los valores promedio de las densidades ópticas del control positivo y negativo (DO_{CP} y DO_{CN}) es inferior a 0.3.

$$DO_{CP} / DO_{CN} < 0.3$$

4.4.4.5. Cálculo e interpretación de resultados

Luego de la validación, para cada muestra se calculó el porcentaje de competición (S/N%) mediante la siguiente fórmula:

$$S/N\% = \frac{DO_{muestra}}{DO_{CN}} \times 100$$

La interpretación de las muestras con el S/N%.

- Superiores o iguales al 40% ($S/N\% \geq 40\%$) son considerados como negativos.
- Inferior al 40% ($S/N\% < 40\%$) son considerados como positivos.

4.4.4.6. Determinación de la seroprevalencia de anticuerpos contra el virus lengua azul

Se determinó la seroprevalencia de los anticuerpos contra el virus lengua azul en vacunos del distrito de Challabamba, empleando la fórmula (Bonifaz y Conlago, 2016).

$$\text{Seroprevalencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de muestras positivas contra VLA}}{\text{Total de muestras analizadas}} \times 100$$

Intervalo de confianza (IC) es un rango estadístico que se utiliza para estimar con cierto nivel de confianza, empleando la fórmula (Mendenhall *et al.*, 2009).

$$S \pm Z \sqrt{\frac{p \times q}{n}}$$

Donde:

S: Proporción estimada de muestras positivas

Z: Nivel de confianza deseado

p: Proporción de éxitos

q: = (p-1)

n: Tamaño de la muestra

4.4.5. Análisis molecular

La extracción de ácidos nucleicos se llevó a cabo utilizando el kit de NORGEN'S. La amplificación del ARN se llevó a cabo con Kit ID Gene™ Bluetongue Duplex (IDBTv) - (RT-qPCR) y se utilizó el termociclador en tiempo real para la amplificación del ARN genómico del VLA.

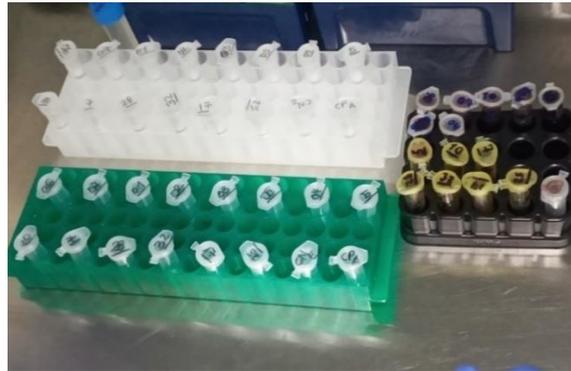
4.4.5.1. Extracción de ácidos nucleicos

La extracción se realizó mediante un método manual, utilizando columnas giratorias. Permite separar eficientemente el ARN de otros componentes de la partícula viral, utilizando el método de extracción NORGEN'S.

4.4.5.1.1. Preparación de la solución de lisis a partir de sangre

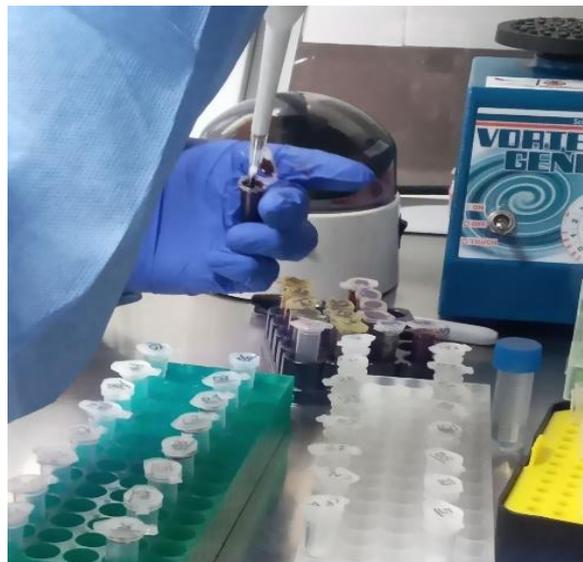
1. Se rotularon los tubos libres de ARNasa con los números de las muestras y controles (control positivo de la diana, control negativo de la extracción).

Figura 13. Rotulado de los tubos para el preparado de la solución de lisis.



2. Luego, se transfirió 100 μ L de cada muestra de sangre y controles a viales libres de ARNasa.

Figura 14. Transferencia de muestras a los viales.



3. Inmediatamente se agregó 300 μ L de buffer RL a todos los tubos, y se homogenizó en un vortex durante 10 segundos.

Figura 15. Distribución de buffer RL a todos los viales.



4. Pasados los 10 segundos, se agregó 400 μL de etanol absoluto de 96-100% (proporcionada por el laboratorio) a todos los tubos, y se homogenizó en un vortex durante 10 segundos.

Figura 16. Adición de etanol absoluto 96-100%.



4.4.5.1.2. Purificación de ARN total del lisado

1. Primero se ensamblaron las columnas en los tubos de recogida y se rotularon con los números según la solución de lisis.
2. Se transfirió 400 μL de la solución de lisado dentro de las columnas.

3. Las columnas, con solución de lisado en su interior, fueron sometidas a centrifugación por 1 minuto a 6 000 RPM.

Figura 17. Centrifugación de las columnas.



4. Una vez culminado el centrifugado se retiró, se eliminó el flujo continuo y se volvió a ensamblar la columna con su tubo de recogida

Figura 18. Ensamblaje de las columnas al tubo de recogida.

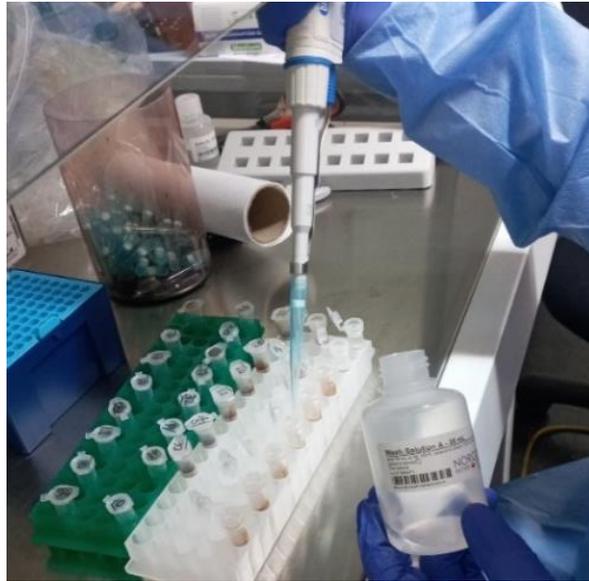


5. Se volvió a repetir el paso 2, 3 y 4 (una vez más).

4.4.5.1.3. Lavado de columnas

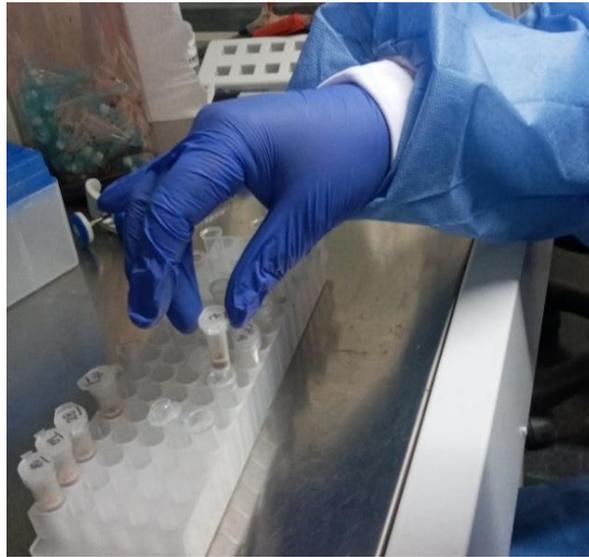
1. Se adicionó 400 μ L de etanol absoluto A (96-100% proporcionado en el kit) a todas las columnas, e inmediatamente se centrifugaron a 14 000 RPM durante 1 minuto

Figura 19. Adición del etanol absoluto.



2. Una vez culminado el centrifugado, se retiraron las columnas y se eliminó el sobrenadante del tubo de recogida y se volvió a reensamblar a las columnas a sus tubos de recogida.
3. Se volvió a repetir los pasos 1 y 2 (por dos veces).
4. Las columnas fueron llevadas a centrifugarse a 14 000 RPM durante 2 minutos para sacar bien la membrana.
5. Los tubos de recolección se eliminaron y las columnas fueron transferidas a tubos de elución proporcionados por el kit.

Figura 20. Inserción de la columna a un tubo de elución.



4.4.5.1.4. Elución de ARN.

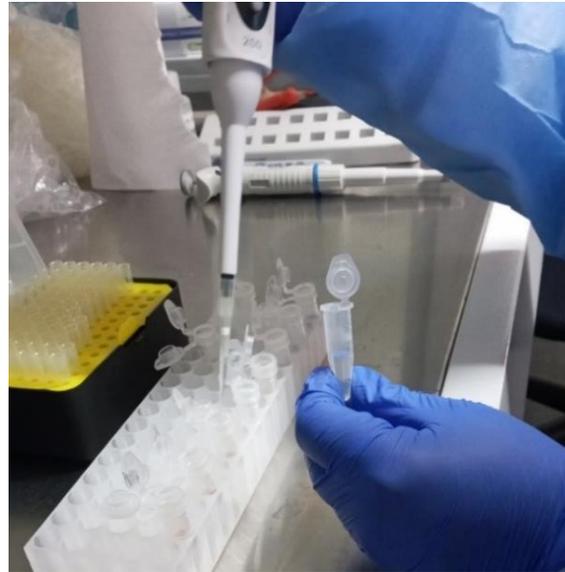
1. A un vial se transfirió 750 μ L de elución A, y se llevó a calentar a 65 $^{\circ}$ C durante 1 minuto.

Figura 21. Calentado de elución A.



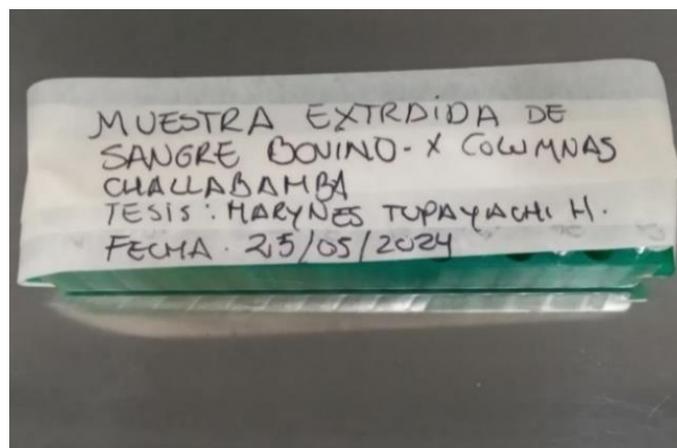
2. Culminado el calentado de elución A, inéditamente se agregó 50 μL a todas las columnas y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto.

Figura 22. Distribución de elución A.



3. Pasado el minuto, se llevó a dos centrifugaciones continuas; una de ellas a una centrifugación a 2 000 RPM durante 2 minutos y a una centrifugación 14 000 RPM durante 1 minuto.
4. La muestra de ARN purificado se llegó a conservar en una ultracongeladora de $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 23. Muestra purificada.



4.4.5.2. Procedimiento de la amplificación

La amplificación se realizó mediante el kit ID Gene™ Blutongue Duplex (IDBTv) es un kit RT-qPCR en tiempo real que amplifica el ARN diana y el control interno del endógeno, de las muestras extraídas y controles. A continuación, los pasos principales:

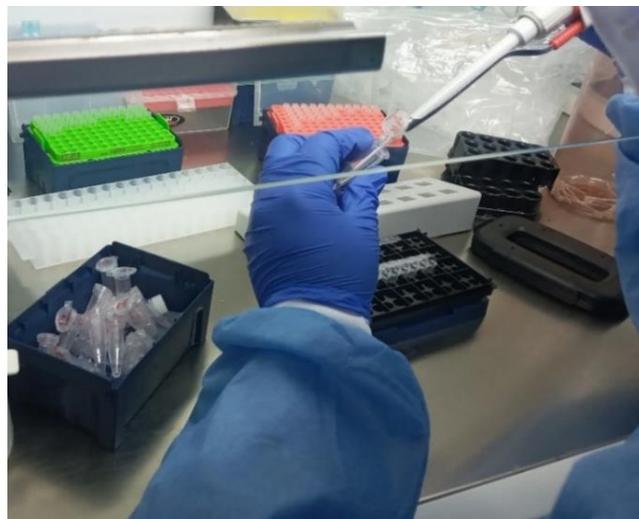
1. Se descongeló el master mix a 5 °C.

Figura 24. Descongelación del master mix.



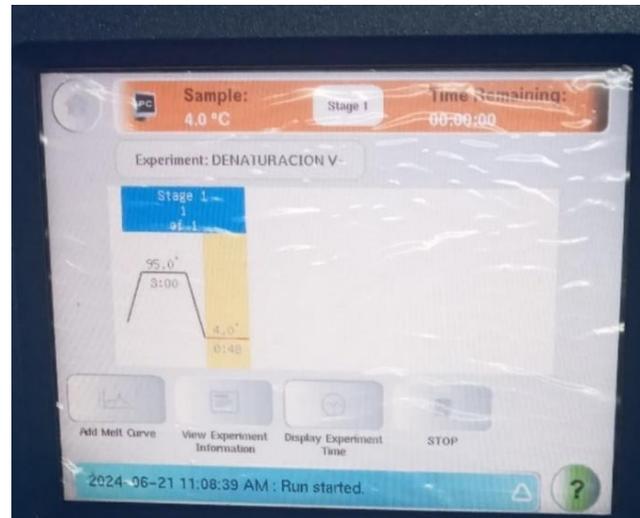
2. A tubos PCR se añadió, 5 μ L de ARN extraído de control positivo de la diana (CP BTV) a tubo D3, 5 μ L control negativo de la extracción (CN NEC) a tubo D4, 5 μ L control negativo de la amplificación (CN NAC) a tubo D5 y 5 μ L de ARN extraído de cada muestra a tubos PCR restantes. Con tiras apropiadas se cubrieron los pocillos.

Figura 25. Adición de muestra.



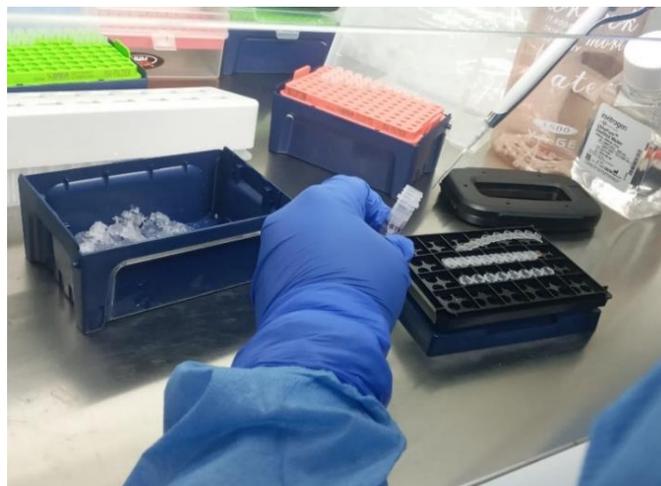
3. La desnaturalización de las muestras se realizó en el termociclador, habiendo programado la fase térmica a 95 °C por 3 minutos, y la fase de enfriamiento a 5 °C durante 5 minutos.

Figura 26. Desnaturalización en el termociclador.



