

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD  
DEL CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA**



**“IDENTIFICACIÓN DEL GENOTIPO DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL  
BOVINA (VDVB) EN VACAS DE LA PAMPA DE ANTA – CUSCO”**

Tesis presentada por la Bachiller en  
Ciencias Agrarias:

**MILAGROS CENTENO FLORES,**

Para optar al título profesional de

**INGENIERO ZOOTECNISTA**

**ASESORES:**

**M.V.Z. EDGAR ALBERTO VALDEZ  
GUTIÉRREZ**

**ING. ZOOT. FIORELA KATTERINE  
FERNÁNDEZ BUSTINZA**

**“PATROCINADOR:** Proyecto “Evaluación de la Eficiencia Reproductiva en  
Vacas de la Pampa de Anta VIA CANON - UNSAAC”

**K´AYRA - 2018**

## DEDICATORIA

A dios por haberme brindado salud y felicidad, para poder alcanzar a una de las más grandes metas trazadas en mi vida.

Con todo mi amor y respeto a mis padres por siempre haberme brindado felicidad, por el amor que me dan y sobre todo por el apoyo incondicional para poder alcanzar uno de mis mayores sueños, por las palabras de aliento, llamadas de atención, los consejos y nunca haberme dejado sola, por haber hecho de mí una persona de bien.

PAPÁ LEONCIO Y MAMÁ DEMETRIA.

A mis hermanos quienes son mis compañeros de locuras y alegrías, quienes siempre me motivaron a continuar a pesar de los obstáculos, por la confianza que depositaron en mí.

WILSON, FREDY, CINTHYA, WILMAR

A mis amigos, compañeros incondicionales quienes siempre me apoyaron, estuvieron conmigo en los buenos y malos momentos, por siempre haberme impulsado a seguir, por no dejar que me rinda, por haberme permitido entrar a sus vidas y dejarme vivir tantos bellos momentos, por tantas locuras, anécdotas que vivimos.

ALEXANDRA, MARGOT, JENNY, CRISTIAN

A mis amigas, compañeras del laboratorio por haberme permitido entrar a este hermoso mundo de la sanidad, por los consejos, por las aventuras vividas, por la comprensión y confianza depositaron en mí.

IORELA, YAMILET

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco que hizo realidad mis sueños y aspiraciones.

A la facultad de Ciencias Agrarias por haberme brindado la oportunidad de formar parte de esta hermosa familia académica y así pudiendo lograr una profesión digna.

A todos mis docentes de la escuela profesional de zootecnia por compartir sus valiosos conocimientos en sus enseñanzas durante mi formación académica.

Mi especial reconocimiento al proyecto de investigación “Evaluación de la Eficiencia Reproductiva en Vacas de la Pampa de Anta VIA CANON – UNSAAC”, por el financiamiento brindado para la ejecución de este proyecto de investigación.

Mi especial gratitud a mi asesor el M.V.Z. Edgar Alberto Valdez Gutiérrez, quien con su comprensión, su apoyo incondicional, confianza que me brindo, conocimientos compartidos y sobre todo por el asesoramiento en la ejecución del presente trabajo de investigación.

Mi especial gratitud a mi asesora Ing. Zoot. Fiorela Katterine Fernández Bustinza, por el apoyo incondicional, por los conocimientos compartidos y sobre todo por el asesoramiento en la ejecución del presente trabajo de investigación.

A todos mis amigos y compañeros con los que compartí tantos bellos momentos durante mi formación académica, gracias a cada uno, por ayudarme a crecer como persona y por la amistad que me brindaron.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>CAPITULO I.....</b>	<b>5</b>
<b>OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>5</b>
1.1. OBJETIVOS .....	5
1.1.1. Objetivo general.....	5
1.1.2. Objetivo específico.....	5
1.2. JUSTIFICACIÓN .....	6
<b>CAPITULO II.....</b>	<b>7</b>
<b>MARCO TEORICO .....</b>	<b>7</b>
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN .....	7
2.2. BASES TEORICAS .....	10
2.2.1. Diarrea Viral Bovina (DVB). .....	10
2.2.2. Agente etiológico .....	10
2.2.2.1. Taxonomía y estructura .....	10
2.2.3. Clasificación.....	11
2.2.3.1. Genotipo y biotipos .....	11
2.2.4. Patogénesis .....	14
2.2.4.2. Complejo respiratorio.....	15
2.2.4.3. Complejo diarrea neonatal bovina .....	15
2.2.4.4. Infección subclínica .....	16
2.2.4.10. Síndrome Hemorrágico.....	18

2.2.5.	Respuesta inmune .....	18
2.2.6.	Diagnostico .....	18
2.2.7.	Epidemiologia .....	19
2.2.8.	Prevención y control .....	22
2.3	BASES CONCEPTUALES .....	24
2.3.1.	Prueba de PCR en tiempo real (TR - PCR) .....	24
2.3.1.1.	Definición .....	24
2.3.1.2.	RT - PCR.....	25
2.3.1.2.1.	PCR de un paso frente a dos pasos en tiempo real .....	25
2.3.1.2.2.	Controles para PCR .....	25
2.3.1.3.	VENTAJAS DE LA PRUEBA DE PCR – TR .....	26
2.3.1.4.	DESVENTAJAS DE LA PRUEBA DE PCR - TR.....	26
<b>CAPITULO III</b>	.....	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	.....	<b>27</b>
3.1.	ÁMBITO DE ESTUDIO .....	27
3.1.1.	Ubicación política.....	27
3.1.2.	Ubicación geográfica .....	27
3.1.3.	Clima.....	29
3.2.	MATERIALES DE ESTUDIO .....	29
3.2.1.	Población y muestra.....	29
3.2.1.1.	Muestra .....	29
3.2.1.1.1	De las muestras .....	29
3.2.2.	Equipos e instrumentos para el procesamiento de muestras.....	30
3.2.3.	Materiales para el procesamiento de muestras.....	30
3.2.4.	Reactivos para el analisis del genotipo de la VDVB en el laboratorio .	31

3.3. METODOLOGÍA.....	33
3.3.1. Metodología de laboratorio.....	34
3.3.1.1. Metodología de TR - PCR para la identificación del virus de la diarrea viral bovina.....	34
3.3.1.1.1. Principios de la prueba.....	34
3.3.3.1.2. Extracción del material genético. ....	34
3.3.3.1.2.1. Preparación de las muestras y reactivos.....	34
3.3.3.1.2.2. Procedimiento para la extracción del material genético .....	35
3.3.3.1.3. Detección TR – PCR de un solo paso, para la identificación del virus de la diarrea viral bovina .....	38
3.3.3.1.3.1. Preparación de las muestras y reactivos.....	38
3.3.3.1.3.1.1 Reconstitución de los componentes del kit .....	38
3.3.3.1.3.2. Procedimiento para la identificación del genotipo del virus de la diarrea viral bovina por el método de TR-PCR de un solo paso .....	39
3.3.3.1.3.2.1. Amplificación TR – PCR de un solo paso, para la identificación del virus de la diarrea viral bovina.....	41
3.3.3.1.4. Validación de la prueba.....	45
3.3.3.1.5. Interpretación de resultados.....	45
<b>CAPITULO IV.....</b>	<b>46</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>46</b>
4.1 GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB) .....	46
5.1 CONCLUSIONES.....	67
5.2 RECOMENDACIONES. ....	68
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>69</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>TABLA 1:</b> Resumen de antecedentes para la identificación del genotipo del virus de la diarrea viral bovina (VDVB).....	9
<b>TABLA 02:</b> Distribución de muestras para cada distrito de vacunos persistentemente infectados (pi) al virus de la diarrea viral bovina (VDVB). ....	30
<b>TABLA 03:</b> Cantidad de reactivo por reacción para la solución de lisis unión.	35
<b>TABLA 04:</b> Cantidad de reactivo por reacción para la solución de perlas magnéticas.....	35
<b>TABLA 05:</b> Combinación de reactivos por reacción. ....	36
<b>TABLA 06:</b> Cantidad de agua libre de nucleasas para la reconstitución de los componentes del kit.....	39
<b>TABLA 07:</b> Cantidad de buffer de preparación de plantilla para la reconstitución de los componentes del kit.....	39
<b>TABLA 08:</b> Cantidad de reactivos para la preparación del master mix. ....	39
<b>TABLA 09:</b> Tiempos y temperaturas para la amplificación del pcr en tiempo real. ....	41
<b>TABLA 10:</b> Criterios para la ejecución valida de pcr – tiempo real.....	45
<b>TABLA 11:</b> Interpretación de los resultados de las pruebas de muestra individual. ....	45
<b>TABLA 12:</b> Valor del Ct (ciclo umbral) de las muestras, control positivo, control negativo para el genotipo 1 de la diarrea viral bonina (VDBV-1). ....	46
<b>TABLA 13:</b> Valor del Ct (ciclo umbral) de las muestras, control positivo, control negativo para el genotipo 2 de la diarrea viral bonina (VDVB-2). ....	47
<b>TABLA 14:</b> Resultado para la genotipificación de la diarrea viral bovina (VDVB-1, VDVB-2) en los distritos de Ancahuasi, Anta, Cachimayo, Zurite y huariocondo. ....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>FIGURA 01:</b> Morfología y estructura del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) .....	12
<b>FIGURA 02:</b> Mapa de la provincia de Anta .....	28
<b>FIGURA 03:</b> Ubicación de los distritos de la provincia de anta (Ancahuasi, Anta, Cachimayo, Huarcocondo y Zurite) .....	28

## ÍNDICE DE GRAFICOS

	Página
<b>GRAFICO 01:</b> Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 130 del distrito Zurite .....	51
<b>GRAFICO 02:</b> Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 215 del distrito de Zurite .....	52
<b>GRAFICO 03:</b> Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 122 del distrito de Zurite .....	53
<b>GRAFICO 04:</b> Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 16 del distrito de Huarcocondo.....	54
<b>GRAFICO 05:</b> Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 43 del distrito de Cachimayo .....	55
<b>GRAFICO 06:</b> Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 5 del distrito de Cachimayo .....	56
<b>GRAFICO 07:</b> resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 112 del distrito de Cachimayo .....	57
<b>GRAFICO 08:</b> resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 37 del distrito de Anta.....	58
<b>GRAFICO 09:</b> resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 16 del distrito de Anta.....	59