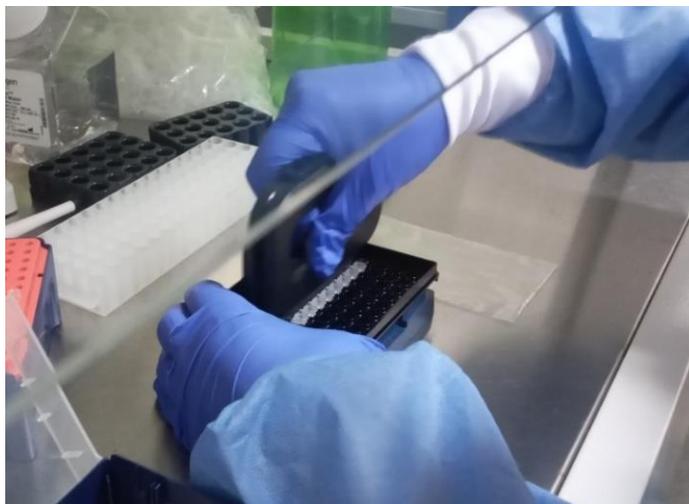
4. Se distribuyó, a cada tubo PCR, 8 μ L de master mix (ARM-BTV), teniendo el volumen final de 13 μ L.

Figura 27. Distribución de master mix a los tubos PCR



5. Se cubrieron los tubos PCR con las tiras apropiadas.

Figura 28. Sellado de los tubos PCR.



4.4.5.3. Fase de amplificación en el termociclador

1. Se programó en el termociclador para detectar los siguientes canales de lectura de cada pocillo.

Tabla 1. Programación en el termociclador.

Diana	Lectura	Quencher / Silenciador
Secuencia específica para BTV	FAN	No fluorescente
Secuencia específica de la célula NTPcen	VIC	No fluorescente

2. Se eligió el programa estándar.

Tabla 2. Programación estándar.

Paso	Estándar	N° de ciclos
Transcripción inversa	10 min a 45 °C	1
Activación de la polimerasa	10 min a 95 °C	1
Desnaturalización	15 seg a 95 °C	40
	1 min a 60 °C	

3. Por último, se programó el volumen final de 13 μL y se dio inicio de amplificación en el termociclador.

4.4.5.4. Validación del ensayo.

El análisis de resultados se basa en el valor de Ciclo umbral (Ct), (ver table 3).

Tabla 3. Validación y resultados esperados.

Control	Resultado esperado	Criterios de aceptabilidad
CP BTV	Detectado en FAM	Presencia de una curva característica
NTPCen	Detectado en VIC	Presencia de una curva característica
CN NEC	No hay detección	Ausencia de una curva característica
CN NAC	No hay detección	Ausencia de una curva característica

4.4.5.5. Interpretación de acuerdo al Ciclo umbral (Ct).

Para cada muestra, los resultados se interpretan de acuerdo a los criterios, (ver la tabla 4)

Tabla 4. Interpretación de las muestras.

Muestra	Señal BTV	Señal NTPCen	Interpretación
Individual	Detectado	Detectado	Positivo para VLA
	No Detectado	Detectado	Negativo para VLA
	No Detectado	No detectado	Problema en la extracción o durante la distribución de la muestra

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Seroprevalencia de anticuerpos contra el virus lengua azul en los vacunos del distrito de Challabamba.

Los valores de las densidades ópticas (DO) arrojadas por el lector de microplacas ELISA se muestran en las tablas 5 y 6. Las posiciones A1 y B1 corresponden a los controles positivos, C1 y D1 son el control negativo, y el resto de las posiciones representan las muestras de suero de cada vacuno.

Tabla 5. I placa, valores de la DO de los controles y muestras de suero.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.05	1.88	2.15	1.97	2.26	1.66	1.78	1.93	1.90	1.72	1.81	2.18
B	0.06	2.01	2.07	1.87	1.90	1.74	1.99	1.69	1.93	2.00	2.18	2.48
C	2.12	2.05	2.27	1.90	1.67	1.67	1.94	1.98	1.85	1.65	2.15	2.00
D	1.89	1.66	1.89	2.02	1.90	1.83	1.61	1.56	0.70	1.08	1.62	1.62
E	2.41	1.86	1.85	1.98	1.89	1.44	1.94	1.80	1.89	1.91	1.98	1.80
F	1.93	1.56	1.96	1.81	1.44	1.70	2.09	1.88	1.92	1.93	2.12	1.81
G	2.05	2.12	1.71	2.02	2.09	1.96	1.23	1.81	1.68	1.80	2.07	1.99
H	1.73	1.93	2.06	1.87	1.80	1.63	1.82	1.95	1.85	2.01	2.17	1.91

Tabla 6. II placa, valores de la DO de los controles y muestras de suero.

	1	2	3	4
A	0.06	1.95	2.17	2.36
B	0.06	2.05	1.64	2.35
C	2.04	2.11	2.01	2.32
D	1.92	2.17	2.10	2.19
E	1.99	2.11	1.98	2.17
F	1.70	2.22	2.26	2.27
G	1.63	2.14	1.97	2.07
H	1.81	2.31	2.25	

Los valores de la DO en la tabla 5 y 6 muestran que, a mayor densidad óptica, existe menor grado de competición de los anticuerpos de las muestras evaluadas por los sitios de unión a los antígenos del VLA de la placa. Por lo tanto, en el presente estudio se evidenció una

muestra con densidad óptica menor, lo cual indica que existen anticuerpos contra el VLA que se unieron a los antígenos de la placa y evitaron que los anticuerpos secundarios del conjugado se unieran a dichos antígenos.

En las tablas 7 y 8, los resultados del porcentaje de competición (S/N%), nos permiten determinar la presencia o ausencia de anticuerpos frente al VLA.

Tabla 7. Resultados de S/N% de los controles y muestras de suero, I placa.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.59	93.94	107.31	97.98	112.79	82.57	88.66	96.39	94.79	85.96	90.05	108.90
B	3.14	100.08	103.12	93.19	94.64	86.91	99.13	84.37	96.29	99.73	108.75	123.46
C	105.91	102.32	113.14	94.89	83.17	83.17	96.73	98.48	92.05	82.17	107.11	99.83
D	94.09	82.57	94.34	100.82	94.49	91.30	80.13	77.64	35.80	54.00	80.83	80.98
E	119.97	92.50	92.05	98.63	94.39	71.80	96.63	89.70	94.29	95.04	98.68	89.95
F	96.39	77.74	97.63	90.30	71.90	84.92	104.21	93.94	95.59	96.39	105.46	90.40
G	102.12	105.91	85.32	100.67	104.36	97.53	61.28	90.05	83.97	89.50	102.97	99.18
H	86.16	96.04	102.87	93.24	89.60	81.03	90.75	97.08	92.00	100.08	108.00	95.34

Tabla 8. Resultados de S/N% de los controles y muestras de suero, II placa.

	1	2	3	4
A	2.98	98.56	109.56	119.09
B	2.98	103.56	82.67	118.39
C	103.10	106.38	101.49	117.02
D	96.90	109.46	105.68	110.52
E	100.18	106.33	99.82	109.66
F	85.95	111.83	114.00	114.55
G	82.17	107.69	99.22	104.57
H	91.45	116.72	113.49	

En las tablas 7 y 8, se observa un positivo detectado con valor de 35.80% (1/119) en el pocillo D9 de la placa I. Esto implica una respuesta significativa de acuerdo a los criterios establecidos por (ID.vet) que el S/N%, superiores o iguales a 40% son consideradas como negativo e inferiores a 40% son consideradas como positivo.

La seroprevalencia de los anticuerpos contra el virus de la lengua azul en vacunos del distrito de Challabamba fue determinada según la cantidad de muestras positivas (ver la tabla 9).

Tabla 9. Seroprevalencia de anticuerpos contra el VLA en vacunos por categorías.

Categoría	N° de muestras evaluadas	N° de animales positivos	Seroprevalencia a VLA
Tenera	18	1	5.56 ± 0.036%
Ternero	18	0	0.00 ± 0.00%
Vaquillona	19	0	0.00 ± 0.00%
Torete	12	0	0.00 ± 0.00%
Vaca	44	0	0.00 ± 0.00%
Toro	8	0	0.00 ± 0.00%
Total,	119	1	0.84 ± 0.015%

En los vacunos del distrito de Challabamba se observó que un vacuno de la categoría ternera mayor a seis meses fue seropositivo a anticuerpos del virus de la lengua azul, con un porcentaje de $5.56 \pm 0.036\%$ (1/18), la seroprevalencia general fue de $0.84 \pm 0.015\%$ (1/119). Evidenciando la presencia de la enfermedad en el distrito de Challabamba, lo que podría estar relacionada con la existencia del vector de la enfermedad en la zona de estudio, puesto que el vacuno seropositivo es de la zona de estudio y no procede de otras regiones del país, lo que hace sospechar que dicho animal se contagió con el virus mediante la picadura de un vector.

Nuestros resultados guardan relación con el reporte realizado por Incil (2023) en Perú, quien evidenció una seroprevalencia del VLA en vacunos a nivel nacional del 19.1% (653/3425). En el sur del Perú, la seroprevalencia es de 0.49% (9/1851), mientras que en Huancavelica, Cusco y Puno se reportan 4.41% (3/68), 1.75% (4/228) y 0.29% (2/685) respectivamente. Esto demuestra que la enfermedad ya se encuentra en la sierra del Perú, resaltando a una menor altitud de lo 3 000 m s.n.m., mayor número de infecciones.

El estudio realizado por Ramos (2023), reveló una seroprevalencia en la región selva de 85.12% de VLA en bovinos mediante el método de ELISA competitiva, Asimismo, destacó que existe un mayor número de casos positivos a anticuerpos contra VLA en altitudes 400 a 1

000 m n.s.m., y también refirió que a altitudes superiores a los 1 000 m s.n.m. no se encontraron casos positivos. Nuestro resultado no guarda relación con dicho autor, ya que el distrito de Challabamba, se encuentra en una altitud promedio a 2 853 m s.n.m., existiendo un animal positivo.

Por otro lado, Nogueira *et al.* (2016) en Brasil, estado de San Pablo y Verdezoto *et al.* (2018) en Ecuador, ambos utilizando el método ELISA de competición, reportaron seroprevalencias de la enfermedad del VLA en bovinos de 86% (1 483/1 716) y 98.9%, respectivamente. Los resultados presentados son significativamente superiores y no guardan relación al presente trabajo de investigación, debido a que las zonas evaluadas por dichos autores corresponden a climas tropicales.

5.2. Genoma del virus lengua azul en los vacunos del distrito de Challabamba.

Las amplificaciones arrojadas por el software StepOneplus se muestran en la tabla 10. Las posiciones D3 corresponde CN BTV, D4 corresponden a CN NEC, D5 corresponde a CN NAC y el resto corresponde a las 13 muestras de sangre evaluadas individualmente (ver la tabla 10).

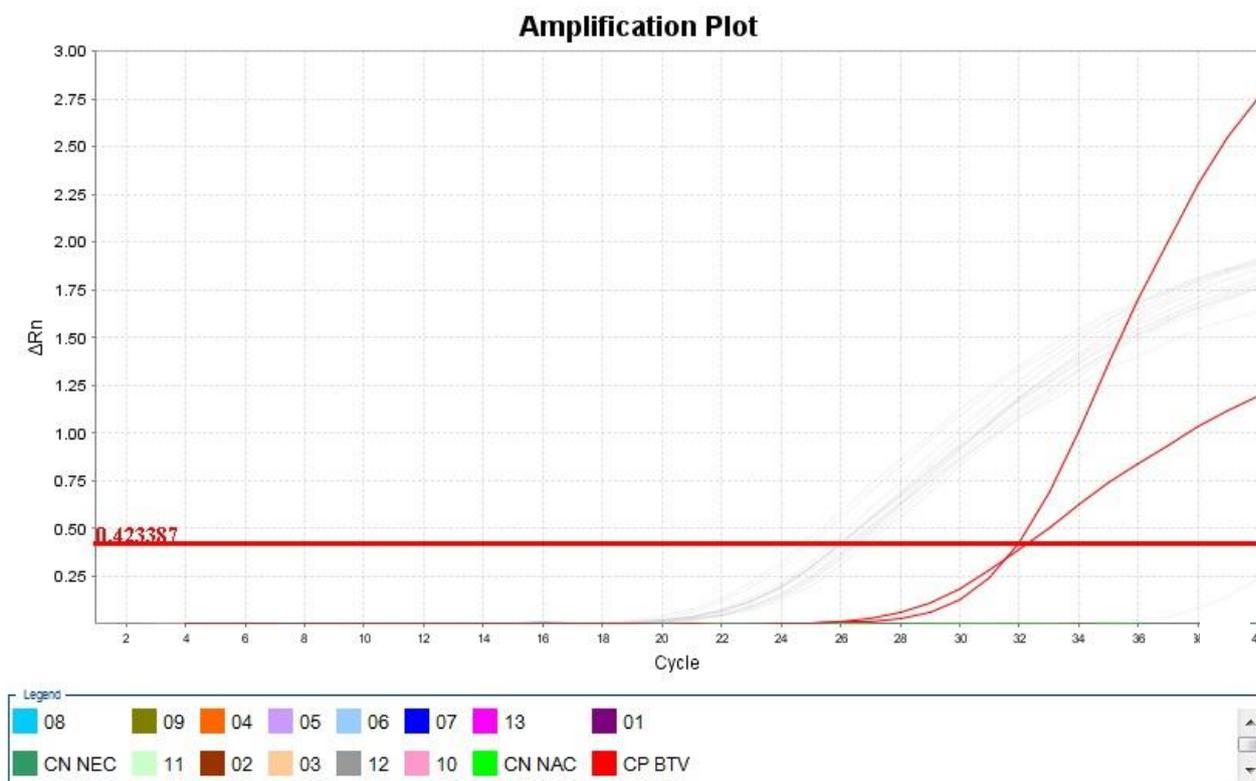
Tabla 10. Resultados de amplificación en el Software StepOneplus de material genético para VLA y NTPCen.

Nº de pocillos	Nombre de la muestra	Nombre de destino	Reporte	Significado de Ct
D3	CP BTV	BTV	FAM	31.96
D3	CP BTV	NTPCen	VIC	27.39
D4	CN NEC	BTV	FAM	No determinado
D4	CN NEC	NTPCen	VIC	No determinado
D5	CN NAC	BTV	FAM	No determinado
D5	CN NAC	NTPCen	VIC	No determinado
D6	01	BTV	FAM	No determinado
D6	01	NTPCen	VIC	20.30
D7	02	BTV	FAM	No determinado
D7	02	NTPCen	VIC	20.98
D8	03	BTV	FAM	No determinado
D8	03	NTPCen	VIC	21.21
D9	04	BTV	FAM	No determinado
D9	04	NTPCen	VIC	21.65
D10	05	BTV	FAM	No determinado
D10	05	NTPCen	VIC	21.08
E3	06	BTV	FAM	No determinado
E3	06	NTPCen	VIC	21.61
E4	07	BTV	FAM	No determinado
E4	07	NTPCen	VIC	21.99
E5	08	BTV	FAM	No determinado
E5	08	NTPCen	VIC	19.90
E6	09	BTV	FAM	No determinado
E6	09	NTPCen	VIC	21.73
E7	10	BTV	FAM	No determinado
E7	10	NTPCen	VIC	21.06
E8	11	BTV	FAM	No determinado
E8	11	NTPCen	VIC	21.20
E9	12	BTV	FAM	No determinado
E9	12	NTPCen	VIC	21.86
E10	13	BTV	FAM	No determinado
E10	13	NTPCen	VIC	21.05

En la tabla 10, se evidencian los resultados de amplificación en el software de manera individual. Donde se muestra la amplificación del control positivo diana (CP BTV) reportada por canales FAM con un valor de ciclo umbral (Ct) de 31.96 y control positivo no diana endógeno (NTPCen) reportado por canales VIC con un valor de Ct de 27.39, no se observó la amplificación del control negativo de extracción (CN NEC), ni del control negativo de amplificación (CN NAC). Las 13 muestras de sangre evaluadas no amplificaron para el

material genético del virus (BTV). Sin embargo, se observa la amplificación del endógeno (NTPCen) reportada por los canales VIC, siendo un indicador de que, en las muestras, si se detectó material genético endógeno, lo que valida la fidelidad del ensayo.

Figura 29. Resultado de las curvas de amplificación en el Software StepOneplus de material genético para VLA y NTPcen



Se puede observar en la figura 31, que el valor destacado 0.423387 es el punto crítico de amplificación. Además, existe la presencia de una curva característica del control positivo diana (CP-BTV) que se detecta en los canales FAN y VIC. Por otro lado, no se observó ninguna curva característica para el control negativo de extracción (CN-NEC) y del control negativo de amplificación (CN-NAC). Existe la presencia de curvas características detectadas por el canal de detección VIC de cada muestra de sangre evaluada (NTPcen).