<b>GRAFICO 10:</b> Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 281 del distrito de Ancahuasi .....	<b>60</b>
<b>GRAFICO 11:</b> Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 216 distrito Ancahuasi .....	<b>61</b>
<b>GRAFICO 12:</b> Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 130 del distrito Ancahuasi .....	<b>62</b>
<b>GRAFICO 13:</b> Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 16 del distrito de Ancahuasi .....	<b>63</b>
<b>GRAFICO 14:</b> Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 16 del distrito de ancahuasi.....	<b>64</b>
<b>GRAFICO 15:</b> Resultado del genotipo 2 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-2), de la muestra 130; 215; 122 del distrito de Zurite, 16 del distrito de Huarocondo y 43; 5; 112 del distrito de Cachimayo.....	<b>65</b>
<b>GRAFICO 16:</b> Resultado del genotipo 2 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-2), de las muestras 37; 4 del distrito de Anta, las muestras 281; 216; 130; 28; 248 del distrito Ancahuasi .....	<b>66</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Página</b>
<b>ANEXO 01:</b> Ambiente de reacción de la cadena de la polimerasa en tiempo real (RT- PCR) .....	<b>77</b>
<b>ANEXO 02:</b> Materiales para la extracción del material genético y detección del genotipo VDVB.....	<b>78</b>
<b>ANEXO 03:</b> Reactivos para la extracción de material genético.....	<b>79</b>
<b>ANEXO 04:</b> Reactivos para la identificación del genotipo del virus de la diarrea viral bovina (VDVB.....	<b>79</b>
<b>ANEXO 05:</b> Registro de vacunos persistentemente infectados (PI) de los distritos de Anta, Ancahuasi, Huarocondo, Cachimayo y Zurite.....	<b>80</b>

## GLOSARIO

- VDVB : Virus de la Diarrea Viral Bovina
- VDVB-1 : Virus de la Diarrea Viral Bovina biotipo 1
- VDVB-2 : Virus de la Diarrea Viral Bovina biotipo 2
- CP : Citopatico
- Ct : Ciclo umbral
- DNA : Acido desoxirribonucleico
- ELISA : Ensayo por Inmunoabsorción Ligada a la Enzima
- LU : Lisis unión
- EM : Enfermedad de las Mucosas
- MEM : Minimun Essential Médium
- NCP : No Citopatico
- OFR : Marca abierta de lectura
- PI : Persistentemente Infectado
- PM : Perlas Magnéticas
- PCR : Reacción en Cadena de la Polimerasa
- RNA : Ácido ribonucleico

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo identificar al genotipo del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), en vacas de la Pampa de Anta de la Región Cusco, se trabajó con 14 muestras de animales persistentemente infectados (PI) detectado por el método ELISA. La identificación del genotipo se realizó en el laboratorio “Desarrollo y Validación de pruebas Serológicas y Moleculares para la Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas de la Escuela Profesional de Zootecnia, Área de Sanidad Animal UNSAAC” mediante el método de RT-PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real). Los resultados nos indican que en las 14 muestras evaluadas está presente la cepa del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) y está ausente la cepa del genotipo 2 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-2) en la población de vacunos de la pampa de Anta. La presencia del genotipo 1 (VDVB-1) se debería a que dicho genotipo es el más difundido en poblaciones bovinas de muchos países como es el caso de EEUU de donde el Perú importó bovinos sin restricción respecto al Virus de la Diarrea Viral Bovina, la ausencia o baja prevalencia del genotipo 2 (VDVB-2) puede deberse a una baja prevalencia o bajo número de cepas analizadas (14 muestras) a comparación con el número de cepas analizadas en otros estudios donde sí se detectó ambos genotipos.

## INTRODUCCIÓN

El Perú cuenta con 5'156,0 cabezas de ganado bovino, donde la población de ganado bovino se concentra en la sierra con 3'774, 3 cabezas de ganado bovino que representa el 73,2% del total, la Región del Cusco posee una población de 407,267 cabezas de ganado vacuno, siendo una de las regiones con porcentajes más altos en la explotación ganadera. Del cual la provincia de Anta posee una población de 53,177 cabezas de bovino de acuerdo a los resultados del **(IV Censo Nacional Agropecuario, 2012)**, las comunidades de Anta están caracterizados por la crianza del ganado bovino puesto que es una actividad importante que realizan las familias y es una fuente de ingreso económico permanente.

La enfermedad de la DVB, fue introducida al país en la década del 60 con la importación de vacas de países donde la enfermedad era endémica **(Rivera., 1993)**. Posteriores estudios epidemiológicos demuestran que DVB está ampliamente difundida en la población bovina, especialmente en las principales cuencas lecheras como: Cajamarca, Lima y Arequipa **(Rivera., 2001)** ocasionando abortos y afecciones respiratorias como parte del complejo respiratorio bovino. **(Zanabria et al., 2000)**.

El virus de la diarrea vira bovina (VDVB), ha sido clasificado en dos biotipos, (citopático y no citopático) según su comportamiento en células de cultivo, y en dos genotipos (I y II) de acuerdo con su secuencia genética. El genotipo I, está asociado con la enfermedad clásica de la DVB en sus diferentes presentaciones clínicas, mientras que el genotipo II, está relacionado a cuadros agudos severos y hemorrágicos digestivos en adultos **(Rivera., 1993)**.

El genotipo 2 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-2), está presente en Norte América; también, se ha detectado en países de América Latina como Brasil (*Wageck et al., 1998*), Argentina (*Jones et al., 2001*) y Chile (*Pizarro et al., 2006*). Aun, cuando el genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) es más frecuentemente detectado en comparación con VDVB-2. El VDVB ha sido aislado de brotes agudos de DVB o síndrome hemorrágico en EEUU y Canadá a fines de la década del 80 (*Corapi et al., 1990*)(*Pellerin et al., 1994*) (*Carman et al., 1998*), sin embargo, no todas las cepas del VDVB-2 aisladas han sido asociadas con el síndrome hemorrágico, debido a que fueron aisladas de terneros PI nacidas de vacas vacunadas con VDVB-1 (*Ridpath et al., 1994, 2000*).

La enfermedad se puede presentar en distintas formas, que van desde una subclínica a clínica hiperaguda o aguda hasta una crónica, acompañada por inmunodepresión que incrementa la susceptibilidad a patógenos secundarios. En su forma aguda, produce abortos, muertes perinatales, nacimientos prematuros y un amplio rango de malformaciones (*Duffel et al., 1986*). En su forma crónica da lugar al nacimiento de animales persistentemente infectados (PI) e inmunotolerantes al virus los cuales resultan de gran relevancia epidemiológica y son los responsables de la perpetuación del virus en la población bovina (*Edwards et al., 1987*).

Es por ello que en el presente trabajo de investigación se identificó al genotipo del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) que está presente en el ganado bovino de la pampa de Anta, por medio de la amplificación de Reacción de la Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-TR).

## PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN

Las enfermedades entéricas, respiratorias y reproductivas constituyen las principales patologías, que limitan los procesos productivos y reproductivos de los bovinos. Entre los agentes virales que tienen especial implicación en la ocurrencia patologías como enfermedades entéricas se encuentra el virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) (*Rivera., 1993*).

El VDVB en el tracto reproductivo produce infertilidad temporal, muerte embrionaria, abortos, malformaciones congénitas y crías nacidas débiles o con infección persistente dependiendo del tiempo de gestación. Los animales PI posibilitan la generación de los dos genotipos virales (VDVB-1) y (VDVB-2).

El VDVB-1, produce inmunosupresión, problemas entéricos, neumonías, abortos, los cuales son, silenciosos, produce malformaciones, alarga los entre partos, también el nacimiento de animales Persistentemente Infectados (PI) que son la principal fuente de contagio.

El VDVB-2, produce el síndrome hemorrágico siendo mortal por ser el virus más agresivo (*Araínga., 2010*).

Los animales PI infectados con el VDVB-1 o VDVB-2 pueden llegar a desarrollar una enfermedad de carácter mortal denominado enfermedad de las mucosas y el síndrome hemorrágico. Lo que genera, menor cantidad de crías en los hatos, con lo cual se tendría una menor cantidad de vacas en producción, teniendo un impacto económico generando así, la pérdida de interés en la producción animal (*Paton., 1995*).

Es así, en la provincia de Anta del departamento de Cusco se viene observando algunos problemas reproductivos, como bajo porcentaje de vacas

preñadas, algunos abortos, baja producción láctea cuyas causas son de sintomatología compatible DVB que afecta al ganado vacuno con la consiguiente pérdida de animales y desmedro de la economía de la provincia mencionada.

En este contexto, el proyecto tiene como objeto identificar el genotipo del Virus de la Diarrea Viral Bovina que está presente en la vacas de la pampa de Anta de la Región del Cusco.

# **CAPITULO I**

## **OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN**

### **1.1. OBJETIVOS**

#### **1.1.1. Objetivo general**

Identificar el genotipo del virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), en vacas de la Pampa de Anta de la Región Cusco, por el método de RT-PCR.

#### **1.1.2. Objetivo específico**

- Identificar el genotipo del virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) por el método de RT-PCR de vacas persistentemente infectado en los distritos de Ancahuasi, Anta, Cachimayo, Huarcocondo y Zurite de la Pampa de Anta de la Región del Cusco.

## **1.2. JUSTIFICACIÓN**

La ganadería en la Provincia de Anta, es importante para el poblador debido a que es una fuente de ingreso económico primordial para las familias; por lo tanto, cualquier problema sanitario que afecta a los vacunos es de suma importancia y deben tomarse medidas de solución inmediata.

Los vacunos persistentemente infectados (PI) son los grandes diseminadores de la enfermedad que llegan a contagiar a más del 90% de los vacunos cuando comparten el pastoreo y más del 95% cuando están estabulados.

Hay una tendencia mundial para erradicar al Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB); por tanto, los estudios epidemiológicos y la disponibilidad de herramientas diagnósticas modernas podrían servir de base para la elaboración de un programa nacional de control-erradicación del VDVB en el Perú por ende en la provincia de Anta, que al inicio podría ser de tipo voluntario como está ocurriendo en dos hatos de Arequipa.

Con esto pretendemos identificar al genotipo del virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) mediante el método del TR – PCR por ser una prueba de mayor sensibilidad y por no tener antecedentes de la genotipificación del virus en la región del Cusco, para así poder brindar una información evidente sobre la existencia de este virus y además este trabajo de investigación contribuirá a controlar la enfermedad.

## CAPITULO II

### MARCO TEORICO

#### 2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

En los establos lecheros de Arequipa, Cajamarca, Junín, La Libertad, Lima y Puno Se seleccionaron 55 muestras de bazo, timo, riñón, pulmón de fetos bovinos abortados y muestras de sangre, suero o plasma de bovinos con sospecha de infección aguda o PI. Las 55 muestras resultaron positivas al VDVB por el método de inmunofluorescencia (IF) o ELISA de captura. Las muestras positivas fueron procesadas por la técnica RT-PCR en tiempo real, para determinar el genotipo viral. Se aislaron 41 cepas del VDVB, El 85.4% correspondieron al fenotipo no citopático y 14.6% al citopático. Donde se indicó que 14 de 55 muestras fueron positivas al genotipo VDVB-1, siendo el 25% del total de muestras evaluadas y ninguna al genotipo VDVB-2 (*Araínga et al., 2010*).