Nuestros resultados no coinciden con el reporte realizado por Acevedo *et al.* (2023) en América, en la República de Cuba, donde evidenciaron presencia de VLA en muestras de sangre de un ternero a los 21 días de edad mediante la prueba RT-PCR. Asimismo, van Rijn

et al. (2012), en los países bajos del continente Europeo, reportaron mediante la prueba de PCR 369 vacunos positivos al virus lengua azul (369/403).

Por otro lado, nuestros resultados no guardan relación con los hallazgos de López *et al.* (2022) en ovinos del departamento de San Martín y Navarro *et al.* (2019) en ovinos de la ciudad de Pucallpa, provincia coronel Portillo y Ucayali. Ambos estudios por el método (RT-PCR) en tiempo real, evidenciaron la presencia del VLA con 2 animales positivos (2/366) y una muestra positiva a VLA (1/15), respectivamente.

VI. CONCLUSIONES

1. La seroprevalencia de virus lengua azul (VLA) de vacunos en el distrito de Challabamba fue de 0.84% (1/119), con una ternera positiva al anticuerpo contra el VLA.
2. No se detectó la presencia de ARN genómico del virus lengua azul en las muestras de sangre de vacunos del hato seroreactor del distrito de Challabamba.

VII. RECOMENDACIONES

- Poner en alerta a los productores y a los miembros de SENASA sobre la presencia del anticuerpo contra el VLA en los vacunos del distrito de Challabamba.
- Realizar un mapeo sanitario en otros distritos aledaños a Challabamba, con objetivo de obtener un panorama más amplio respecto a la presencia de la enfermedad de la lengua azul en vacunos de la provincia de Paucartambo y la región Cusco.
- Realizar nuevas investigaciones sobre los factores ecológicos y climáticos que influyen en la distribución de los vectores de mosquitos *Culicoides*.
- A los productores de vacunos del distrito de Challabamba, se recomienda no adquirir vacunos sin certificado sanitario y provenientes de zonas endémicas de la enfermedad de la lengua azul, para evitar el transporte de los vectores o animales portadores del virus.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, A. M., Curiel Hernández, M., Díaz Corona, C., Obret Ferrer, Y., Frías Lepoureau, M. T., & Perera González, C. L. (2023). Aislamiento e identificación del virus de la lengua azul por primera vez en Cuba. *Revista de Salud Animal*, 45.
- Acevedo, A. M., Curiel, M., Relova, D., & Perera, C. L. (2020). Virus de la lengua azul: Actualización de la situación en las Américas, el Caribe y Cuba. *Revista de Salud Animal*, 42(2). <http://orcid.org/0000-0001-8236-3734>
- Agüero, M., Arias, M., Romero, L. J., Zamora, M. J., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2002). Molecular differentiation between NS1 gene of a field strain Bluetongue virus serotype 2 (BTV-2) and NS1 gene of an attenuated BTV-2 vaccine. *Veterinary Microbiology*, 86(4), 337-341. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00011-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00011-1)
- Aguilar, B. (2005). Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud en Tabasco*, 11(1-2), 333-338.
- Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Graciela, M., Munive, R., & Olvera, B. P. (2014). PCR en tiempo real. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. México DF: SEMARNAT, INECC, UAM-I, 175-201.
- Anthony, S., Jones, H., Darpel, K. E., Elliott, H., Maan, S., Samuel, A., Mellor, P. S., & Mertens, P. P. C. (2007). A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7 gene) from 24 BTV serotypes. *Journal of Virological Methods*, 141(2), 188-197. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.12.013>
- Balasuriya, U. B. R., Nadler, S. A., Wilson, W. C., Pritchard, L. I., Smythe, A. B., Savini, G., Monaco, F., De Santis, P., Zhang, N., Tabachnick, W. J., & MacLachlan, N. J. (2008). The NS3 proteins of global strains of bluetongue virus evolve into regional topotypes through negative (purifying) selection. *Veterinary Microbiology*, 126(1), 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.07.006>

- Belhouchet, M., Jaafar, F. M., Firth, A. E., Grimes, J. M., Mertens, P. P. C., & Attoui, H. (2011). Detection of a Fourth Orbivirus Non-Structural Protein. *PLOS ONE*, 6(10), e25697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025697>
- Bonifaz, N., & Conlago, F. (2016). Prevalencia e incidencia de mastitis bovina mediante la prueba decaliforniamastitis test con identificación del agente etiológico, en paquiestancia, Ecuador. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 24(2), 43-52. <https://doi.org/dx.doi.org/10.17163/lgr.n24.2016.04>
- Bumbarov, V., Golender, N., Jenckel, M., Wernike, K., Beer, M., Khinich, E., Zalesky, O., & Erster, O. (2020). Characterization of bluetongue virus serotype 28. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(1), 171-182. <https://doi.org/10.1111/tbed.13338>
- Clercq, K., De Leeuw, I., Verheyden, B., Vandemeulebroucke, E., Vanbinst, T., Herr, C., Méroc, E., Bertels, G., Steurbaut, N., Miry, C., De Bleecker, K., Maquet, G., & Bughin, J. (2008). Transplacental Infection and Apparently Immunotolerance Induced by a Wild-type Bluetongue Virus Serotype 8 Natural Infection. *Transboundary and Emerging Diseases*, 55(8), 352-359. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2008.01044.x>
- Darpel, K. E., Batten, C. A., Veronesi, E., Shaw, A., Anthony, S., Bachanek-Bankowska, K., Kgosana, L., Bin-Tarif, A., Carpenter, S., Müller-Doblies, U., Takamatsu, H., Mellor, P. S., Mellor, P. S., & Batten, C. (2007). Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. *Veterinary Record*, 161(8), 253-261. <https://doi.org/10.1136/vr.161.8.253>
- Du Toit, R. M. (1944). The transmission of blue-tongue and horse-sickness by *Culicoides*. *Indian Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, 19(1), 2.
- Felippe, M. L., Cáceres, A., Da Silva, C. S. D., Valderrama, W., Gonzales, A., & Costa, J. M. (2008). New records of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) from Peruvian

- Amazonian region. *Biota Neotropica*, 8(2), 33-38. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032008000200002>
- Forzan, M., Marsh, M., & Roy, P. (2007). Bluetongue Virus Entry into Cells. *Journal of Virology*, 81(9), 4819-4827. <https://doi.org/10.1128/jvi.02284-06>
- Gambles, R. M. (1949). Bluetongue of sheep in Cyprus. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 59, 176-190. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(49\)80018-X](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(49)80018-X)
- García, Á. (2011). Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*, 26(5), 301-306. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2010.10.005>
- Gethmann, J., Probst, C., & Conraths, F. J. (2020). Economic Impact of a Bluetongue Serotype 8 Epidemic in Germany. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00065>
- Gorchs, C., & Lager, I. (2001). Lengua Azul. Actualización sobre el agente y la enfermedad. *Rev. argent. microbiol*, 33(2), 122-132.
- Grewar, Dd. J. (2016). The economic impact of Bluetongue and other orbiviruses in sub-Saharan Africa, with special reference to Southern Africa. *Veterinaria Italiana*, 52(3-4), 375-381. <https://doi.org/10.12834/VetIt.503.2427.3>
- Hernández-Sampieri, R., & Mendoza, C. (2018). Metodología de la investigación: Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. (Ciudad de México, México: Editorial Mc Graw Hill Education, Vol. 1443413652.
- Hunter, P. R. (2003). Climate change and waterborne and vector-borne disease. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 37-46. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.94.s1.5.x>
- iD.vet. (2023). ID Screen® Bluetongue Competition. *Innovative Diagnostics*. <https://www.innovative-diagnostics.com/produit/id-screen-bluetongue-competition/>

- Incil, E. B. (2023). Seroprevalencia y factores de riesgo de infección por el virus de lengua azul en bovinos del Perú. *Universidad Nacional de Cajamarca*.
<http://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/5936>
- INEI. (2012). IV Censo Nacional Agropecuario 2012—*Sistema de Consulta de Cuadros Estadísticos*. <https://censos.inei.gob.pe/cenagro/tabulados/?id=CensosNacionales>
- Jurado, J., Navarro, D., Ramírez, M., Santiago, M. A., & Rivera, H. (2020). Detección de anticuerpos contra el virus de lengua azul enovinos de dos localidades de Junín, Perú. *Rev Inv Vet Perú*, 31(2). <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17850>
- Labadie, T., & Roy, P. (2020). Multiple Routes of Bluetongue Virus Egress. *Microorganisms*, 8, Article 7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8070965>
- Limia, S. A., Labrador, M. V., Ory, F. de, Sánchez, L., Rodríguez Cobo, I., Cantero Gudino, E., Vázquez Moreno, J., & Arce Arnáez, A. (2019). Metodología del 2º estudio de seroprevalencia en España. *Revista Española de Salud Pública*, 93. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1135-57272019000100018&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- López, A. M., Cruz Vasquez, R. D., Puicón Niño de Guzmán, V. H., Bartra Reátegui, A., Ríos Ramírez, O., Fabián Domínguez, F., López Flores, A. M., Cruz Vasquez, R. D., Puicón Niño de Guzmán, V. H., Bartra Reátegui, A., Ríos Ramírez, O., & Fabián Domínguez, F. (2022). Detection of bluetongue virus in sheep by real-time RT-PCR in different production systems in San Martín, Peru. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 13(3), 596-611. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i3.5873>
- Lucientes, J., Calvete, C., Estrada, R., Miranda, M. A., Del Río, R., & Borrás, D. (2008). Los vectores de la Lengua Azul: Conocimientos básicos de su bioecología. El Programa Nacional de Vigilancia Entomológica de la Lengua Azul en España. *XXXIII Jornadas*

Científicas y XII Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Almería, España, 40-51.

Lymperopoulos, K., Wirblich, C., Brierley, I., & Roy, P. (2003). Sequence Specificity in the Interaction of Bluetongue Virus Non-structural Protein 2 (NS2) with Viral RNA - *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 31722-31730. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301072200>

Maan, S., Maan, N. S., Belaganahalli, M. N., Rao, P. P., Singh, K. P., Hemadri, D., Putty, K., Kumar, A., Batra, K., Krishnajyothi, Y., Chandel, B. S., Reddy, G. H., Nomikou, K., Reddy, Y. N., Attoui, H., Hegde, N. R., & Mertens, P. P. C. (2015). Full-Genome Sequencing as a Basis for Molecular Epidemiology Studies of Bluetongue Virus in India. *PLoS ONE*, 10(6), e0131257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131257>

Maan, S., Maan, N. S., Rijn, P. A. van, Gennip, R. G. P. van, Sanders, A., Wright, I. M., Batten, C., Hoffmann, B., Eschbaumer, M., Oura, C. A. L., Potgieter, A. C., Nomikou, K., & Mertens, P. P. C. (2010). Full Genome Characterisation of Bluetongue Virus Serotype 6 from the Netherlands 2008 and Comparison to Other Field and Vaccine Strains. *PLoS ONE*, 5(4), e10323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010323>

Maclachlan, N. j, Mayo, C. e, Daniels, P. w, Savini, G., Zientara, S., & Gibbs, E. p. j. (2015). Bluetongue. *Revista Científica y Técnica*, 34(2), 329. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2360>

Mayo, C., Lee, J., Kopanke, J., & MacLachlan, N. J. (2017). A review of potential bluetongue virus vaccine strategies. *Veterinary microbiology*, 206, 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.015>

Mendenhall, W., Beaver, R., & Beaver, B. (2009). Introduction to probability and statistics (13th ed). *Brooks/Cole, Cengage Learning*. www.FreeLibros.me

- Menzies, F. D., McCullough, S. J., McKeown, I. M., Forster, J. I., Jess, S., Batten, C., Murchie, A. K., Gloster, J., Fallows, J. G., Pelgrim, W., Mellor, P. S., & Oura, C. a. L. (2008). Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. *Veterinary Record*, *163*(7), 203-209. <https://doi.org/10.1136/vr.163.7.203>
- Mertens, P., Diprose, J., Maan, S., Singh, K., Attoui, H., & Samuel, A. (2004). Bluetongue virus replication, molecular and structural biology. *Vet. ital.*, *40*(4), 426-437.
- Mertens, P., Monhd, F., & Attoui, H. (2015). Orbiviruses and Bluetongue Virus. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-18. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001010.pub3>
- MIDAGRE. (2015). Vacunos de doble propósito. <https://www.midagri.gob.pe/portal/40-sector-agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-produccion/304-vacunos-de-doble-proposito?start=1>
- MINAM, M. del A. (2016). Programa Nacional de Conservación de Bosques para la Mitigación del Cambio Climático. <https://www.gob.pe/institucion/bosques/noticias/619890-presidencia-de-la-republica-aprobo-estrategia-nacional-sobre-bosques-y-cambio-climatico>
- Mohd, F., Monsion, B., Mertens, P., & Attoui, H. (2023). Identification of Orbivirus Non-Structural Protein 5 (NS5), Its Role and Interaction with RNA/DNA in Infected Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ijms24076845>
- Monaco, F., De Luca, N., Spina, P., Morelli, D. and others, Liberatore, I., Citarella, R., Conte, A., & Savini, G. (2004). Virological and serological response of cattle following field vaccination with bivalent modified-live vaccine against bluetongue virus serotypes 2 and 9. *Veterinaria italiana*, *40*(4), 657-660.
- Navarro, D., Rojas, M., Jurado, J., Manchego, A., Ramírez, M., Castillo, A., & Rivera, H. (2019). Detección molecular del virus de Lengua Azul en *Culicoides insignis* y en

- ovinos de Pucallpa, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, 30(1), 465-476. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15690>
- Nogueira, A. de C., Stefano, E., Martins, M. de S. N., Okuda, L. H., Lima, M. dos S., Garcia, T. da S., Hellwig, O. H., Lima, J. E., Savini, G., & Pituco, E. M. (2016). Prevalence of Bluetongue virus serotype 4 in cattle in the State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinaria Italiana*, 52(3-4), 319-323. <https://doi.org/10.12834/VetIt.570.2721.1> Accepted: 09.07.2016
- Patel, A., Mohl, B.-P., & Roy, P. (2016). Entry of Bluetongue Virus Capsid Requires the Late Endosome-specific Lipid Lysobisphosphatidic Acid *. *Journal of Biological Chemistry*, 291(23), 12408-12419. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.700856>
- Purse, B. V., Brown, H. E., Harrup, L., Mertens, P. P., & Rogers, D. J. (2008). Invasion of bluetongue and other orbivirus infections into Europe: The role of biological and climatic processes. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 27(2), 427-442.
- Purse, B. V., Carpenter, S., Venter, G. J., Bellis, G., & Mullens, B. A. (2015). Bionomics of Temperate and Tropical Culicoides Midges: Knowledge Gaps and Consequences for Transmission of Culicoides-Borne Viruses. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 373-392. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020614>
- Purse, B. V., Mellor, P. S., Rogers, D. J., Samuel, A. R., Mertens, P. P., & Baylis, M. (2005). Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature reviews microbiology*, 3(2), 171-181. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1090>
- Ramos, H. (2023). *Distribución espacial y seroprevalencia del virus Lengua Azul en bovinos de los departamentos de la selva del Perú*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria;