Se aisló 25 muestras Persistentemente Infectados (PI) siendo 15 muestras originarias del Perú y 10 muestras originarias de Chile para la caracterización genética. Todos los sueros fueron identificados como positivos por ELISA de antígeno de la Diarrea Viral Bovina (DVB) y se confirmaron como positivos por el metodo TR-PCR, las muestras también fueron amplificadas y secuenciadas donde mostro que las 25 cepas pertenecen al genotipo 1 y ninguna cepa pertenece al genotipo 2 (*Stahl et al., 2009*).

En San Cristóbal de la provincia de Santa Fe (Argentina), se evaluaron 5 animales, las muestras de estos animales se aisló por cultivo celular por el método de neutralización viral, se analizaron por PCR en tiempo real para

evaluar la presencia del VDVB genotipo II en la cuenca lechera santafesina. Los cultivos celulares infectados mostraron efecto citopático (ECP) compatible con el producido por la Diarrea Viral Bovina (DVB) (vacuolación intensa, alteración y lisis celular). En los análisis realizados revelaron 90-98% de homología con las cepas de referencia tipo I, no encontrándose cambios asociados a las cepas tipo II (**Gollán et al., 2006**).

En seis establecimientos de la provincia de Buenos Aires (Argentina), se diagnosticaron casos de Diarrea Viral Bovina durante los meses de Febrero y Octubre de 2013, para los 6 casos (A, B, C, D, E, F) se realizó una detallada anamnesis, obteniendo datos del establecimiento, del rodeo, del manejo general y del curso de la enfermedad. Se efectuó la necropsia de al menos un animal en cada caso, se registraron las lesiones y se obtuvieron muestras en esterilidad de bazo en formol viral de diversos órganos para el estudio para aislamiento viral, histopatológico e inmunohistoquímico, muestras congeladas y sangre heparinizada para PCR. En el caso B se aislaron cepas NCP pertenecientes al genotipo II con un porcentaje de identidad del 88% con respecto a la cepa de referencia N93, siendo este caso una presentación atípica del VDVB. En los casos D y E se aislaron cepas del biotipo CP, lo cual permite confirmar en el caso E el cuadro de Enfermedad de las Mucosas. En el caso D, el aislamiento de cepas CP en 2 neonatos es un hallazgo poco frecuente que podría asociarse a la presencia de madres PI (**Morrell et al., 2014**).

**Tabla 1:** Resumen de antecedentes para la identificación del genotipo del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB)

<b>Autor, año y lugar</b>	<b>N° de muestras – casos</b>	<b>Muestra</b>	<b>Prueba</b>	<b>TIPO 1</b>	<b>TIPO 2</b>
<b>(Araínga., 2010) PERÚ (Arequipa, Cajamarca, Junín, La Libertad, Lima, Puno)</b>	55 muestras	Suero	RT-PCR	25% 14 muestras	0
<b>(Stahl et al., 2009) PERU, CHILE</b>	25 muestras	Suero	RT-PCR	25 muestras	0
<b>(Gollán., 2006) ARGENTINA (Santa Fe)</b>	5 muestras	Suero	RT-PCR	90-98%	0
<b>(Morrell., 2014) ARGENTINA (Buenos Aires)</b>	6 casos	Suero	RT-PCR	2 muestras	1 muestra

## **2.2. BASES TEORICAS**

### **2.2.1. Diarrea Viral Bovina (DVB).**

La diarrea viral bovina es una enfermedad contagiosa de origen en los rumiantes. Esta enfermedad de considerable importancia en el ganado vacuno es causada por el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) y está estrechamente relacionada con la peste porcina clásica y los virus de la enfermedad de la frontera ovina (*Brownlie et al., 1998*)

### **2.2.2. Agente etiológico**

#### **2.2.2.1. Taxonomía y estructura**

El virus VDVB pertenece al género pestivirus de la familia Flaviviridae (Los pestivirus han sido clasificados de la familia Togaviridae de la familia Flaviviridae por la quinta reunión del comité Internacional de taxonomía viral). Dentro de este género se encuentra el virus de la enfermedad de las fronteras de bovinos y la peste porcina clásica (PPC) los cuales son antigénicamente y genéticamente relacionados (*Alvarez et al., 2002*).

Los pestivirus pueden cruzar la barrera placentaria de hospederos diferentes, invadir el feto y generar una infección persistente que continúa durante la vida postnatal, clínicamente inaparente, excretando el virus e infectando a otras especies (*Alvarez et al., 2002*). La VDVB también infecta ganado de pezuña hendida como cerdos y ovinos (*Jubb., 1993*).

Estos son virus envueltos, esféricos y miden entre 40 a 60 nm de diámetro, se componen de una cadena simple de ARN, de polaridad positiva, compactado por una cápside proteica y rodeado por una membrana fosfolípidos; y nucleocápside no helicoidal de simetría icosaédrica. El ácido nucleico es infeccioso en ausencia de las proteínas del virión, ya que el RNA viral es la vez

RNA mensajero. En 1988 Collet encontró que el RNA tiene un solo OFR (open Reading frame o marco abierto de lectura), y que la secuencia de nucleótidos codifica para 3988 aminoácidos, lo cual representa 449 kda de proteína viral. El genoma posee proteínas estructurales y no estructurales; las proteínas estructurales son p20, p14 (C) gp25 (E1). En estudios realizados por Renard en 1987, con la cepa Osloss, produjo un DNA complementario (cDNA) al RNA viral y expresado y caracterizado que el RNA nos es poliadenilado y que sus condiciones bioquímicas lo sitúan más cerca de la familia Flaviviridae que la Familia Togaviridae (**Paton., 1995**).

### **2.2.3. Clasificación**

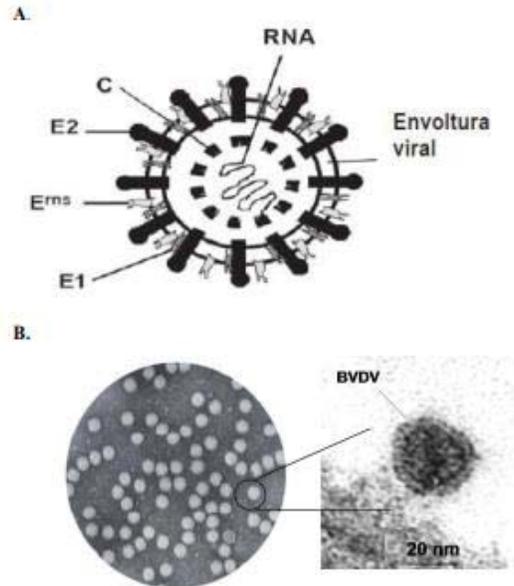
La clasificación del VDVB es difícil, debido a su variabilidad genética y antigénica y a su estrecha relación con otros miembros del género *Pestivirus* (virus de la peste porcina clásica y virus de la enfermedad de la frontera del ovino). Los hospedadores en que eran aislados los *Pestivirus* fueron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

#### **2.2.3.1. Genotipo y biotipos**

Hay más de 200 cepas diferentes de VDVB, comprendidas dentro de dos genotipos: VDVB-1 y VDVB-2. El análisis de la región codificante para la autoproteasa viral Npro permite la distinción entre genotipos (**Becher et al., 1997**). Los genotipos están subdivididos en subgenotipos o subgrupos: VDVB-

1a – I y VDVB-2a/b (Walz et al., 2010), dependiendo de sus características genéticas.

**Figura 01:** Morfología y estructura del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB)



Fuente:(<http://homepage.usask.ca/~vim458/virology/studpages2007/AshleyB/bvdvivirus.html>, 2007)

En la figura 01 que en la parte A. Los Pestivirus tienen una cadena simple positiva de ARN (ss (+) ARN). La cápside tiene una estructura icosaédrica, que consiste de una sola proteína de cápside, en la parte C. La cual está limitada por una envoltura, codificada por 3 proteínas de membrana (Erns, E1 y E2), y en la parte B. VDVB tiene un diámetro de 40-60 nm y se cataloga entre los virus de menor tamaño.

El genotipo del VDVB se refiere a diferencias en el genoma viral. El VDVB se ha dividido tradicionalmente en 2 genotipos:

El VDVB tipo 1 es el responsable de procesos leves con sintomatología inaparente, caracterizados por un ligero aumento de la temperatura corporal y la

presencia de lesiones moderadas restringidas al aparato digestivo y a órganos del sistema linfoide. Asimismo, en vacas gestantes este genotipo puede inducir abortos y otras patologías reproductivas. Los aislados de tipo 1 se emplean con frecuencia en el desarrollo de vacunas y métodos de diagnóstico (**Pedreira et al., 2008**).

Los aislados del VDVB tipo 2 están asociados con enfermedades agudas severas, caracterizadas en ocasiones por presentar un cuadro hemorrágico agudo, conocido como síndrome hemorrágico, causa la muerte de los animales, no siendo en general más virulentas que las de tipo 1 (**Pedreira et al., 2008**).

Los biotipos de VDVB se han clasificado en biotipos citopático (CP) y no citopático (NCP), de acuerdo a su efecto citolítico en células en cultivo (**Moennig & Plogemann, 1992**). Sin embargo, en publicaciones más recientes, se ha propuesto que el VDVB puede ser segregado en tres biotipos en función de su actividad en células linfoides cultivadas (**Ridpath et al., 2006**). Estos tres biotipos serían:

1. VDVB citopático, que causaría lisis en células epiteliales cultivadas,
2. VDVB no citopático, que no muestra efectos obvios sobre la viabilidad de cualquiera de las células epiteliales o linfoides cultivadas y,
3. VDVB linfocitopático, sin efecto en las células epiteliales pero capaz de causar lisis en células linfoides en cultivo.

El biotipo linfocitopático propuesto se correlaciona con la virulencia en las infecciones agudas. La muerte celular causada por el biotipo linfocitopático no se asocia con cambios en el procesamiento de la proteína viral de NS2-3.

Las cepas CP provienen de las cepas NCP por diferentes mutaciones tales como inserción de secuencias celulares, duplicaciones de genes, deleciones, cambios nucleotídicos simples, entre otros; que inducen al clivaje de la proteína NS2-3 para dar origen a las proteínas NS2 y NS3, siendo esta última proteína el marcador molecular de las cepas CP. El caso contrario, mutación de CP a NCP, fue reportado en sólo una ocasión (**Nakamura et al., 1997**), pero este hallazgo sigue siendo controversial.

El VDVB tipo 1 NCP se aísla comúnmente de infecciones agudas producidas en campo y se le atribuye la mayor parte del daño causado a los rebaños (**Pellerin et al., 1994**). Este biotipo es el responsable de infecciones persistentes, mientras que el VDVB tipo 1 y 2 CP es considerado como el causante de la Enfermedad de las Mucosas (EM) en combinación con un VDVB NCP persistente del mismo genotipo.

Mientras que el biotipo se basa en diferencias de rasgos expresados como la citopatología en cultivo celular.

#### **2.2.4. Patogénesis**

Después del contacto con las membranas mucosas de la boca o nariz, la replicación ocurre en las células epiteliales con una predilección por las tonsilas palatinas (**Jubb., 1993**). El virus presenta tropismo por células mitóticamente activas como: linfocitos, fagocitos mononucleares y células epiteliales (**Paton., 1995**).

La diseminación ocurre a través del virus libre en el suero o leucocitos infectados con el virus, particularmente linfocitos, monocitos, linfoblastos circulantes y células precursoras de macrófago (**Baker., 1995**).

El VDVB puede dar origen a diversas manifestaciones clínicas y lesiones como resultado de la interacción de factores tales como: cepa y biotipo viral, edad y estado inmune del hospedador, factores estresantes y otros patógenos concurrentes, además manifestaciones clínicas que van desde infecciones subclínicas a una grave, una forma altamente mortífera denominada enfermedad de las mucosas (EM) (**Baker., 1995**). El grado de viremia inducida durante la infección por VDVB se asocia con la gravedad de la enfermedad clínica. Los aislamientos del VDVB que inducen un alto grado de viremia pueden ser capaz de inducir signos clínicos de la enfermedad (**Jubb., 1993**).

Dentro de las principales características, producto de una infección con el BVDV, se puede mencionar:

#### **2.2.4.1. Inmunodepresión**

El VDVB produce leucopenia y altera las funciones de los leucocitos, incrementando la patogenicidad de microorganismos coinfectantes. Además posee una fuerte afinidad por el tejido linforeticular, ocasionando necrosis y atrofia de dichos tejidos (**Baker et al., 1995**).

#### **2.2.4.2. Complejo respiratorio**

El VDVB con lleva a una inmunodepresión sistémica y pulmonar, aumentando la patogenicidad de los demás agentes respiratorios, además, se ha demostrado que ciertas cepas de la diarrea viral bovina actúan como agentes primarios de neumonías (**Brownlie et al., 1998**).

#### **2.2.4.3. Complejo diarrea neonatal bovina**

Cuando fracasa la transferencia pasiva de anticuerpos, el virus participa en el complejo diarrea neonatal de los terneros. Infecciones concurrentes con

enteropatógenos resultan en manifestaciones clínicas más severas, debido al efecto inmunodepresivo del VDVB o simplemente a una sumatoria de efectos **(Kelling., 1996)**.

#### **2.2.4.4. Infección subclínica**

La mayor parte de las infecciones son subclínicas o de carácter moderado, ocasionalmente se presenta fiebre, descarga oculonasal, leucopenia transitoria, elevada morbilidad y baja mortalidad (Kelling., 1996). En este tipo de infecciones, se desarrollan anticuerpos neutralizantes 14 a 28 días postinfección y consecuentemente la protección contra reinfecciones por cepas homólogas del virus probablemente de por vida **(Fredriksen., 1999)**.

#### **2.2.4.5. Infección aguda**

La forma aguda se presenta en animales seronegativos, en especial animales entre 6 y 24 meses de edad, y es causada, en su mayoría, por virus no citopatogénico (Baker., 1995), además de ser de severidad variable, en bovinos seronegativos e inmunocompetentes **(Kelling et al., 1996)**.

#### **2.2.4.6. Trastornos reproductivos**

El mayor impacto económico de la infección con el VDVB es el ocasionado por los trastornos reproductivos **(Dubovi., 1994) (Moennig., 1995)**.

Es posible detectar el antígeno viral en los macrófagos y células del estroma ovárico, entre los días 6 a 60 post infección **(Grooms., 1998)**, y en células foliculares y ovocitos en distintos estados de maduración **(Fray., 1998)**.

Las infecciones de hembras susceptibles próximas al momento del apareamiento ocasionan muerte embrionaria y repeticiones de servicio hasta que desarrollen respuesta inmune **(Grah., 1984)**.

#### **2.2.4.7. Infección de hembras gestantes**

El VDVB en hembras gestantes susceptibles, produce infecciones subclínicas, sin embargo existe una alta probabilidad de una propagación transplacentaria del virus hacia el feto. Esto conlleva a que el feto, a tal infección, presente una variedad de respuestas, incluyendo el aborto o el nacimiento de terneros débiles y pequeños con o sin malformaciones congénitas, además de terneros clínicamente normales. El principal determinante del resultado de la infección de la DVB en vacas preñadas, es la edad del feto expuesto al desafío viral, además de ser importante el estado inmunológico de la madre (*Murray., 1991*).

#### **2.2.4.8. Infecciones persistentes**

La infección fetal con VDVB puede resultar en el nacimiento de terneros inmunotolerantes al VDVB con una infección persistente inaparente. Los animales PI resultan por la infección fetal con VDVB biotipo NCP durante el primer trimestre de gestación dado que el sistema inmune fetal no reconoce el VDVB como agente infeccioso o foráneo (*Fray., 1998*) (*Glew., 2001*).

#### **2.2.4.9. Infección de las mucosas**

La EM se genera cuando animales PI con una cepa NCP son súper infectados con una cepa CP homóloga, de origen exógeno o generado de cambios genéticos o recombinación de ARN de las cepas NCP residentes, siendo posible el aislamiento de ambos biotipos antigénicamente similares. Es decir el biotipo CP surge de mutaciones del biotipo NCP, aunque no se descartan fuentes externas. Esta enfermedad, esporádica y fatal, se caracteriza por presentar severa leucopenia, diarrea profusa, erosiones y ulceraciones en el sistema digestivo (*Baker., 1995*) (*Kelling., 1996*).

#### **2.2.4.10. Síndrome Hemorrágico**

Este síndrome se genera de la infección de los animales PI por el genotipo 2 del VDVB, en USA y Canada, se han reportado como severos, en estos casos se observa diarrea con sangre, epistaxis, congestión en conjuntiva y mucosas, hemorragias petequiales y equimóticas en mucosas, los animales muestran pirexia, leucopenia, linfopenia y neutropenia. Este síndrome ha sido asociado con infecciones por cepas NCP del genotipo II (*Ridpath et al, 2000*).

#### **2.2.5. Respuesta inmune**

Una característica de importancia de la infección con VDVB es la aparente afinidad del virus por el sistema inmune (*Lambot., 1998*) y la inmunosupresión es una de sus principales atributos (*Tizard., 2002*)

El VDVB parece inducir respuestas mediadas por células T y B, existiendo una distinción entre respuestas humorales y mediadas por células, lo que sugiere la existencia de subpoblaciones de linfocitos T cooperadores Th1 y Th2 en la regulación de las respuestas inmunes específicas dirigidas contra el VDVB (*Lambot., 1997*). Esto puede deberse a la afeción de la función de células presentadoras de antígeno, llevando a una reducción en la habilidad para estimular respuestas de las células T (*Glew., 2001*).

#### **2.2.6. Diagnostico**

Al igual que la mayoría de microorganismos. Los virus pueden ser detectados de forma directa o indirecta. Las pruebas directas, son las que evidencian al virus o algunos de los antígenos virales; mientras que las pruebas indirectas, son las que se utilizan con más frecuencia y básicamente demuestran un contacto del huésped con el agente viral mediante la determinación de

anticuerpos específicos contra el virus. El objetivo principal del diagnóstico es la detección y remoción de bovinos PI, principal fuente de infección y reservorio del virus. Estas pruebas son las siguientes:

1. Aislamiento viral en cultivo celular
2. Detección de antígenos virales
  - a. Inmunofluorescencia
  - b. Inmunoperoxidasa
  - c. ELISA captura de antígenos
3. Detección de anticuerpos
  - a. Neutralización viral (VN)
  - b. Inmunoabsorbancia Ligada a Enzimas (ELISA)
4. Detección del ácido nucleico viral
5. RT-PCR

## **2.2.7. Epidemiología**

### **2.2.7.1. Prevalencia**

El VDVB se encuentra ampliamente distribuido en el mundo entero; sin embargo, la considerable variación de las prevalencias, tanto de animales seropositivos como de animales portadores o PI, se deberían a las diferencias entre los sistemas de manejo y al tamaño de los hatos de cada localización (**Lindberg., 1999**). Aquellos lugares donde las explotaciones presentan altas densidades poblacionales, suelen presentar las mayores prevalencias (**Houe., 1999**).

En el Perú, estudios realizados por investigadores de la FMV-UNMSM ha determinado una amplia distribución del VDVB en las cuencas lecheras, con prevalencias superiores al 70% (**Contreras., 2000**) (**Rivera., 2003**). Reportaron

un prevalencia del 72.4% en el Valle del Mantaro, mientras que (Jayashi, 2005) encontraron 80.2% en un establo de crianza intensiva de la provincia de Arequipa. Otros estudios encontraron 73.7% en la Provincia de Canchis, Cusco (Álvarez, 2001) y 85.3% en Parinacochas, Ayacucho (*Rivera., 2001*)

#### **2.2.7.2. Fuentes de infección**

Los animales PI son considerados las principales fuentes de infección y diseminación del VDVB. Esto se debe a que estos animales eliminan constantemente y abundantemente el virus durante toda su vida a través de sus secreciones y excreciones (descarga nasal, saliva, lagrimas, leche, orina, heces y semen), al grado al que en solo 3 o 4 meses pueden infectar al 90% del ganado en contacto con ellos (*Houe., 1999*) (*Houe., 1995*). Las infecciones agudas son también una fuente de infección aunque de menor importancia, debido al corto periodo de duración de la misma (unos 6 días), como a la menor cantidad de virus excretado (*Houe., 1995*) (*Lindberg., 1999*).

#### **2.2.7.3. Formas de transmisión**

##### **2.2.7.3.1. Transmisión horizontal**

La principal vía de transmisión horizontal es la directa. Esto ocurre por contacto generalmente oro-nasal, de un animal susceptible con otro infectado, a través de secreciones y excreciones como saliva, orina, heces, descarga oculonasal, secreciones vaginales, fetos abortados y placentas (*Tremblay., 1996*) También puede ocurrir por el semen de toros que se encuentren en la fase aguda de la infección o que sean PI, tanto por monta natural como por inseminación artificial (*Baker., 1995*) (*Vanroose et al., 1998*).