- Ratinier, M., Shaw, A. E., Barry, G., Gu, Q., Di Gialleonardo, L., Janowicz, A., Varela, M., Randall, R. E., Caporale, M., & Palmarini, M. (2016). Bluetongue Virus NS4 Protein Is an Interferon Antagonist and a Determinant of Virus Virulence. *Journal of Virology*, *90*(11), 5427-5439. <https://doi.org/10.1128/jvi.00422-16>
- Rey, J. R., Tabachnick, W. J., Smartt, C. T., & Connelly, C. R. (2008). Lengua Azul. *University of Florida, ENY-743S*. <https://www.academia.edu/download/88584791/115529.pdf>
- Reyes, S. P. A., Pinto, C. E., & Granados, C. J. L. (2021). Virus de lengua azul. *Universidad de Santander, Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de Investigación en Manejo Clínico CliniUDES, Bucaramanga, Colombia*. <https://repositorio.udes.edu.co/server/api/core/bitstreams/bcc44532-3ece-4f39-8bcb-79103d44916b/content>
- Rodríguez, M. D., Louloudes, A., Avia, M., Martín, V., Rojas, J. M., & Sevilla, N. (2021). The Interplay between Bluetongue Virus Infections and Adaptive Immunity. *Viruses*, *13*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/v13081511>
- Rojas, J. M., Martín, V., & Sevilla, N. (2021). Vaccination as a Strategy to Prevent Bluetongue Virus Vertical Transmission. *Pathogens*, *10*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111528>
- Rosadio, R. H., Evermann, J. F., & DeMartini, J. C. (1984). A preliminary serological survey of viral antibodies in Peruvian sheep. *Veterinary microbiology*, *10*(1), 91-96.
- Rosell, C. A. (2004). Lengua azul o fiebre cataral ovina (LA). *La revista internacional del sector cárnico*, *132*, 33-40.
- Roy, P. (2008). Bluetongue virus: Dissection of the polymerase complex. *Journal of General Virology*, *89*(8), 1789-1804. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/002089-0>
- Saminathan, M., Singh, K. P., Khorajiya, J. H., Dinesh, M., Vineetha, S., Maity, M., Rahman, A. F., Misri, J., Malik, Y. S., Gupta, V. K., Singh, R. K., & Dhama, K. (2020). An

- updated review on bluetongue virus: Epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control with special reference to India. *Veterinary Quarterly*, 40(1), 258-321. <https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1831708>
- Samy, A. M., & Peterson, T. A. (2016). Climate Change Influences on the Global Potential Distribution of Bluetongue Virus. *PLOS ONE*, 11(3), e0150489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150489>
- Sanches, C., Pedrera, M., Rodriguez-Sanchez, B., Ruiz-Villamor, M, Risalde, M. A., Molina, V., Goyosso, M., Sánchez-Vizcaíno, J. M., & Gómez-Villamandos, J. C. (2009). Lengua azul: Vacunas, inmunomoduladores e inmunidad protectora. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía*, 22(1), 211-226.
- Sánchez, M. A., Grande, S. M. A., Rodriguez, S. B., & Vizcaíno, S. (2008). Relación entre los serotipos de lengua azul y su vector, en Europa y Cuenca Mediterráneo. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2(2), 45.
- Savini, G., Monaco, F., Calistri, P., Panichi, G. and others, Ruiu, A., Leone, A., & Caporale, V. (2004). Neutralising antibody response in cattle after vaccination with monovalent modified-live vaccine against bluetongue virus serotype 2. *Vet Ital*, 40(4), 668-670.
- Schulz, C., Bréard, E., Sailleau, C., Jenckel, M., Viarouge, C., Vitour, D., Palmarini, M., Gallois, M., Höper, D., Hoffmann, B., Beer, M., & Zientara, S. (2016). Bluetongue virus serotype 27: Detection and characterization of two novel variants in Corsica, France. *Journal of General Virology*, 97(9), 2073-2083. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000557>
- Schwartz, I., Mertens, P., Contreras, V., Hemati, B., Pascale, F., Bréard, E., Mellor, P., Maclachlan, N., & Zientara, S. (2008). Bluetongue virus: Virology, pathogenesis and immunity. *Veterinary Research*, 39(5), 1. <https://doi.org/10.1051/vetres:2008023>

- Spreull, J. (1905). Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 18, 321-337.
- Subhadra, S., Sreenivasulu, D., Pattnaik, R., Panda, B. K., & Kumar, S. (2023). Bluetongue virus: Past, present, and future scope. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 17(02), Article 02. <https://doi.org/10.3855/jidc.16947>
- Sutton, G., Grimes, J., Stuart, D., & Roy, P. (2007). Bluetongue virus VP4 is an RNA-capping assembly line. *Nature structural & molecular biology*, 14(5), 449-451. <https://doi.org/10.1038/nsmb1225>
- UNESCO, [object Object]. (2012). Guía de estimación de riesgo para el distrito de Challabamba, provincia de Paucartambo, Región Cusco. *UNESCO Office Lima*. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000225958>
- Van den Bergh, C., Coetzee, P., & Venter, E. H. (2018). Reassortment of bluetongue virus vaccine serotypes in cattle. *Journal of the South African Veterinary Association*, 89(0), a1649. <https://doi.org/10.4102/jsava.v89i0.1649>
- van Rijn, P. A. (2019). Prospects of Next-Generation Vaccines for Bluetongue. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 407. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00407>
- van Rijn, P. A., Heutink, R. G., Boonstra, J., Kramps, H. A., & van Gennip, R. G. P. (2012). Sustained high-throughput polymerase chain reaction diagnostics during the European epidemic of Bluetongue virus serotype 8. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(3), 469-478. <https://doi.org/10.1177/1040638712440986>
- Vega, S., Tolari, F., García, Á., Gómez, T., Fernández, S., Galiana, C., Cavini, S., & Pérez, T. (2004). Lengua azul fiebre catarral ovina. *Profesión veterinaria*, 15(60), 14-23.
- Verdezoto, J., Breard, E., Viarouge, C., Quenault, H., Lucas, P., Sailleau, C., Zientara, S., Augot, D., & Zapata, S. (2018). Novel serotype of bluetongue virus in South America

- and first report of epizootic haemorrhagic disease virus in Ecuador. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(1), 244-247. <https://doi.org/10.1111/tbed.12625>
- Verne, M. E. (2007). Conceptos importantes sobre inmunizaciones. *Acta Médica Peruana*, 24(1), 59-64.
- Williamson, S., Woodger, N., & Darpel, K. (2008). Differential diagnosis of bluetongue in cattle and sheep. *In Practice*, 30(5), 242-251. <https://doi.org/10.1136/inpract.30.5.242>
- Wilson, A., Darpel, K., & Mellor, P. S. (2008). Where Does Bluetongue Virus Sleep in the Winter. *PLoS Biology*, 6(8), e210. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060210>
- Wilson, A., & Mellor, P. (2009). Bluetongue in Europe: Past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 2669-2681. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0091>
- Wu, W., Celma, C. C., Kerviel, A., & Roy, P. (2019). Mapping the pH Sensors Critical for Host Cell Entry by a Complex Nonenveloped Virus. *Journal of Virology*, 93(4), e01897-18. <https://doi.org/10.1128/jvi.01897-18>
- Wu, W., & Roy, P. (2022). Sialic Acid Binding Sites in VP2 of Bluetongue Virus and Their Use during Virus Entry. *Journal of Virology*, 96(1), e01677-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.01677-21>
- Zientara, S., MacLachlan, N. J., Calistri, P., Sanchez-Vizcaino, J.-M., & Savini, G. (2010). Bluetongue vaccination in Europe. *Expert review of vaccines*, 9(9), 989-991. <https://doi.org/10.1586/erv.10.97>

ANEXOS

Anexo 1. Cálculo para determinar la seroprevalencia de anticuerpos contra el VLA en vacunos del distrito de Challabamba.

$$\text{Seroprevalencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de muestras positivas contra VLA}}{\text{Total de muestras analizadas}} \times 100$$

$$\text{Seroprevalencia} = \frac{1}{119} \times 100$$

$$\text{Seroprevalencia} = 0.840336134$$

$$\text{Seroprevalencia} = 0.84 \%$$

Entonces el intervalo de confianza (IC):

$$S \pm Z \sqrt{\frac{p \times q}{n}}$$

$$S \pm 1.76 \times \sqrt{\frac{(0.0084)(1 - 0.84)}{119}}$$

$$S \pm 1.76 \times \sqrt{\frac{0.0084 (0.9916)}{119}}$$

$$S \pm 1.76 \times \sqrt{\frac{0.0083}{119}}$$

$$S \pm 1.76 \times 0.0084$$

$$S \pm 0.0148$$

$$\text{IC} \pm (0; 2.32\%)$$

Anexo 2. Panel fotográfico del trabajo de investigación.

Imagen 1. Crioviales con muestras de suero obtenidas para ser almacenadas en la refrigeradora.

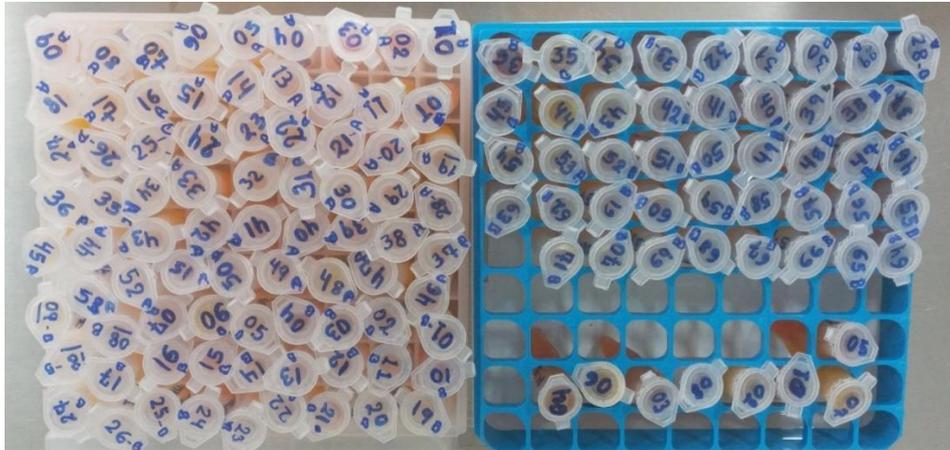


Imagen 2. Kit de laboratorio iD.vet para el diagnóstico de VLA.

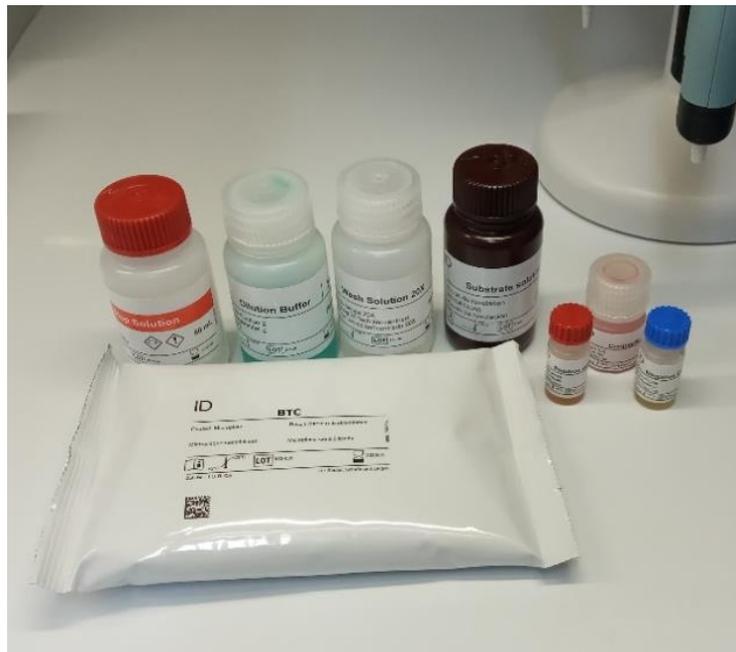


Imagen 1. Homogenización de las muestras evaluadas en la microplaca.



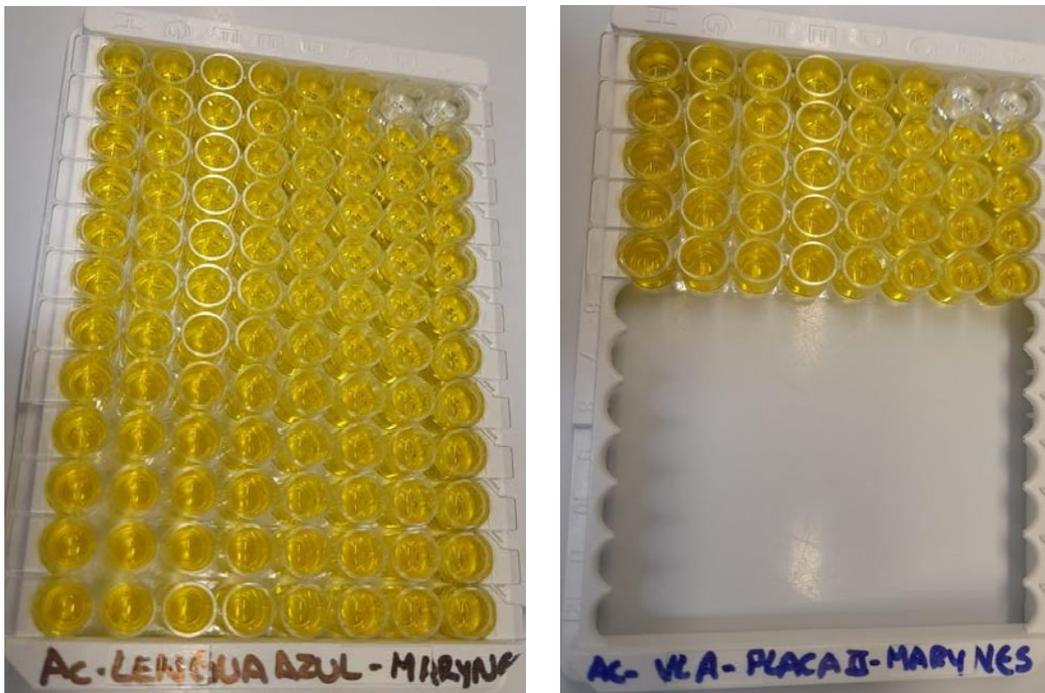
Imagen 2. Preparación del conjugado 1X diluyendo el conjugado 10X con diluyente 2 (1/10).



Imagen 5. Incubación en condiciones de oscuridad de la microplaca en una incubadora.



Imagen 6. Resultados cualitativos a anticuerpos contra el virus lengua azul.



Fotografía 7. Almacenamiento de muestras de sangre en la congeladora a -80°C .

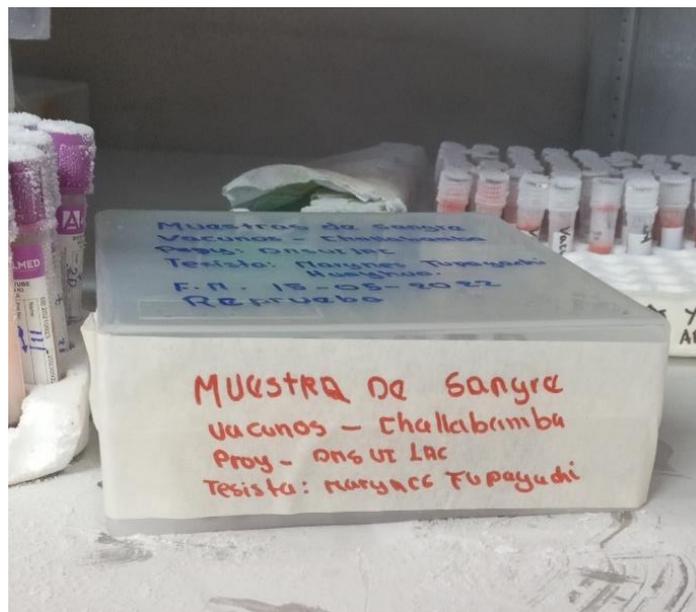


Imagen 8. Esterilización de materiales para utilizar en la técnica de PCR.

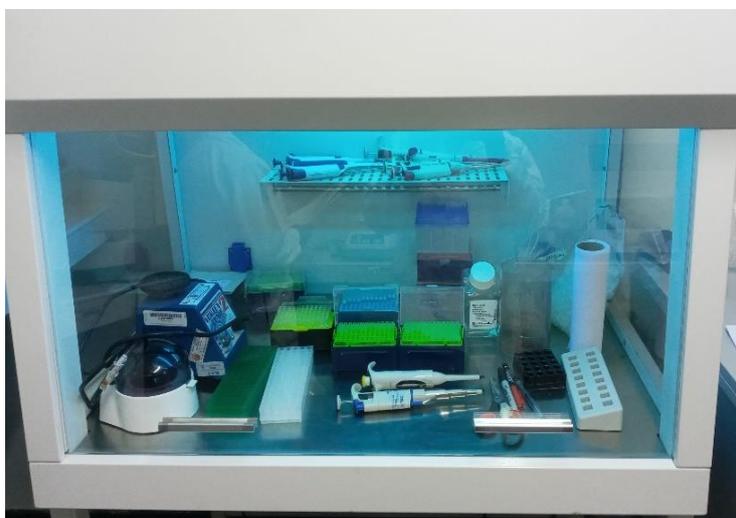


Imagen 9. Kit de extracción de ARN.