La vía indirecta ocurre a través de la ropa de personal involucrado en el manejo de los animales o instrumentos de uso veterinario contaminado y por algunas moscas picadoras. Además, experimentalmente se demostró que el VDVB puede transmitirse incluso por vía a erógena desde un bovino PI hacia uno susceptible en un plazo aproximado de una semana (**Mars et al., 1999**).

#### **2.2.7.3.2. Transmisión vertical**

La transmisión vertical ocurre de una generación a otra. Se incluye la transmisión del feto a través de semen infectado de toros con infección aguda o persistentemente infectado (PI). Las hembras seronegativas pueden inseminadas con semen infectada pudiendo infectarse, sin embargo la producción del feto PI raramente ocurre por esta ruta; en caso de ocurrir la producción de una cría de PI. Mientras en las hembras preñadas, el biotipo NCP se puede diseminar verticalmente a través de la placenta; si el feto es infectado por este biotipo antes de adquirir competencia inmunológica (antes del día 125 de gestación aproximadamente), desarrollara una infección persistente (IP); estos terneros pueden actuar como fuente de infección. Pese a la elevada tasa de mortalidad de los PI en su primer año de vida, muchos alcanzan la madurez sexual y se reproducen (Los toros PI, infectan a las hembras durante la monta directa y la inseminación artificial). Hembras PI siempre dan terneros PI. La transmisión vertical siempre ocurre luego de la transferencia embrionaria si el receptor es PI, o la vaca donante es PI y no se realiza el correcto lavado del embrión (**Houe., 1995**).

Cuando se infecta una vaca preñada no inmune con virus BVDV se produce una enfermedad subclínica y el virus rápidamente atraviesa la placenta.

## **2.2.8. Prevención y control**

### **2.2.8.1. Vacunas**

Una complicación para el desarrollo de las vacunas contra el virus BVDV es la diversidad antigénica. La tendencia es identificada la mayor cantidad de variantes antigénicas e incluirlos en la vacuna. Las evaluaciones realizadas a las vacunas existentes dieron resultados muy variados, tanto para la infección post natal como para la infección pre natal. Entre las vacunas se tiene:

#### **2.2.8.1.1. Vacunas a virus modificado**

La vacuna de virus modificado contra la diarrea viral bovina (DVB) está asociado a una gran variedad de efectos adversos, tales como la inducción de la enfermedad de las mucosas (EM), infección fetal e inmunosupresión, pueden potenciar infecciones recurrentes, resultando en un incremento en la incidencia de enfermedades respiratorias (*Potgieter., 1995*)

Existen más 140 vacunas en USA, todas satisfacen requerimientos como pureza, potencia y seguridad; garantizando una respuesta inmune. Libres de agentes extraños. La vacuna a virus vivo modificado, usualmente contiene un solo biotipo de DVB citopatógeno. Los biotipos citopáticos usados usualmente son virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB) – NADL, DVB- Singer, DVB- G24V (*Bolin., 1995*).

#### **2.2.8.1.2. Vacunas inactiva**

Las ventajas del uso de ese tipo de vacunas está relacionada a las desventajas del uso de las vacunas de virus vivo modificado, sin embargo las desventajas de este tipo de vacuna y esto a su vez retrasa el tiempo necesario

para que se establezca una inmunidad protectora, a su vez, la duración de inmunidad inducida es corta (**Bolin., 1995**).

#### **2.2.8.2. Medidas de bioseguridad**

El conocimiento detallado de la epidemiología del virus (DVB) y del comportamiento de las pruebas diagnósticos en uso son esenciales para la identificación de animales virémicos (Animales PI y animales con infección aguda), que son la fuente más importante de diseminación viral en hatos afectados.

Un programa de prevención, control o erradicación de una enfermedad puede ser adoptada a distintas estrategias que van a variar de acuerdo a la situación inicial de la explotación pero apoyadas en tres pilares fundamentadas que son: Las medidas de bioseguridad, identificación y remoción de los animales PI y vacunación contra DVB en el hato (**Lambot., 1998**).

- Bioseguridad la implementación de medidas de bioseguridad están dirigidas a evitar el ingreso de virus de la diarrea viral bovina (DVB), así como su difusión dentro del hato, a través del control estricto de todo los animales que se incorporan los cuales deben ser seronegativos a virus, antes del después de cuarentena estricta, evitar el contacto directo con otros hatos, evitar el servicio con semen sin certificación de ser libre de la enfermedad.
- Identificación y eliminación de animales PI, estrategia indispensable por la importancia epidemiológica de estas animales.
- Inmunización con vacunas de virus muertos o modificado, con el objetivo de prevenir la infección congénita así como. Para evitar las infecciones posnatales (**Grahn., 1984**).

## 2.3 BASES CONCEPTUALES

### 2.3.1. Prueba de PCR en tiempo real (TR - PCR)

PCR son las siglas por las que se conoce (**Reacción en cadena de la polimerasa**), cuyas iniciales en inglés son PCR ("**polymerase chain reaction**").

#### 2.3.1.1. Definición

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue creado por Kary Mullis en 1983 (*Mullis., 1990*). La gran utilidad de esta técnica se difundió a principios de los ochenta por toda la comunidad científica. Los nuevos equipos y las avanzadas técnicas de secuenciación, así como los programas de computación para la manipulación de datos que se fueron sucediendo, permitieron el desarrollo de mejores ensayos de PCR(*Spanakis., 1993*).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real, también conocida como Real Time PCR (RT-PCR) muestra la capacidad de monitorear el progreso de la reacción de PCR a medida que esta ocurre. Los datos son colectados a lo largo del proceso de PCR y no al final como se realizaba antes. Este método revolucionó la forma en que se usaba la técnica de PCR para cuantificación de ADN y ARN. El RT-PCR usa moléculas de un reportero fluorescente para monitorear la amplificación de productos durante cada ciclo de reacción. Su simplicidad, especificidad y sensibilidad junto con su potencial como técnica en aplicaciones futuras y la evolución hacia nuevos conocimientos de la química, además de la confiabilidad en la instrumentación y protocolos mejorados, han hecho del RT-PCT una tecnología altamente competitiva para la detección de ADN y ARN (*Weller et al., 2000*).

### **2.3.1.2. RT - PCR**

La PCR de transcripción inversa o RT-PCR, permite el uso de RNA como molde. Un paso adicional permite la detección y amplificación del RNA. El RNA se transcribe de forma inversa en DNA complementario (cDNA) utilizando una transcriptasa inversa. La calidad y pureza del RNA molde es esencial para el éxito de la RT-PCR. El primer paso de la RT-PCR es la síntesis de un híbrido DNA / RNA. La eficiencia de la reacción de la primera cadena puede afectar al proceso de amplificación. A partir de aquí, se utiliza el procedimiento de PCR convencional para amplificar el cDNA. La posibilidad de revertir el RNA en cDNA por RT-PCR tiene muchas ventajas (**Genesig**).

#### **2.3.1.2.1. PCR de un paso frente a dos pasos en tiempo real**

Al detectar / cuantificar la presencia de un objetivo con un genoma de ARN se recomienda el uso de un protocolo RT-PCR de un solo paso. Un paso RT-PCR combina la transcripción inversa y la reacción de PCR en tiempo real en un simple de tubo cerrado. Esto ahorra un tiempo de banco significativo pero también reduce los errores. La sensibilidad de un protocolo de un paso protocolo también mayor que un paso doble porque la muestra biológica completa está disponible sin dilución (**Genesig**).

#### **2.3.1.2.2. Controles para PCR**

**Control Interno:** Se define como una secuencia de ADN o ADNc que es co-amplificado con el ADN blanco y se usa principalmente para aumentar la confiabilidad de los ensayos, ya que permite la detección de falsos negativos. Es decir determina un ensayo fallido o inhibición de la reacción. El control interno más usado para la PCR-RT es un plásmido que contiene secuencias de organismos distantes filogenéticamente. Estos plásmidos pueden ser

adicionados a la mezcla de PCR o directamente a la muestra clínica (de esta forma se verificaría si la extracción de ADN a partir de la muestra se llevó a cabo correctamente). La longitud del templado del control interno debe ser mayor a la longitud del templado de ADN blanco para asegurar que la competencia de la reacción tienda más hacia el último

**Control positivo o externo:** No permite verificar la reacción individualmente ya que la reacción se da en un tubo diferente; no revela la ineficiencia en la extracción de ADN o ARN.

**Control negativo:** se puede utilizar otro organismo no relacionado con el organismo en estudio, o también se puede utilizar agua o buffer en lugar de ADN template.

#### **2.3.1.3. VENTAJAS DE LA PRUEBA DE PCR – TR**

- ✓ Simplicidad y rapidez.
- ✓ Especificidad.
- ✓ Sensibilidad.

#### **2.3.1.4. DESVENTAJAS DE LA PRUEBA DE PCR - TR**

- ✓ Costo de micro placas.
- ✓ Costo de equipo automático.
- ✓ Costo del kit.

## CAPITULO III

### MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se realizó en la Provincia de Anta en los distritos de Ancahuasi, Anta, Zurite, Huarcocondo y Cachimayo de la región del Cusco. El procesamiento de las muestras en el laboratorio de “Desarrollo y Validación de Pruebas Serológicas y Moleculares para la investigación y Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas de la Escuela Profesional de Zootecnia, Área de Sanidad Animal-UNSAAC”, en el periodo de Junio a Agosto del 2018.

##### 3.1.1. Ubicación política

- Región : Cusco
- Departamento : Cusco
- Provincia : Anta
- Distritos : Ancahuasi, Anta, Cachimayo, Huarcocondo y Zurite

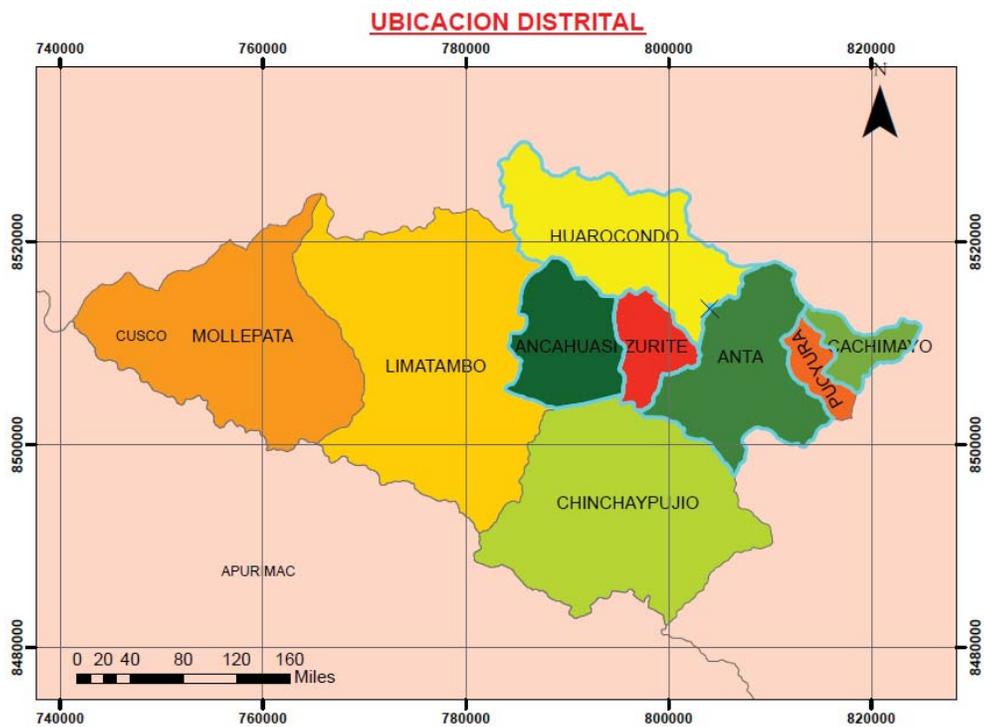
##### 3.1.2. Ubicación geográfica

- Latitud Sur : 13°27'20”
- Longitud oeste : 72°15'21”
- Altitud máxima : 3405 m.s.n.m
- Superficie : 52.32 km<sup>2</sup>

Fuente: **(SENAMHI, 2010)**.



**Figura 02:** Mapa de la provincia de Anta



**Figura 03:** Ubicación de los distritos de la provincia de Anta (Ancahuasi, Anta, Cachimayo, Huarocondo y Zurite)

Fuente: **Instituto Geográfico Nacional (IGN).**

### **3.1.3. Clima**

El clima de la zona es del tipo tropical de altura, caracterizado por un contraste muy fuerte entre una estación de lluvia y una estación de seca: hay presencia lluvia entre los meses de Noviembre a Marzo que termina en Abril y una estación seca entre los meses de Noviembre a Marzo, con heladas nocturnas desde fines de Mayo hasta principios de Agosto. La precipitación anual esta entre 650 mm de Diciembre a Marzo y 150 mm entre Abril y Noviembre en las principales zonas de vida (3600 m.s.n.m). El déficit hídrico permanece nueve meses de Abril a Diciembre (*SENAMHI, 2010*).

## **3.2. MATERIALES DE ESTUDIO**

### **3.2.1. Población y muestra**

Vacunos de las razas Holstein, Brow swiss e Híbridos, de los Disritos, Ancahuasi, Anta, Cachimayo, Huarcocondo y Zurite.

#### **3.2.1.1. Muestra**

Se analizó muestras de vacunos persistentemente infectados (PI) que fueron detectados por la prueba de ELISA captura de antígenos.

##### **3.2.1.1.1 De las muestras**

Las muestras estuvieron constituidas por suero sanguíneo de 14 vacunos persistentemente infectados (PI).

**Tabla 02.** Distribución de muestras para cada Distrito de vacunos persistentemente infectados (PI) al Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB)

Distrito	Animales				PI
	> 6 meses	1-2 años	2.5-3 años	3.5-4 años	
Acahuasi	1	1	3	0	5
Anta	0	0	1	1	2
Cachimayo	0	3	0	0	3
Zurite	3	0	0	0	3
Huarocondo	0	0	0	1	1
<b>Total</b>					<b>14</b>

### 3.2.2. Equipos e instrumentos para el procesamiento de muestras

- Micro Centrifuga (AL220VAC).
- Cabina de flujo laminar (Kossodo), (BIOBASE).
- Equipo de PCR (Applied Biosystems).
- Vortex (VORTEX 2 GENIE).
- Micropipetas de (1 - 20 µl; 20 – 200 µl y 100 - 1000 µl).
- Rack Magnético (BioLabs).

### 3.2.3. Materiales para el procesamiento de muestras

- Tips desechables y estériles.
- Viales criogénicas de 2.5 ml y 5 ml.
- Barbijos.

- Gorros.
- Lentes.
- Guantes de látex.
- Mandiles descartable.
- Cronometro.
- Multi portador de tubo para el vortex.
- Tubos de reacción rápida (8 tubos/tira).
- Tapa de tubos de reacción rápida.

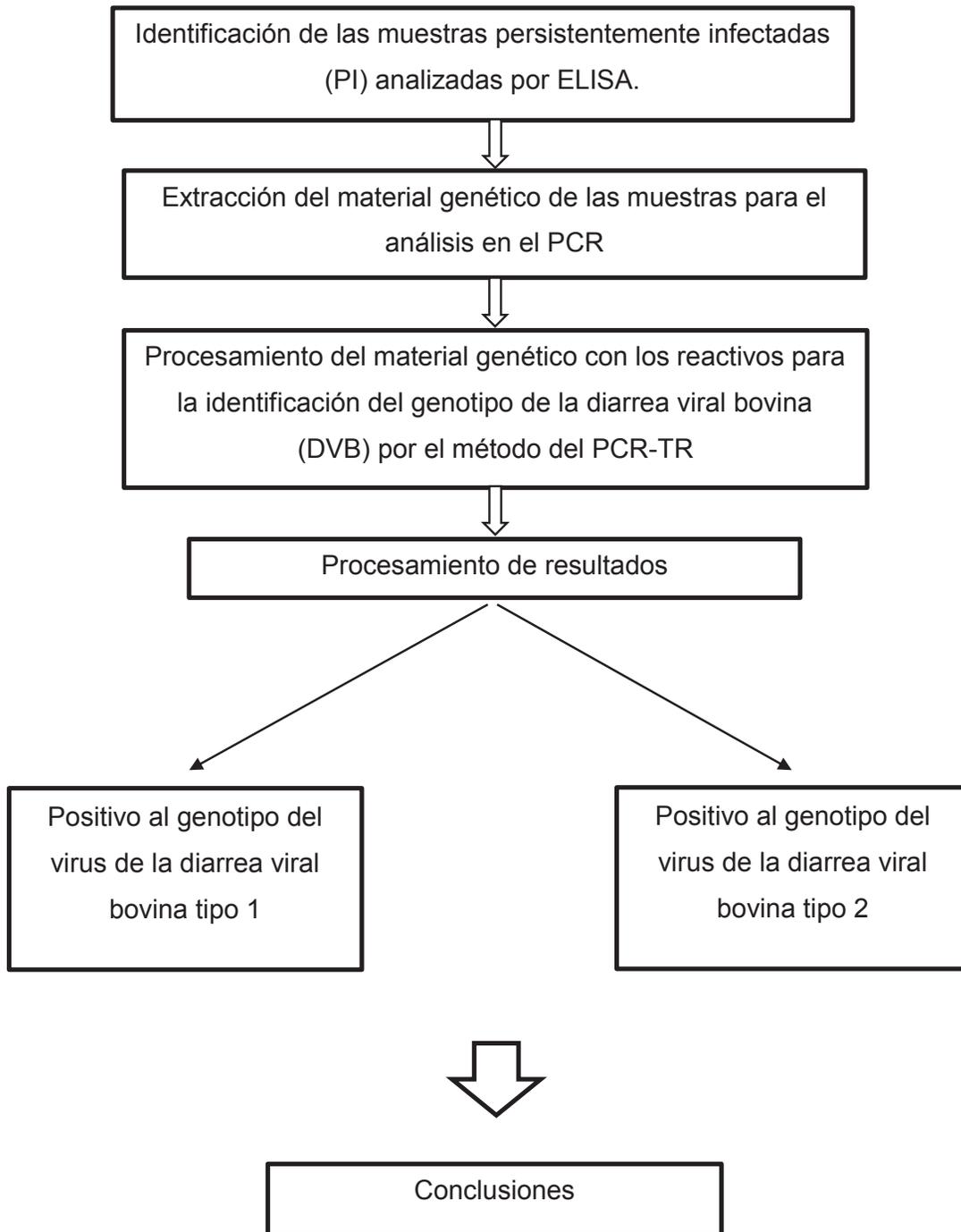
#### **3.2.4. Reactivos para el análisis del genotipo de la VDVB en el laboratorio**

- Kit de TR-PCR para Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB)
  - ✓ Polyprotein (VDVB 1) primer/probe mix
  - ✓ Polyprotein (VDVB 2) primer/probe mix
  - ✓ Polyprotein (VDVB 1) positive control template
  - ✓ Polyprotein (VDVB 2) positive control template
  - ✓ VDVB 1 and VDVB 2 RT primer mix
  - ✓ RNase/DNase free water
  - ✓ Template preparation buffer

- Kit extractor de RNA
  - ✓ MagMAX™ CORE Lysis Solution
  - ✓ MagMAX™ CORE Binding Solution
  - ✓ MagMAX™ CORE Wash Solution 1
  - ✓ MagMAX™ CORE Wash Solution 2
  - ✓ MagMAX™ CORE Elution Buffer
  - ✓ MagMAX™ CORE Magnetic Beads
  - ✓ MagMAX™ CORE Proteinase K
- Suero sanguíneo 200 µl de cada muestra

### 3.3. METODOLOGÍA

#### FLUJOGRAMA DE TRABAJO



### **3.3.1. Metodología de laboratorio**

#### **3.3.1.1. Metodología de TR - PCR para la identificación del virus de la diarrea viral bovina**

##### **3.3.1.1.1. Principios de la prueba**

El kit Primerdesign denesig para los genomas del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) diseñado para el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) diseñado para la cuantificación in vitro de los genomas del VDVB. El kit está diseñado para tener el perfil de detección lo más amplio posible, mientras permanece específico para el genoma de VDVB.

Los primers y las secuencias de sonda en este kit tienen 100% de homología con un amplio rango de secuencias de VDVB basado en un análisis bioinformática completo.

El kit contiene dos conjuntos de cebadores y sondas. Cada uno de los cebadores del gen de la poliproteína y los conjuntos de sondas están diseñados para detectar el virus de la diarrea viral bovina 1 y la diarrea viral bovina Virus 2 (*Genesig*).

##### **3.3.3.1.2. Extracción del material genético.**

###### **3.3.3.1.2.1. Preparación de las muestras y reactivos.**

- Esterilizar la cabina de flujo laminar para evitar la contaminación de las muestras.
- Solución de lisis unión.

Realizar los cálculos para la cantidad de muestras a trabajar, siempre incluir el 10% de excedente para compensar la imprecisión del pipeteo.