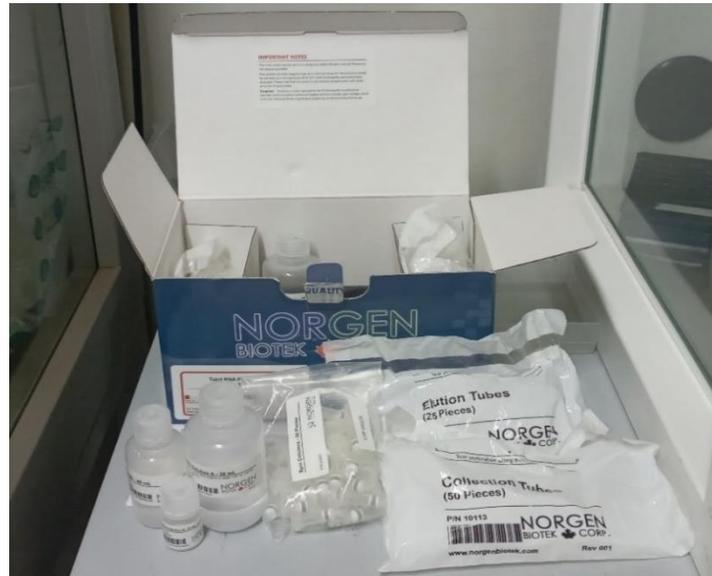


Imagen 10. Homogenización de las muestras de sangre para ser extraídas.



Imagen 11. Kit de RT-qPCR de amplificación de VLA.

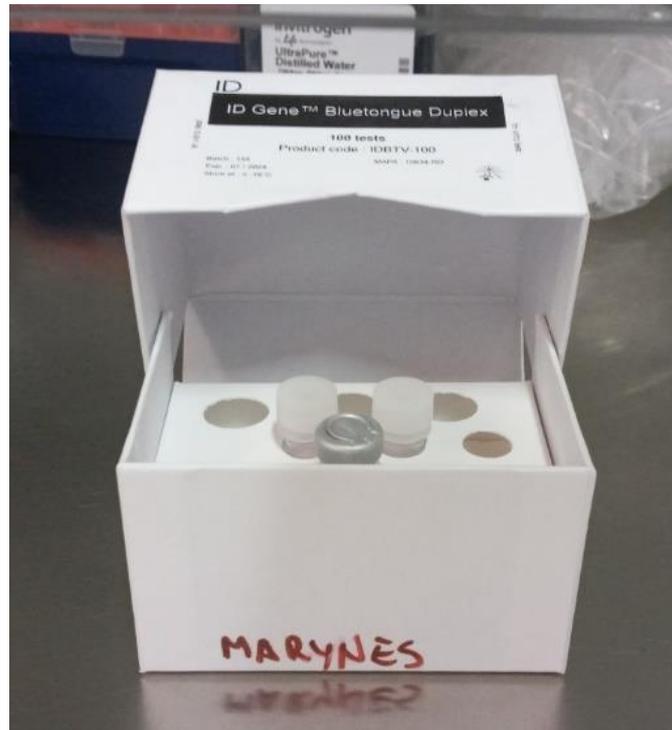


Imagen 12. Colocación de tiras de PCR en el termociclador de acuerdo a las posiciones correspondientes

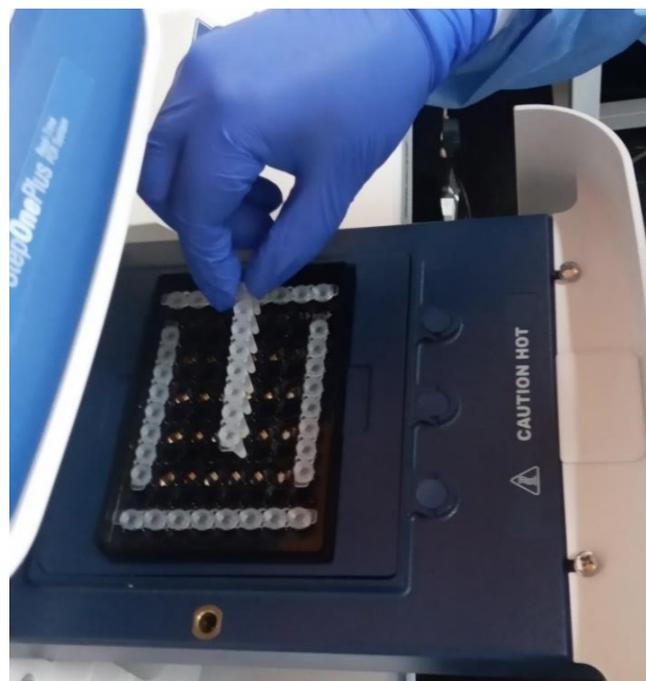


Imagen 13. Curva de amplificación del control positivo (CP BTV).

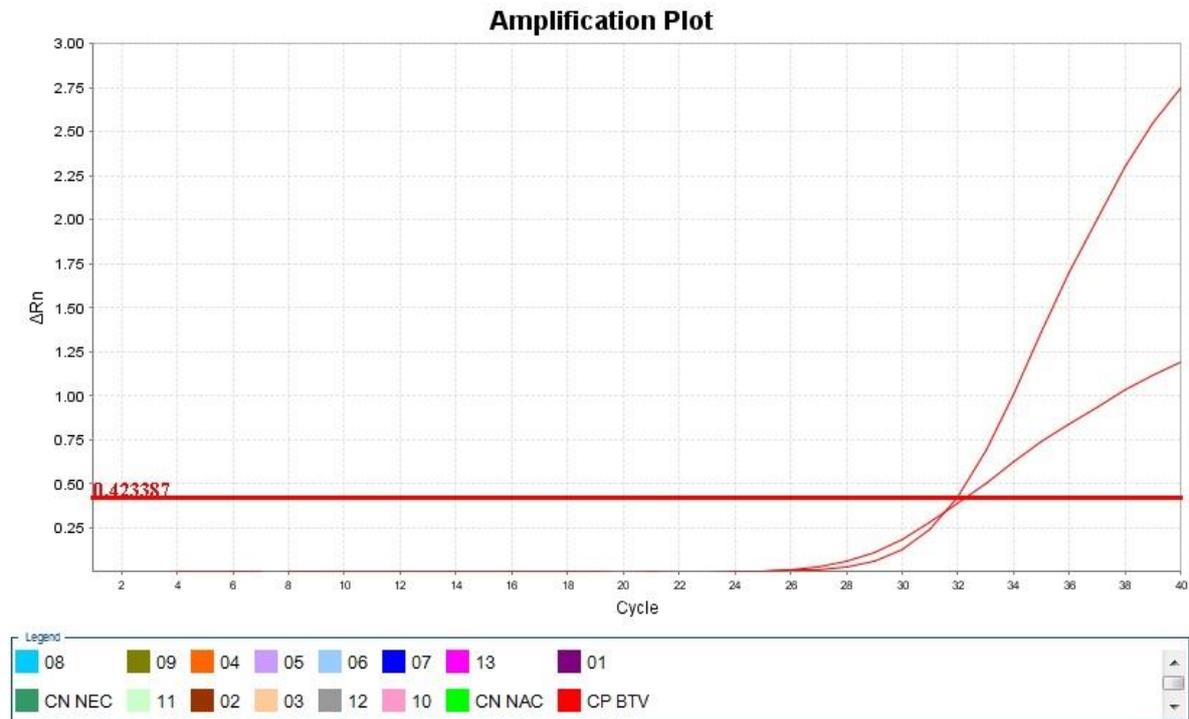


Imagen 15. Controles negativos (CN NEC / CN NAC) que no amplificaron para el virus ni para el control endógeno.

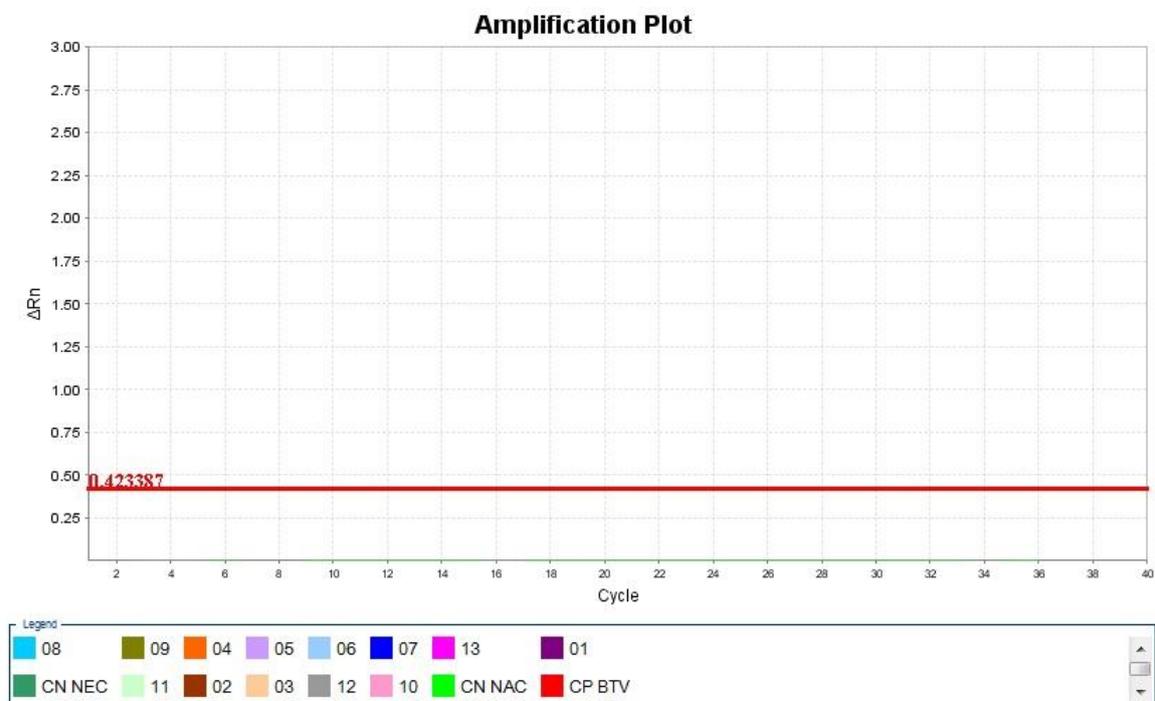


Imagen 14 Curva de amplificación del control endógeno de la muestra 01.

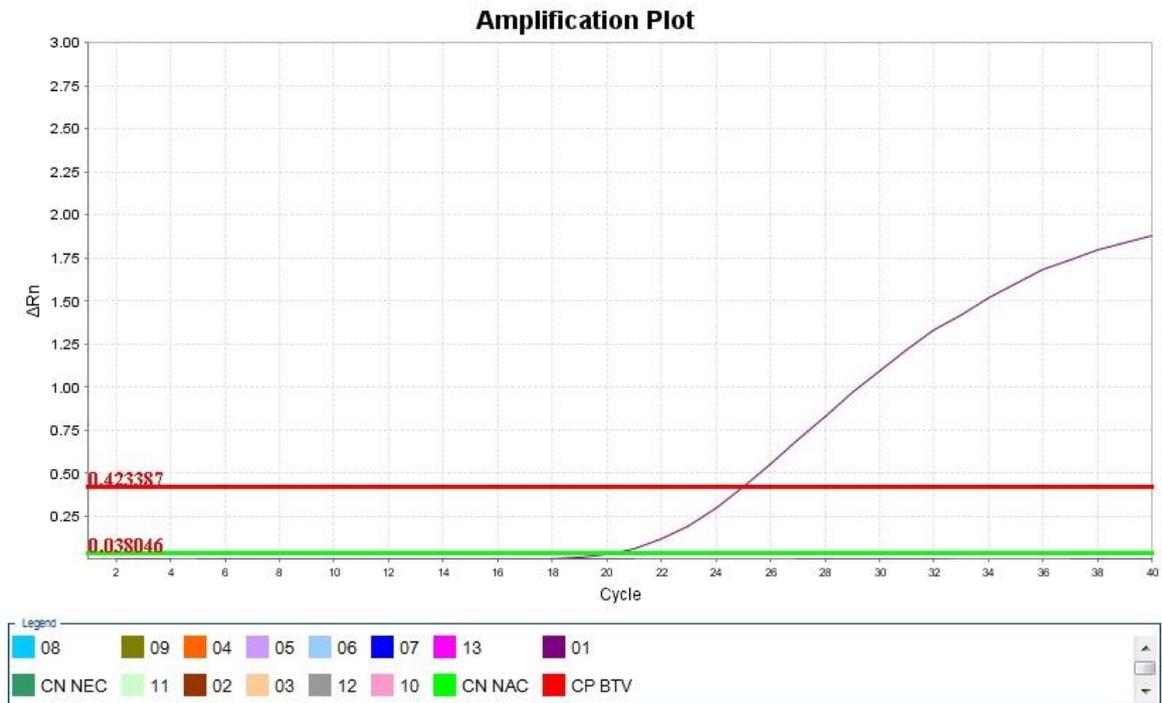


Imagen 16. Curva de amplificación del control endógeno de la muestra 02.

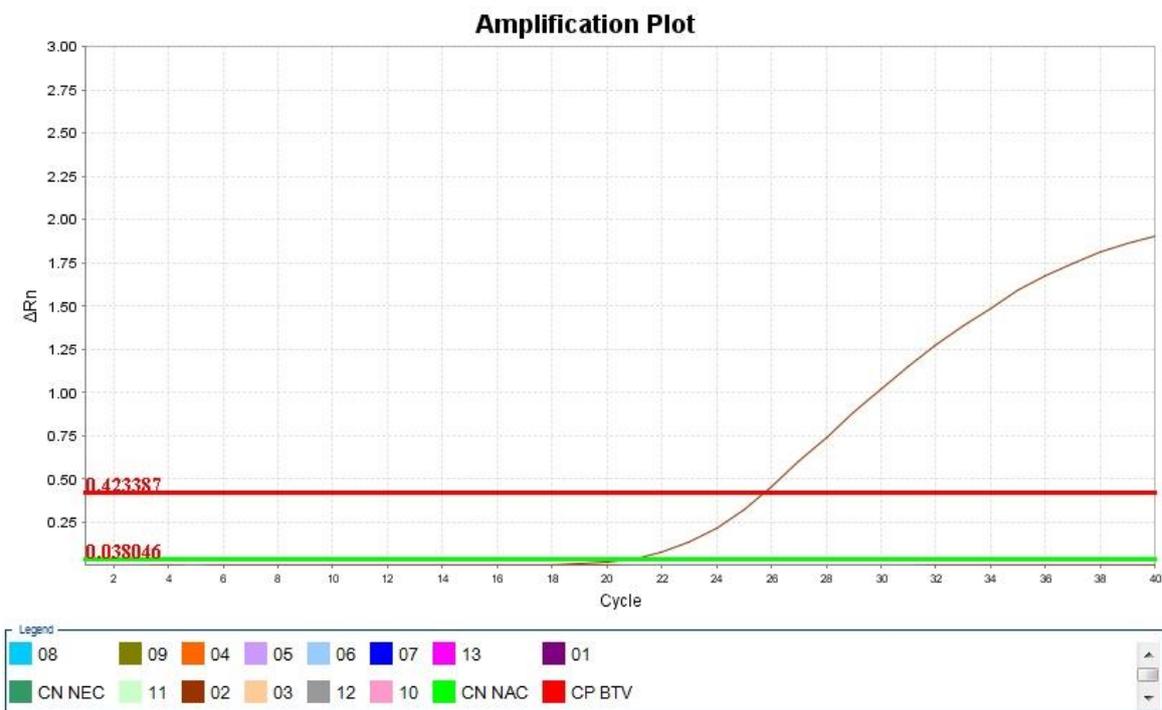


Imagen 17. Curva de amplificación del control endógeno de la muestra 03.

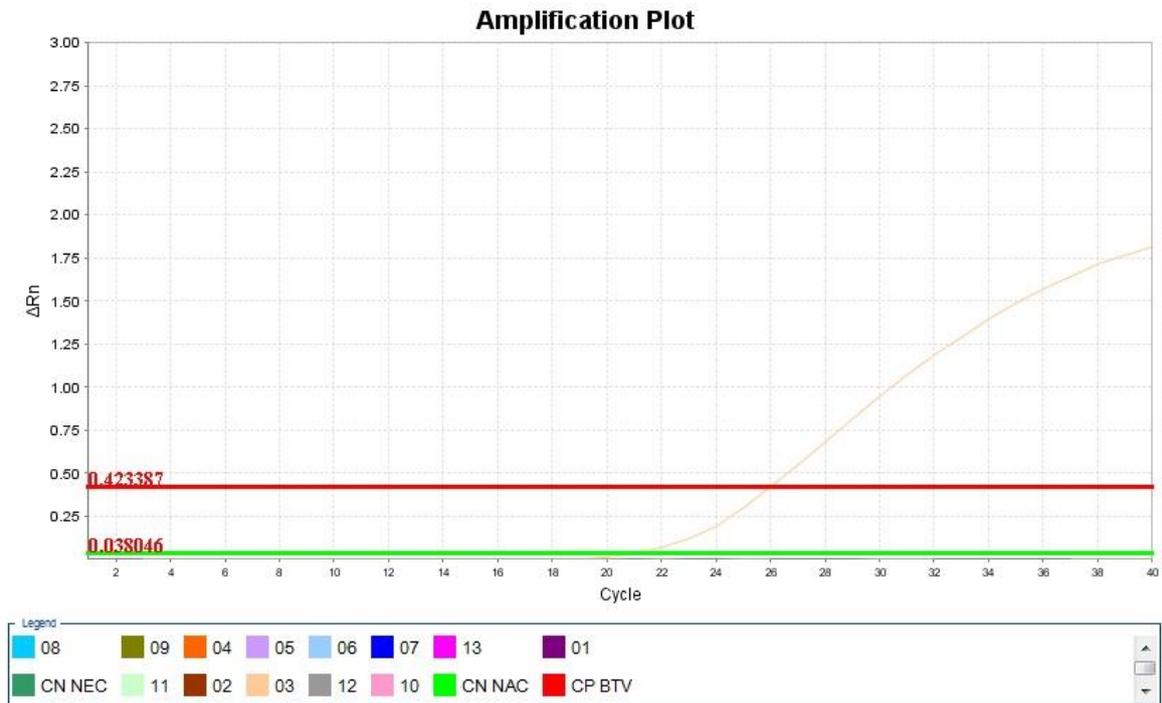


Imagen 19. Curva de amplificación del control endógeno de la muestra 04.

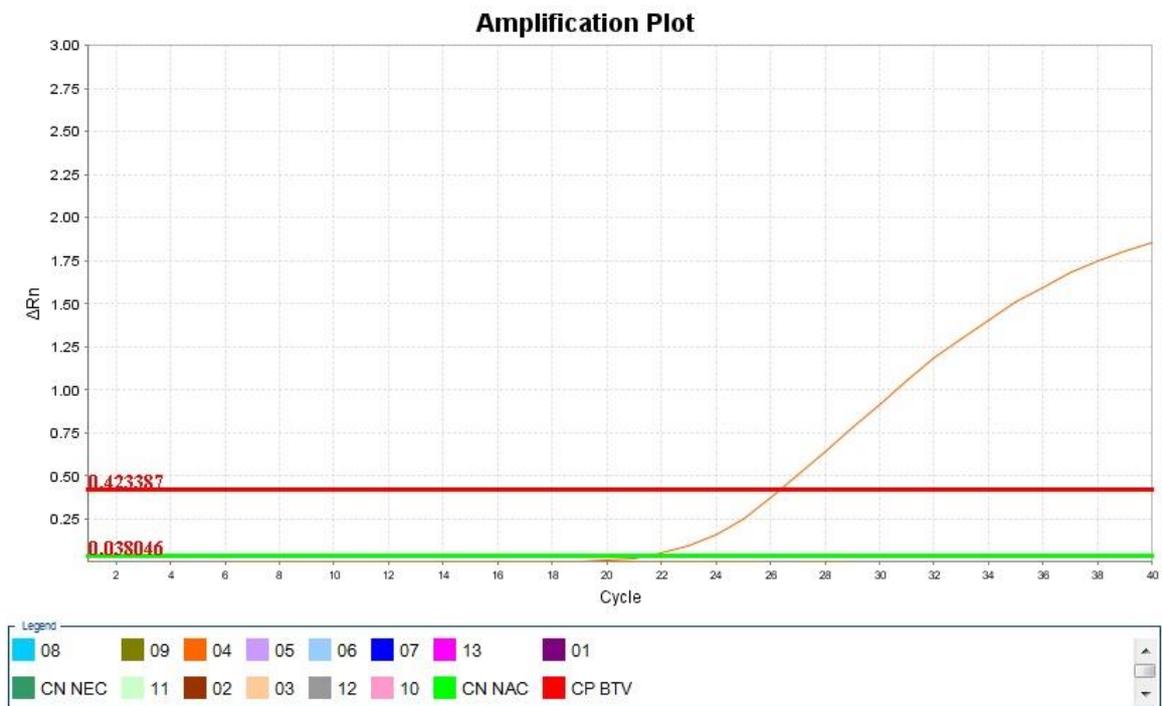


Imagen 18. Curva de amplificación del control endógeno de la muestra 05.

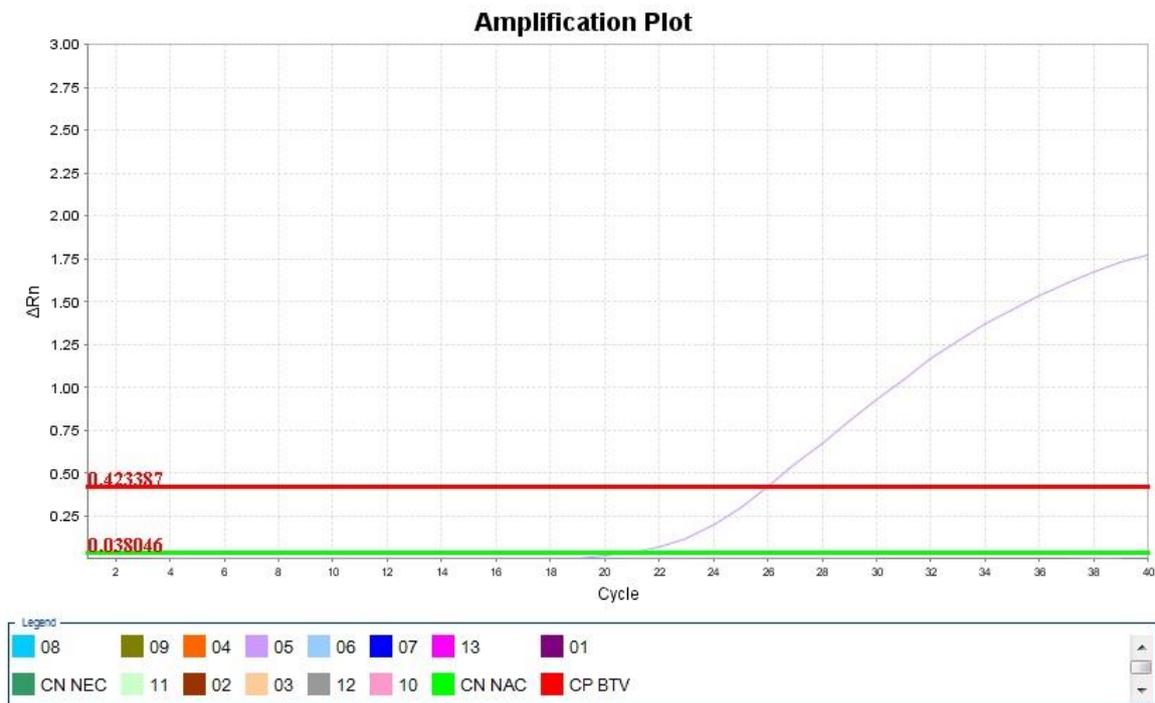


Imagen 20. Curva de amplificación del control endógeno de la muestra 06.

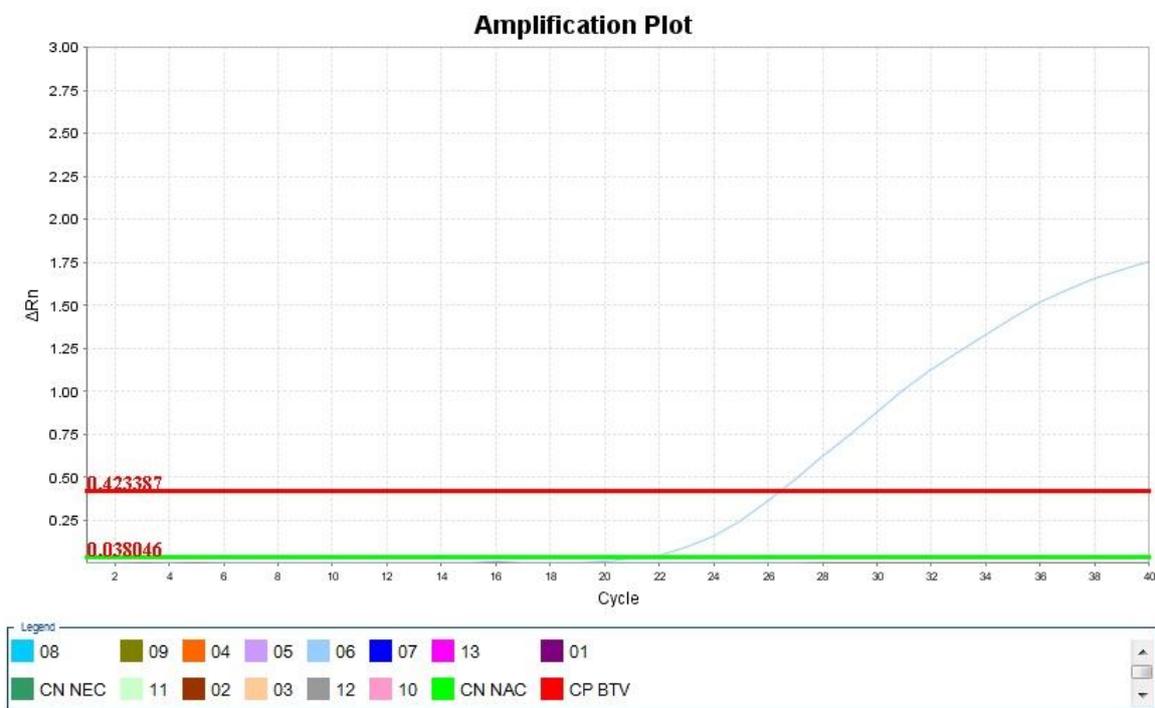


Imagen 21. Curva de amplificación del control endógeno de la muestra 07.

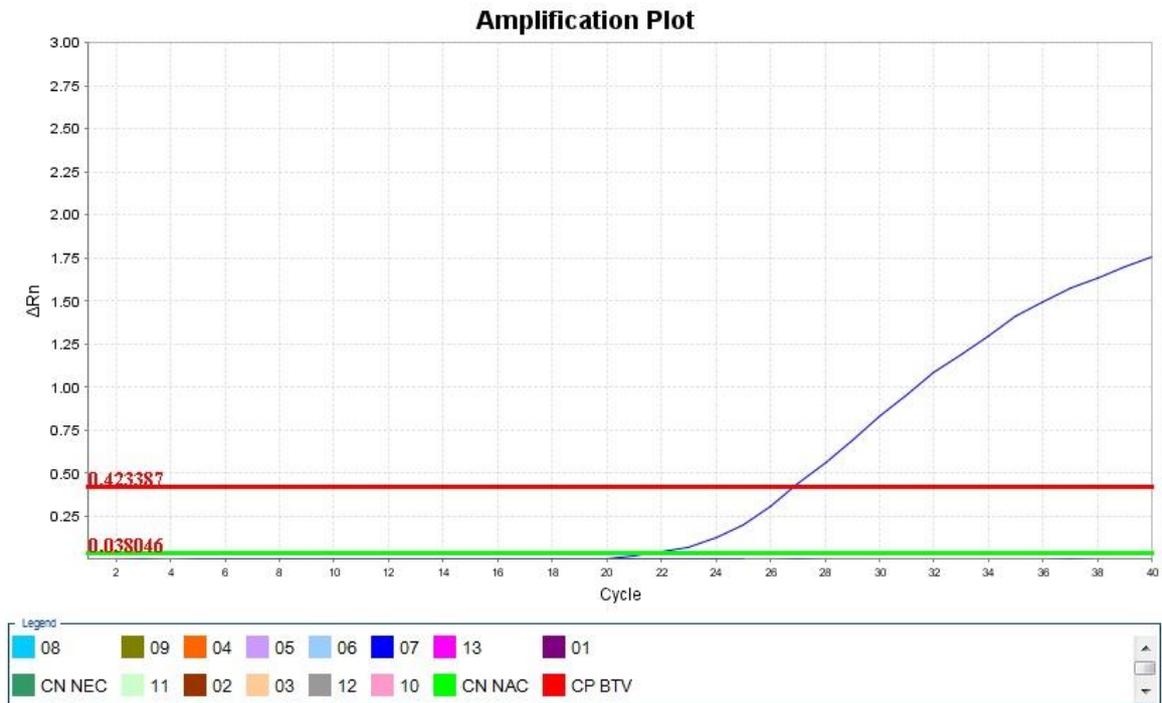


Imagen 23. Curva de amplificación del control endógeno de la muestra 08.

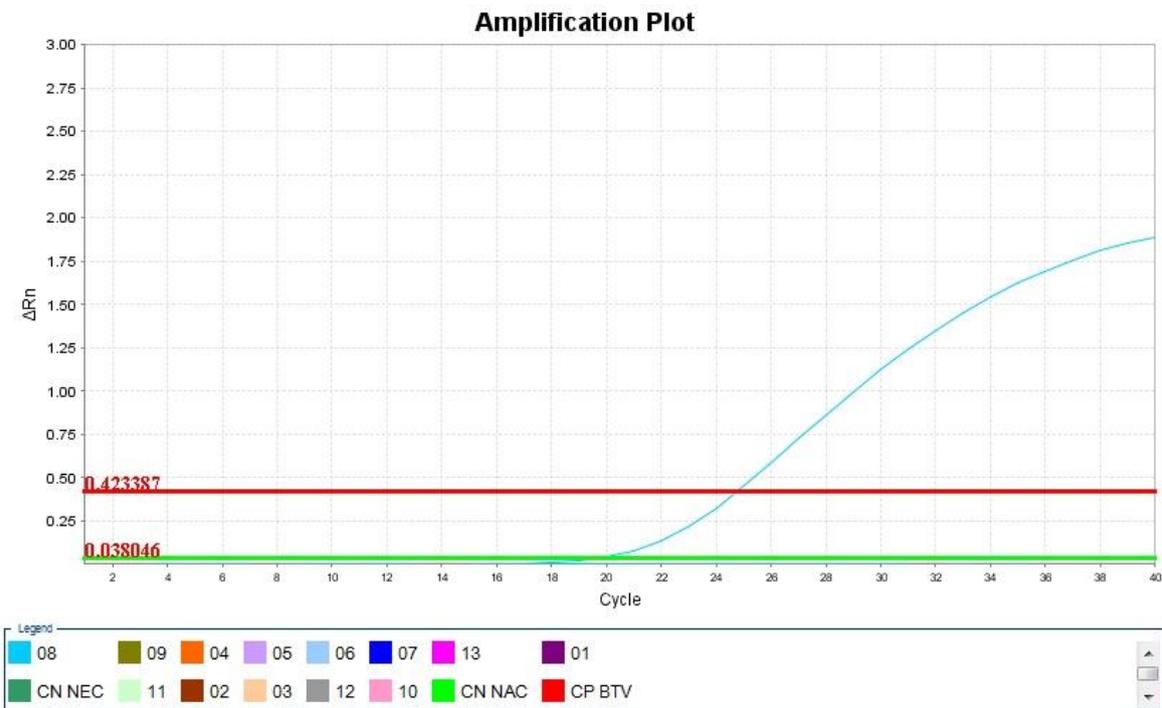


Imagen 22. Curva de amplificación del control endógeno de la muestra 09.