**Tabla 03:** Cantidad de reactivo por reacción para la solución de lisis unión

<b>Componente</b>	<b>Por reacción</b>	<b>Por reacción (+10%)</b>
MagMAX™ CORE Lysis Solution	350 µL	385 µL
MagMAX™ CORE Binding Solution	350 µL	385 µL

- Solución de perlas magnéticas.

Realizar los cálculos para la cantidad de muestras a trabajar, siempre incluir el 10% de excedente para compensar la imprecisión del pipeteo.

**Tabla 04:** Cantidad de reactivo por reacción para la solución de perlas magnéticas

<b>Componente</b>	<b>Por reacción</b>	<b>Por reacción (+10%)</b>
MagMAX™ CORE Magnetic Beads	20 µL	22 µL
MagMAX™ CORE Proteinase K	10 µL	11 µL

- Descongelar las muestras de suero sanguíneo y homogenizar.

### **3.3.3.1.2.2. Procedimiento para la extracción del material genético**

1. En un vial criogénica marcar LU (solución de lisis unión), mezclar 385 µL de MagMAX™ CORE Lysis Solution y 385 µL de MagMAX™ CORE Binding Solution.
2. En un vial criogénico marcar PM (solución de perlas magnéticas), mezclar 22 µL de MagMAX™ CORE Magnetic Beads y 11 µL de MagMAX™ CORE Proteinase K.

3. Unión de ácidos nucleicos a las perlas magnéticas.

a. Para una reacción combinar en el siguiente orden:

**Tabla 05:** Combinación de reactivos por reacción

<b>Combinar</b>	<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
1	PM (solución de perlas magnéticas)	30 µL
2	Suero	200 µL
<b>Antes del paso 3: mezclar mediante pipeteo y dejar incubar 2 minutos a T° Ambiente</b>		
3	LU (solución de lisis unión)	700 µL

b. Usar un vortex, agitar a una velocidad moderada por 3 minutos.

c. Usar un rack magnético, capturar las perlas. El tiempo de captura es de 1 a 3 minutos.

d. Cuidadosamente aspirar y descartar todo el sobrenadante sin remover la perlas.

e. Retirar los tubos del rack magnético.

4. Lavado de las perlas con MagMAX™ CORE Wash Solution 1.

a. Adicionar 500 µL de MagMAX™ CORE Wash Solution 1 a cada tubo.

b. Usando un vortex, agitar a una velocidad moderada por 1 minuto.

c. Usar un rack magnético para capturar las perlas. El tiempo de captura es de aproximadamente 1 minuto. Cuando la muestra se torne transparente, las perlas habrán sido capturadas.

- d. Cuidadosamente aspirar y descartar todo el sobrenadante sin remover las perlas.
  - e. Retirar los tubos del rack magnético.
5. Lavado de las perlas con MagMAX™ CORE Wash Solution 2.
- a. Adicionar 500 µL de MagMAX™ CORE Wash Solution 2 a cada tubo.
  - b. Usar un vortex, agitar a una velocidad moderada por 1 minuto.
  - c. Usar un rack magnético para capturar las perlas. El tiempo de captura es de aproximadamente 1 minuto, cuando la muestra se torne transparente, las perlas habrán sido capturadas.
  - d. Cuidadosamente aspire y descarte todo el sobrenadante sin remover las perlas.
  - e. Retirar los tubos del rack magnético.
6. Secado de las perlas.
- a. Dejar el tubo abierto a temperatura ambiente durante 2 minutos para que el alcohol restante de MagMAX™ CORE Wash Solution 2 se evapore.
  - b. Inspeccionar el tubo y si hay solución residual, quitar lo más posible con una pipeta de punta fina, dejar el tubo abierto en el rack magnético por otro minuto.
7. Elución de ácidos nucleicos.

- a. Dejar el tubo abierto a temperatura ambiente durante 2 minutos para permitir que el alcohol restante de MagMAX™ CORE Wash Solution 2 se evapore.
- b. Adicionar 90 µL de MagMAX™ CORE Elution Buffer pre calentado a 65°C a cada tubo.
- c. Usar un vortex, agite vigorosamente durante 3 minutos, la muestra debe tornarse marrón, indicando la completa suspensión de las perlas.
- d. Usar un rack magnético capture las perla, la captura de tardar aproximadamente 2 minutos.
- e. Tener cuidado de no remover las perlas, transferir 90 µL de sobrenadante a un vial criogénico limpio. No desechar el sobrenadante; los ácidos nucleicos purificados están en el sobrenadante.

### **3.3.3.1.3. Detección TR – PCR de un solo paso, para la identificación del virus de la diarrea viral bovina**

#### **3.3.3.1.3.1. Preparación de las muestras y reactivos**

- Esterilizar la cabina de flujo laminar de trabajo durante 15 minutos.

##### **3.3.3.1.3.1.1 Reconstitución de los componentes del kit**

- Girar cada tubo en una centrifuga antes de abrirlo. Esto asegura que la mezcla liofilizada de la imprimación y la sonda se encuentre en la base del tubo y no se derrame al abrir el tubo.
- Reconstituir los componentes del kit con agua libre de nucleasas.

**Tabla 06:** Cantidad de agua libre de nucleasas para la reconstitución de los componentes del kit

<b>Resuspender componentes en agua</b>	<b>Volumen</b>
Polyprotein (BVDV 1) primer/probe mix	165 µL
Polyprotein (BVDV 2) primer/probe mix	165 µL
BVDV 1 and BVDV 2 RT primer mix	165 µL

- Reconstituir los componentes del control positivo con el tampón de preparación de plantillas.

**Tabla 07:** Cantidad de buffer de preparación de plantilla para la reconstitución de los componentes del kit

<b>Resuspender componentes en buffer de preparación de plantilla</b>	<b>Volumen</b>
Polyprotein (BVDV 1) positive control template	500 µL
Polyprotein (BVDV 2) positive control template	500 µL

- Agitar en un vortex cada tubo.

### **3.3.3.1.3.2. Procedimiento para la identificación del genotipo del virus de la diarrea viral bovina por el método de TR-PCR de un solo paso**

Los pasos del pipeteo deben realizarse en hielo.

1. Para cada muestra de ARN preparar una mezcla de reacción de acuerdo con la siguiente tabla (se incluyó lo suficiente para los controles).

**Tabla 08:** Cantidad de reactivos para la preparación del master mix.

Componente	Volumen
Oasig™ OneStep or precisión™ OneStep 2x Qrt-pcr MaterMix	10 µL
BVDV2 or BVDV2 primer/probe mix	1 µL
RNAse/DNAse free water	4 µL
Volumen final	15 µL

2. Pipetear 15 µL de esta mezcla (master mix) en cada pocillo de acuerdo con su configuración de placa experimental de PCR en tiempo real.
3. Pipetear 5 µL de plantilla de RNA sin diluir en cada pocillo de acuerdo con la configuración de su placa experimental. Para el pocillo de control negativo usar 5 µL de agua libre de RNAsa / DNAsa. El volumen final será 20 ul.
4. Pipetear 5 µL de control positivo tipo 1 y control negativo en el pocillo de acuerdo a la configuración de placa experimental.
5. Pipetear 5 µL de control positivo tipo 2 y control negativo en el pocillo de acuerdo a la configuración de placa experimental.

Se trabajó por separado los dos genotipos de la diarrea viral bovina (BVDV), para una mejor comprensión.

**3.3.3.1.3.2.1. Amplificación TR – PCR de un solo paso, para la identificación del virus de la diarrea viral bovina**

**Tabla 09:** Tiempos y temperaturas para la amplificación del PCR en tiempo real.

	Paso	Tiempo	Temperatura
	Transcripción inversa	10 minutos	42°C
	Activación enzimática	2 minutos	95°C
50 CICLOS	Desnaturalización	10 segundos	95°C
	Recopilación de datos	60 segundos	60°C

## Flujograma de la metodología de la extracción del material genético



**PASO 13:** Dejar abierto los viales criogénicos por 2 minutos para que el alcohol restante de wash solution 2 se evapore.



**PASO 14:** Adicionar 90  $\mu$ L de Elution Buffer.



**PASO 15:** Usando el vortex agitar a una velocidad moderada durante 3 minutos.



**PASO 17:** Con cuidado transferir 90  $\mu$ L de sobrenadante a un vial criogénico.



**PASO 16:** Con el rack magnético capturar las perla magnéticas, durante 2 minutos.



Se extrajo el material genético (RNA) de 14 muestras de suero.



## Flujograma para reconstitución de los componentes del kit para la identificación del genotipo del virus de la diarrea viral bovina por el método de PCR Tiempo real

- Reconstitución de VDVB-1 primer/probe mix y VDVB-2 primer/probe mix



- Reconstitución de BVDV-1 positive control template, BVDV-2 positive control template



## Flujograma de la metodología para la identificación del genotipo del virus de la diarrea viral bovina por el método de PCR Tiempo real

**PASO 01:** Esterilizar la cabina para la preparación de las mezclas (master mix).



**PASO 02:** Configurar el equipo del RT-PCR



**PASO 04:** Combinar 15  $\mu$ L de master mix en cada tubo de reacción rápida, 5  $\mu$ L de control positivo tipo 2 en el tubo de reacción rápida para el control positivo, 5  $\mu$ L de agua libre de RNAsa/DNAsa en el tubo de reacción rápida del control negativo, 5  $\mu$ L de RNA sin diluir en cada tubo de reacción rápida de acuerdo con la configuración de la placa experimental de RT-PCR.



**PASO 03:** Combinar 15  $\mu$ L de master mix en cada tubo de reacción rápida, 5  $\mu$ L de control positivo tipo 1 en el tubo de reacción rápida para el control positivo, 5  $\mu$ L de agua libre de RNAsa/DNAsa en el tubo de reacción rápida del control negativo, 5  $\mu$ L de RNA sin diluir en cada tubo de reacción rápida de acuerdo con la configuración de la placa experimental de RT-PCR.



**PASO 05:** Sellar los tubos de reacción rápida con sus respectivas tapas, para evitar la contaminación de las muestras.



**PASO 06:** Agitar en el vortex los pocillos a una velocidad moderada para garantizar la homogeneidad de las mezclas.



**PASO 07:** Ubicar cada pocillo de acuerdo con la configuración de la placa experimental y se dio inicio a la amplificación en RT-PCR.



#### 3.3.3.1.4. Validación de la prueba.

Para la validación de la prueba el valor del Ct (Ciclo umbral) del control positivo tiene que ser menor de 30 y la extracción del control no presentara señal.