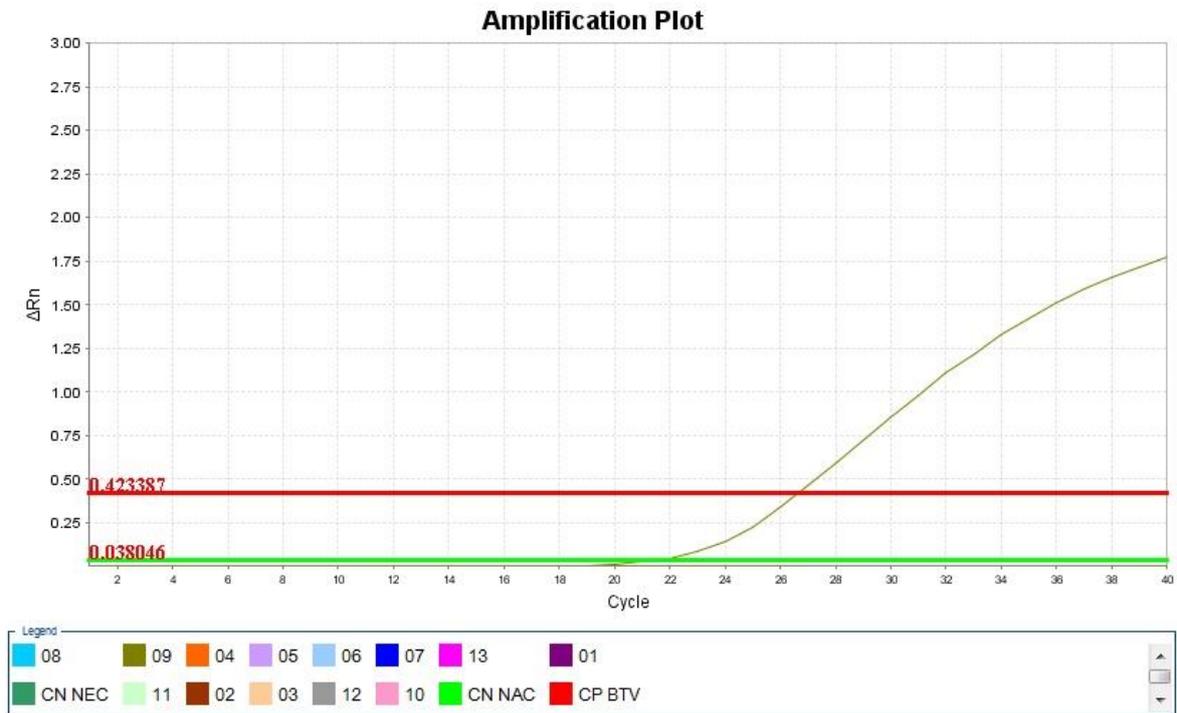


Imagen 24. Curva de amplificación del control endógeno de la muestra 10.

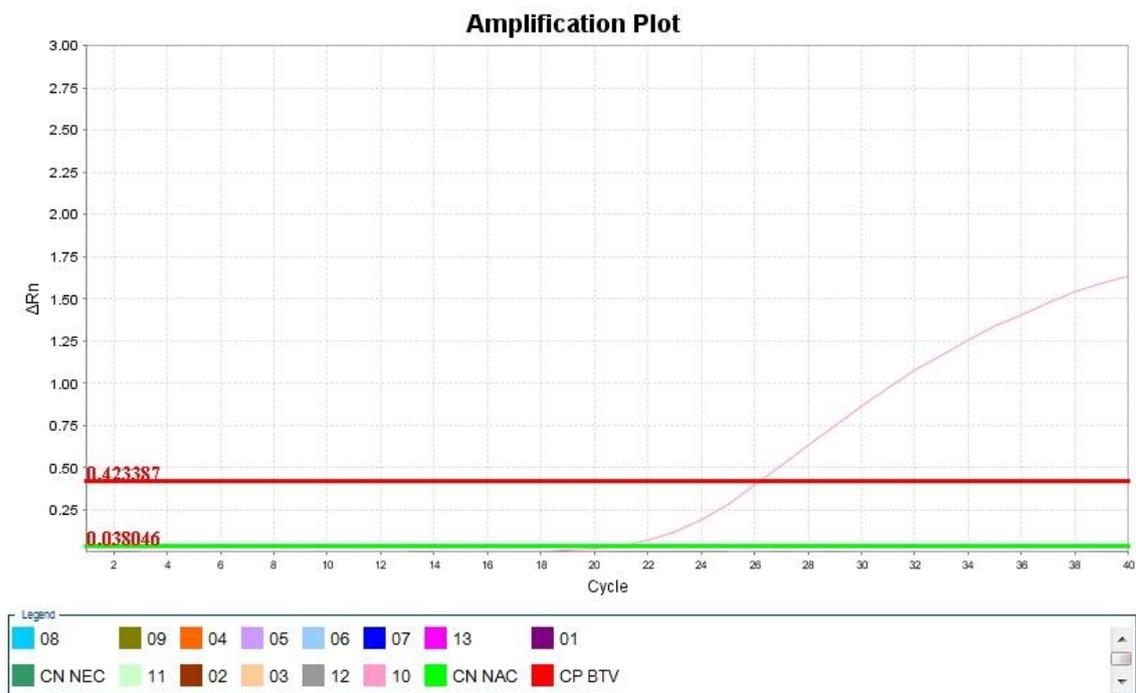


Imagen 25. Curva de amplificación del control endógeno de la muestra 11.

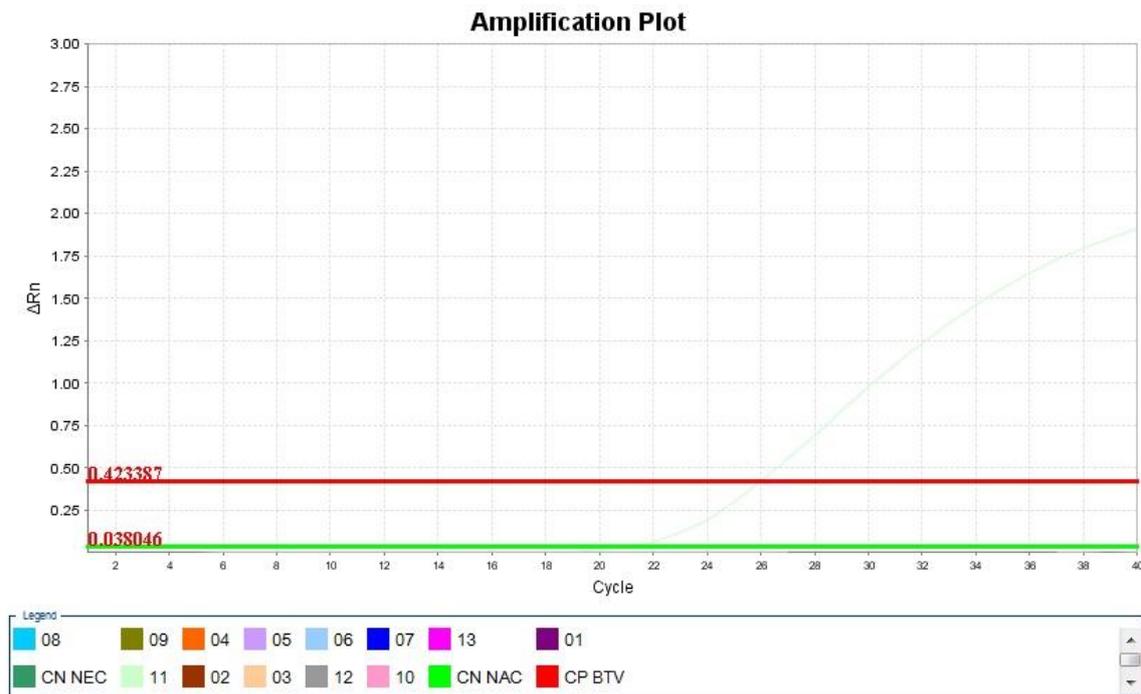


Imagen 27. Curva de amplificación del control endógeno de la muestra 12.

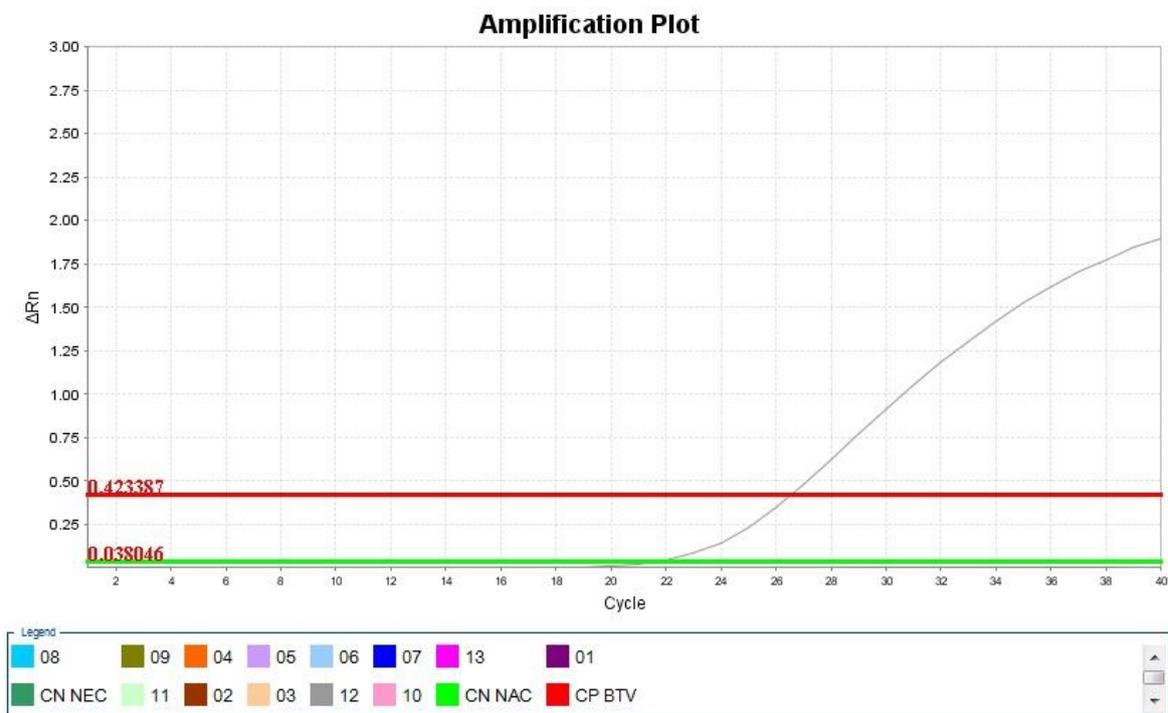


Imagen 26. Curva de amplificación del control endógeno de la muestra 13.

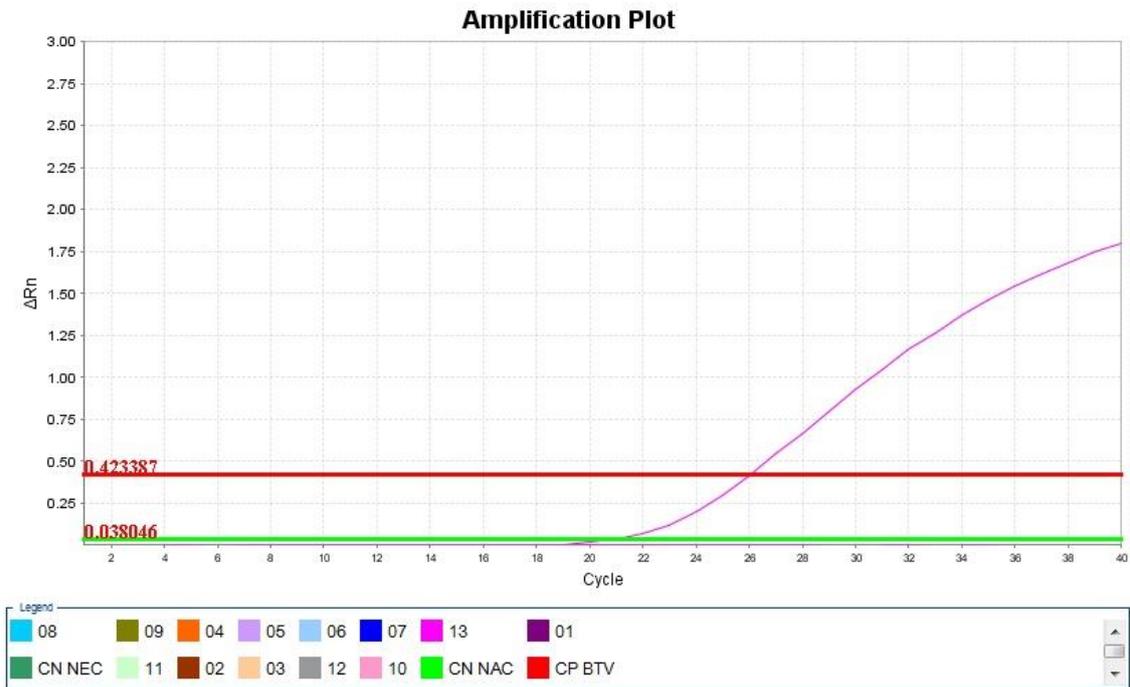
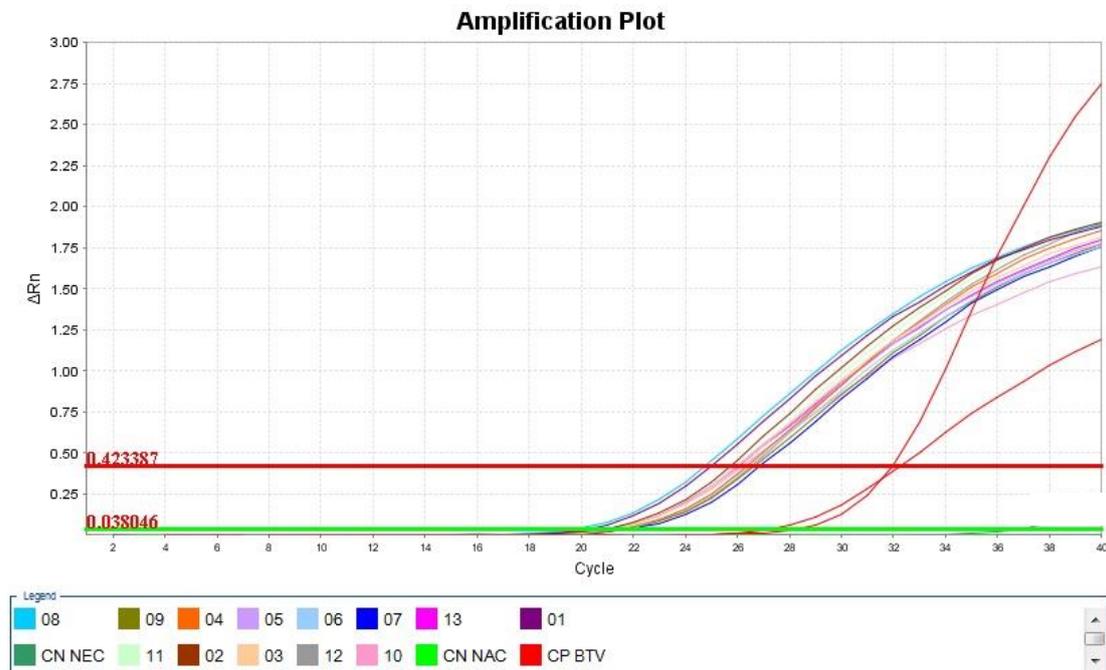


Imagen 28. Curvas de amplificación de los controles endógenos de las 13 muestras y los controles.



Anexo 3. Resultados de diagnóstico de anticuerpos contra el VLA en vacunos del distrito de Challabamba.

N°	Comunidad	Nombre del propietario	Código de muestra	N° de arete / nombre	Raza	Sexo	Categorías	DO	%S/N	Diagnóstico
1	Macllaypata	Propietario 1	01 ^a	Panchito	Brown Swiss	M	Ternero	2.406	119.97	Negativo
2	Macllaypata	Propietario 1	02 ^a	3530	Brown Swiss	H	Vaquillona	1.933	96.38	Negativo
3	Macllaypata	Propietario 1	03 ^a	3531	Brown Swiss	H	Tenera	2.048	102.12	Negativo
4	Macllaypata	Propietario 1	04 ^a	3527	Brown Swiss	M	Torete	1.728	86.16	Negativo
5	Macllaypata	Propietario 1	05 ^a	3529	Brown Swiss	H	Vaca	1.986	100.18	Negativo
6	Macllaypata	Propietario 1	06 ^a	3320	Brown Swiss	M	Torete	1.704	85.95	Negativo
7	Macllaypata	Propietario 2	07 ^a	3698	Brown Swiss	H	Vaca	1.884	93.94	Negativo
8	Macllaypata	Propietario 3	08 ^a	3398	Hibrido	M	Ternero	2.007	100.07	Negativo
9	Macllaypata	Propietario 3	09 ^a	3396	Hibrido	H	Vaca	2.052	102.32	Negativo
10	Macllaypata	Propietario 3	010 ^a	3395	Brown Swiss	M	Torete	1.656	82.57	Negativo
11	Macllaypata	Propietario 3	011 ^a	3399	Brown Swiss	M	Toro	1.855	92.50	Negativo
12	Macllaypata	Propietario 3	012 ^a	3312	Hibrido	M	Ternero	1.559	77.74	Negativo
13	Macllaypata	Propietario 3	013 ^a	3400	Brown Swiss	H	Vaquillona	2.124	105.91	Negativo
14	Macllaypata	Propietario 3	014 ^a	3393	Holstein	H	Vaquillona	1.926	96.04	Negativo
15	Macllaypata	Propietario 3	015 ^a	3391	Brown Swiss	H	Vaca	2.152	107.30	Negativo
16	Macllaypata	Propietario 3	016 ^a	3392	Brown Swiss	H	Vaquillona	2.068	103.12	Negativo
17	Macllaypata	Propietario 4	017 ^a	3303	Brown Swiss	M	Torete	2.269	113.14	Negativo
18	Macllaypata	Propietario 4	018 ^a	P'acla	Brown Swiss	M	Torete	1.892	94.34	Negativo
19	Macllaypata	Propietario 4	019 ^a	3307	Brown Swiss	H	Vaca	1.846	92.05	Negativo
20	Macllaypata	Propietario 4	020 ^a	3304	Brown Swiss	M	Torete	1.958	97.63	Negativo

N°	Comunidad	Nombre del propietario	Código de muestra	N° de arete / nombre	Raza	Sexo	Categorías	DO	%S/N	Diagnóstico
21	Macllaypata	Propietario 4	021 ^a	3309	Brown Swiss	H	Vaca	1.711	85.32	Negativo
22	Macllaypata	Propietario 4	022 ^a	3308	Brown Swiss	H	Tenera	2.063	102.87	Negativo
23	Mojopata	Propietario 5	023 ^a	3383	Brown Swiss	H	Vaca	1.965	97.98	Negativo
24	Mojopata	Propietario 5	024 ^a	3376	Holstein	H	Vaca	1.869	93.19	Negativo
25	Mojopata	Propietario 5	025 ^a	3382	Holstein	H	Vaca	1.903	94.89	Negativo
26	Mojopata	Propietario 5	026 ^a	3375/Yola	Brown Swiss	H	Vaca	2.022	100.82	Negativo
27	Mojopata	Propietario 5	027 ^a	3374	Brown Swiss	H	Vaca	1.978	98.63	Negativo
28	Mojopata	Propietario 5	028 ^a	76	Simmental	M	Ternero	1.811	90.30	Negativo
29	Mojopata	Propietario 5	029 ^a	3384	Hibrido	H	Vaquillona	2.019	100.67	Negativo
30	Mojopata	Propietario 5	030 ^a	3381	Hibrido	H	Vaquillona	1.87	93.24	Negativo
31	Mojopata	Propietario 5	031 ^a	3379	Hibrido	M	Ternero	2.262	112.79	Negativo
32	Mojopata	Propietario 5	032 ^a	3378	Brown Swiss	H	Tenera	1.898	94.64	Negativo
33	Mojopata	Propietario 5	033 ^a	3693	Brown Swiss	H	Vaca	1.668	83.17	Negativo
34	Mojopata	Propietario 5	034 ^a	3692	Brown Swiss	M	Ternero	1.895	94.49	Negativo
35	Inkilpata	Propietario 6	035 ^a	2941	Brown Swiss	H	Vaquillona	1.893	94.39	Negativo
36	Inkilpata	Propietario 6	036 ^a	2947	Criollo	H	Tenera	1.442	71.90	Negativo
37	Inkilpata	Propietario 6	037 ^a	2938	Criollo	M	Ternero	2.093	104.36	Negativo
38	Inkilpata	Propietario 6	038 ^a	2939	Criollo	H	Vaca	1.797	89.60	Negativo
39	Inkilpata	Propietario 6	039 ^a	2946	Criollo	H	Tenera	1.656	82.57	Negativo
40	Inkilpata	Propietario 6	040 ^a	2942	Brown Swiss	M	Toro	1.743	86.91	Negativo
41	Inkilpata	Propietario 6	041 ^a	2944	Brown Swiss	H	Vaquillona	1.668	83.17	Negativo
42	Inkilpata	Propietario 6	042 ^a	2943	Criollo	H	Vaca	1.831	91.30	Negativo
43	Inkilpata	Propietario 6	043 ^a	2940	Brown Swiss	M	Toro	1.44	71.80	Negativo
44	Mojopata	Propietario 7	044 ^a	2799	Holstein	H	Vaca	1.703	84.92	Negativo
45	Mojopata	Propietario 7	045 ^a	2797	Brown Swiss	H	Tenera	1.956	97.53	Negativo

N°	Comunidad	Nombre del propietario	condigo de muestra	N° de arete / nombre	Raza	Sexo	Categorías	DO	%S/N	Diagnóstico
46	Mojopata	Propietario 7	046 ^a	2802	Holstein	H	Vaca	1.625	81.03	Negativo
47	Mojopata	Propietario 7	047 ^a	2798	Holstein	H	Vaca	1.778	88.66	Negativo
48	Mojopata	Propietario 7	048 ^a	3803	Holstein	M	Torete	1.988	99.13	Negativo
49	Mojopata	Propietario 7	049 ^a	2801	Hibrido	H	Tenera	1.94	96.73	Negativo
50	Mojopata	Propietario 8	050 ^a	2813	Simmental	H	Vaca	1.607	80.13	Negativo
51	Mojopata	Propietario 8	051 ^a	2814	Brown Swiss	H	Vaca	1.938	96.63	Negativo
52	Mojopata	Propietario 8	052 ^a	2811	Simmental	H	Vaquillona	2.09	104.21	Negativo
53	Mojopata	Propietario 8	053 ^a	2812	Hibrido	H	Vaquillona	1.229	61.28	Negativo
54	Sunchubamba	Propietario 9	01B	2404	Brown Swiss	H	Vaca	1.82	90.75	Negativo
55	Sunchubamba	Propietario 9	02B	Cuernuda	Holstein	H	Vaca	1.933	96.38	Negativo
56	Sunchubamba	Propietario 10	03B	Carla	Holstein	H	Vaca	1.692	84.37	Negativo
57	Sunchubamba	Propietario 10	04B	Carlitos	Brown Swiss	M	Ternero	1.975	98.48	Negativo
58	Sunchubamba	Propietario 11	05B	2524	Hibrido	H	Tenera	1.557	77.64	Negativo
59	Sunchubamba	Propietario 11	06B	2525	Brown Swiss	H	Vaca	1.799	89.70	Negativo
60	Sunchubamba	Propietario 11	07B	2523	Brown Swiss	H	Vaca	1.884	93.94	Negativo
61	Sunchubamba	Propietario 11	08B	2529	Hibrido	M	Ternero	1.806	90.05	Negativo
62	Sunchubamba	Propietario 11	09B	2521	Brown Swiss	M	Ternero	1.947	97.08	Negativo
63	Sunchubamba	Propietario 11	10B	Maniziz	Hibrido	M	Ternero	1.901	94.79	Negativo
64	Sunchubamba	Propietario 11	11B	2522	Brown Swiss	H	Vaquillona	1.931	96.29	Negativo
65	Sunchubamba	Propietario 11	12B	2527	Hibrido	H	Vaca	1.846	92.05	Negativo
66	Sunchubamba	Propietario 11	13B	2530	Hibrido	H	Tenera	0.700	35.80	Positivo
67	Sunchubamba	Propietario 11	14B	2528	Simmental	M	Torete	1.891	94.29	Negativo
68	Sunchubamba	Propietario 12	15B	1808	Simmental	M	Toro	1.917	95.59	Negativo
69	Sunchubamba	Propietario 12	16B	Sin	Brown Swiss	H	Tenera	1.684	83.97	Negativo
70	Sunchubamba	Propietario 12	17B	Doble pecho	Brown Swiss	M	Ternero	1.845	92.00	Negativo

Nº	Comunidad	Nombre del propietario	Código de muestra	Nº de arete / nombre	Raza	Sexo	Categorías	DO	%S/N	Diagnóstico
71	Sunchubamba	Propietario 13	18B	Florita	Brown Swiss	H	Vaquillona	1.724	85.96	Negativo
72	Sunchubamba	Propietario 13	19B	Beatriz	Holstein	H	Vaquillona	2	99.73	Negativo
73	Sunchubamba	Propietario 13	20B	Santusa	Holstein	H	Vaca	1.648	82.17	Negativo
74	Sunchubamba	Propietario 14	21B	Alcides	Brown Swiss	M	Ternero	1.083	54.00	Negativo
75	Sunchubamba	Propietario 15	22B	Lizbet	Brown Swiss	H	Vaquillona	1.906	95.04	Negativo
76	Sunchubamba	Propietario 15	23B	Yesi	Brown Swiss	H	Vaca	1.933	96.38	Negativo
77	Sunchubamba	Propietario 16	24B	2412	Brown Swiss	H	Vaca	1.795	89.50	Negativo
78	Sunchubamba	Propietario 16	25B	2411	Brown Swiss	H	Vaca	2.007	100.07	Negativo
79	Sunchubamba	Propietario 16	26B	2413	Jersey	H	Vaca	1.806	90.05	Negativo
80	Sunchubamba	Propietario 16	27B	2421	Brown Swiss	H	Ternera	2.181	108.75	Negativo
81	Sunchubamba	Propietario 16	28B	2420	Hibrido	H	Vaquillona	2.148	107.11	Negativo
82	Sunchubamba	Propietario 16	29B	2414	Jersey	H	Vaca	1.621	80.83	Negativo
83	Sunchubamba	Propietario 16	30B	Linda	Criollo	H	Ternera	1.979	98.68	Negativo
84	Sunchubamba	Propietario 16	31B	2416	Brown Swiss	M	Toro	2.115	105.46	Negativo
85	Sunchubamba	Propietario 16	32B	Perpetua	Brown Swiss	H	Ternera	2.065	102.97	Negativo
86	Sunchubamba	Propietario 16	33B	2415	Brown Swiss	M	Toro	2.166	108.00	Negativo
87	Sunchubamba	Propietario 17	34B	3759	Brown Swiss	H	Vaca	2.184	108.90	Negativo
88	Sunchubamba	Propietario 17	35B	Eli	Hibrido	H	Ternera	2.476	123.46	Negativo
89	Sunchubamba	Propietario 17	36B	Dominga	Hibrido	H	Vaca	2.002	99.83	Negativo
90	Chacllababa baja	Propietario 18	37B	3822	Brown Swiss	H	Vaquillona	1.624	80.98	Negativo
91	Chacllababa baja	Propietario 18	38B	5800	Criollo	H	Vaquillona	1.804	89.95	Negativo
92	Chacllababa baja	Propietario 18	39B	3821	Criollo	H	Vaquillona	1.813	90.40	Negativo
93	Chacllababa baja	Propietario 18	40B	5799	Criollo	M	Torete	1.989	99.18	Negativo
94	Chacllababa baja	Propietario 18	41B	3824	Criollo	H	Vaca	1.912	95.34	Negativo
95	Chacllababa baja	Propietario 18	42B	3835	Criollo	H	Vaca	1.629	82.17	Negativo

N°	Comunidad	Nombre del propietario	Código de muestra	N° de arete / nombre	Raza	Sexo	Categorías	DO	%S/N	Diagnóstico
96	Chacllababa baja	Propietario 18	43B	3802	Brown Swiss	H	Vaquillona	1.813	91.45	Negativo
97	Chacllababa baja	Propietario 18	44B	3798	Criollo	H	Vaca	1.954	98.56	Negativo
98	Chacllababa baja	Propietario 18	45B	3797	Criollo	H	Vaca	2.053	103.56	Negativo
99	Chacllababa baja	Propietario 18	46B	3804	Brown Swiss	H	Vaca	2.109	106.38	Negativo
100	Chacllababa baja	Propietario 19	47B	3810	Brown Swiss	M	Torete	2.17	109.46	Negativo
101	Chacllababa baja	Propietario 19	48B	3805	Brown Swiss	M	Torete	2.108	106.33	Negativo
102	Chacllababa baja	Propietario 19	49B	3808	Brown Swiss	M	Ternero	2.217	111.83	Negativo
103	Chacllababa baja	Propietario 20	50B	3825	Brown Swiss	M	Torete	2.135	107.69	Negativo
104	Chacllababa baja	Propietario 20	51B	3830	Hibrido	M	Ternero	2.314	116.72	Negativo
105	Chacllababa baja	Propietario 20	52B	3832	Brown Swiss	M	Ternero	2.172	109.56	Negativo
106	chacllababa alta	Propietario 21	53B	5788	Criollo	H	Vaca	1.639	82.67	Negativo
107	chacllababa alta	Propietario 21	54B	5784	Criollo	H	Vaca	2.012	101.49	Negativo
108	chacllababa alta	Propietario 21	55B	5793	Criollo	H	Vaca	2.095	105.67	Negativo
109	chacllababa alta	Propietario 21	56B	5781	Criollo	M	Toro	1.979	99.82	Negativo
110	chacllababa alta	Propietario 21	57B	5788	Criollo	H	Vaca	2.26	114.00	Negativo
111	chacllababa alta	Propietario 22	58B	5787	Criollo	H	Vaca	1.967	99.22	Negativo
112	chacllababa alta	Propietario 22	59B	5798	Criollo	H	Ternera	2.25	113.49	Negativo
113	chacllababa alta	Propietario 22	60B	5792	Criollo	H	Ternera	2.361	119.09	Negativo
114	chacllababa alta	Propietario 22	61B	5791	Criollo	H	Ternera	2.347	118.39	Negativo
115	chacllababa alta	Propietario 22	62B	5796	Criollo	M	Ternero	2.32	117.02	Negativo
116	chacllababa alta	Propietario 22	63B	5797	Criollo	H	Ternera	2.191	110.52	Negativo
117	chacllababa alta	Propietario 22	64B	5782	Criollo	M	Toro	2.174	109.66	Negativo
118	chacllababa alta	Propietario 23	65B	5790	Brown Swiss	M	Ternero	2.271	114.55	Negativo
119	chacllababa alta	Propietario 23	66B	5783	Brown Swiss	H	Vaca	2.073	104.56	Negativo

Anexo 5. Plantilla de ubicación de las muestras en la placa ELISA competitiva.

Nombre de prueba.....

Tesista o investigador.....

Procedencia de la muestra

Tipo de muestra.....Especie..... Fecha.....

Procedencia del kit.....

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Primera incubación.....

Segunda incubación.....

Tercera incubación.....