**Tabla 10:** Criterios para la ejecución valida de PCR – tiempo real

<b>Tipos de reacción</b>	<b>Valor de Ct para RNA de VDVB</b>
Control positivo	<30
Extracción del control	40 (sin señal)

#### 3.3.3.1.5. Interpretación de resultados

Se considera como positivo a las muestras cuyo valor de Ct (ciclo umbral) sean menores de 38, como negativo a las muestras que no presentaron señal por ende no tienen Ct y es sospechoso cuando el valor del Ct se encuentra entre  $\geq 38$  y  $< 40$  dichas muestras tendran que volver a ser evaluadas.

**Tabla 11:** Interpretación de los resultados de las pruebas de muestra individual

<b>Valor Ct para el RNA de BVDV</b>	<b>Interpretación</b>
<38	Muestra positiva para VDVB
40 sin señal	Muestra negativa para VDVB
	Consulte solución de problemas si el valor de CT para xeno™ RNA control es 38 en una muestra negativa para VDVB
$\geq 38$ y $< 40$	Resultado sospechoso.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 4.1 GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB)

**Tabla 12:** Valor del Ct (Ciclo umbral) de las muestras, control positivo, control negativo para el genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDBV-1)

N°	Ct	Ct	Ct
Muestra/Distrito	VDVB-1	Control positivo	Control negativo
130 Zurite	24.8	27.7	
215 Zurite	24.7	27.7	
122 Zurite	23.2	27.7	
16 Huarcocondo	24.4	28.3	
43 Cachimayo	24.5	28.3	
5 Cachimayo	22.2	28.3	
112 Cachimayo	18.0	23.6	
37 Anta	18.1	23.6	SIN SEÑAL
4 Anta	18.1	23.6	
281 Ancahuasi	18.2	23.6	
216 Ancahuasi	24.3	28.2	
130 Ancahuasi	24.4	28.2	
28 Ancahuasi	24.3	28.2	
348 Ancahuasi	18.1	23.6	

En la tabla 12 se observa las muestras 130 Zurite, 215 Zurite, 122 Zurite, 16 Huarcocondo, 43 Cachimayo, 5 Cachimayo, 112 Cachimayo, 37 Anta, 4 Anta, 281 Ancahuasi, 216 Ancahuasi, 130 Ancahuasi, 28 Ancahuasi, 348 Ancahuasi, cuyo Ct (Ciclo umbral) del VDVB-1 son 24.8, 24.7, 23.2, 24.4, 24.5, 22.2, 18, 18.1, 18.1, 18.2, 24.3, 24.4, 24.3, 18.1 respectivamente, el Ct del control positivo 27.7, 27.7, 27.7, 28.3, 28.3, 28.3, 23.6, 23.6, 23.6, 23.6, 28.2, 28.2, 28.2, 23.6 respectivamente, el Ct del control negativo no presenta señal.

**Tabla 13:** Valor del Ct (Ciclo umbral) de las muestras, control positivo, control negativo para el genotipo 2 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-2)

N° Muestra-Distrito	Ct BVDV-2	Ct Control positivo	Ct Control negativo
130 Zurite			
215 Zurite			
122 Zurite			
16 Huarcocondo		28.2	
43 Cachimayo			
5 Cachimayo			
112 Cachimayo	SIN SEÑAL		SIN SEÑAL
37 Anta			
4 Anta			
281 Ancahuasi			
216 Ancahuasi		28.4	
130 Ancahuasi			
28 Ancahuasi			
348 Ancahuasi			

En la tabla 13 se observa las muestras 130 Zurite, 215 Zurite, 122 Zurite, 16 Huarcocondo, 43 Cachimayo, 5 Cachimayo, 112 Cachimayo, 37 Anta, 4 Anta, 281 Ancahuasi, 216 Ancahuasi, 130 Ancahuasi, 28 Ancahuasi, 348 Ancahuasi, cuyo Ct (Ciclo umbral) VDVB-2 no presentan señal, el Ct del control positivo en los distritos de Zurite, Huarcocondo y Cachimayo es 28.2 y en los distritos de Anta y Ancahuasi es de 28.4, Ct del control negativo no presenta señal.

**Tabla 14:** Resultado para la genotipificación del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1, VDVB-2) en los distritos de Ancahuasi, Anta, Cachimayo, Zurite y Huarucondo

Ditrito	N° muestras	Positivo BVDV-1	Positivo BVDV-2
Ancahuasi	5	5	0
Anta	2	2	0
Cachimayo	3	3	0
Zurite	3	3	0
Huarucondo	1	1	0
<b>TOTAL</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>0</b>

En la tabla 14 se observa un total de 14 muestras de vacunos evaluados, donde 5 son muestras del Distrito de Ancahuasi, 2 son muestras del distrito de Anta, 3 son muestras del Distrito de Cachimayo, 3 muestras del Distrito de Zurite y 1 es muestra del Distrito de Huarucondo, las 14 muestras evaluadas son positivos al genotipo 1 de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) y ninguna muestra evaluada es positivo al genotipo 2 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-2).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son: De las 14 muestras evaluadas de los Distritos de Ancahuasi, Anta, Cachimayo, Zurite y Huarucondo. Las 14 muestras son positivos al genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) y ninguno al genotipo 2 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB -2).

Este resultado es similar con el trabajo realizado por **(Araínga et al., 2010)** en Arequipa, Cajamarca, Junin, La Libertad, Lima y Puno, que evaluó 55 muestras de animales sospechosos, fueron procesadas mediante la prueba TR - PCR usando primers específicos para cada genotipo viral, indico que 14 de

55 muestras fueron positivas al genotipo VDVB-1, siendo el 25% del total de muestras evaluadas y ninguna al genotipo VDVB-2, los resultados son similares al presente trabajo al no encontrarse positivos al genotipo 2 (VDVB-2); la presencia del genotipo 1 (VDVB-1) se debería a que dicho genotipo es el más difundido en poblaciones bovinas de muchos países como es el caso de EEUU de donde el Perú importó bovinos sin restricción respecto al Virus de la Diarrea Viral Bovina, la ausencia o baja prevalencia del genotipo VDVB-2 puede deberse a una baja prevalencia o bajo número de cepas analizadas (14 muestras) a comparación con el número de cepas analizadas en otros estudios donde sí se detectó ambos genotipos.

Por otro lado (**Stahl et al., 2009**) aisló 25 muestras Persistentemente Infectados (PI) siendo 15 muestras originarias del Perú y 10 muestras originarias de Chile, fue procesada por el método TR-PCR donde se muestra que las 25 cepas pertenecen al genotipo 1 y ninguna cepa pertenece al genotipo 2, los resultados son iguales a los obtenidos en el presente trabajo al no encontrar positivos al genotipo 2, la ausencia del genotipo 2 puede deberse a que en el Perú la vacuna empleada es a virus inactivado y la vacunación no es una práctica común (**Wageck et al., 1998**)(**Flores et al., 2000**).

También (**Gollán et al., 2006**) en San Cristóbal de la provincia de Santa Fe (Argentina) en la cuenca lechera santafesina, las muestras fueron procesadas por Aislamiento Viral (AV), Neutralización Viral (NV), inmunofluorescencia directa (IFD), técnicas histológicas y mediante la prueba de TR - PCR, ha reportado variabilidad entre las cepas del VDVB, que se manifiesta por la existencia de los biotipo CP y NCP y los tipo virales 1 y 2, los análisis realizados revelan un 90-98% de homología con las cepas de genotipo 1, no

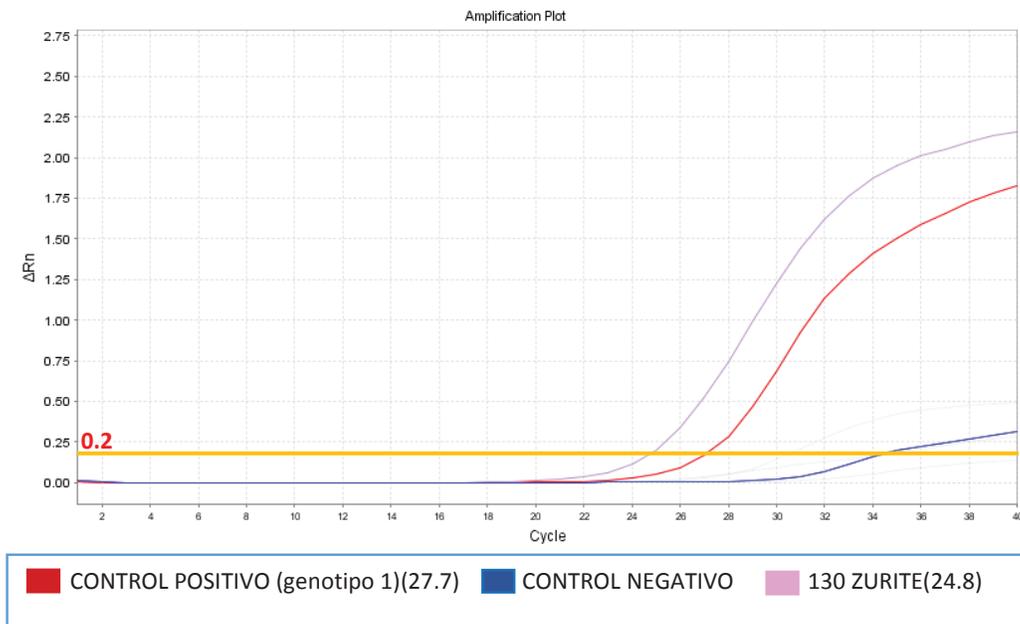
encontrándose cepas genotipo 2, los resultados son iguales a los obtenidos en el presente trabajo no encontrando positivos al genotipo 2, esto puede deberse al bajo número de muestras evaluadas y también a la degradación del RNA viral debido a factores como tiempo de permanencia e inadecuada conservación de las muestras sobre todo en los primeros años de colección.

También (**Morrell et al., 2014**) en seis establecimientos de la provincia de Buenos Aires (Argentina), las muestras fueron procesadas mediante el método de RT - PCR, donde en un caso se aisló la cepa NCP perteneciente al genotipo II y en dos casos se aisló la cepa CP el cual permite el cuadro de Enfermedades de las Mucosas, los resultados son diferentes a los obtenidos en el presente trabajo ya que dicho autor encontró la presencia del genotipo1 y genotipo 2, lo cual puede deberse a que las muestras evaluadas fueron colectadas y procesadas en el momento, también a que en Argentina la vacunación es una práctica constante.

En los resultados de la genotipificación, se considera como positivo a la honda de la muestra que se levanta junto a la honda del control positivo y la honda de control negativo se debe mostrar de forma lineal, la validación de los resultados se realiza con el valor del Ct (Ciclo umbral).

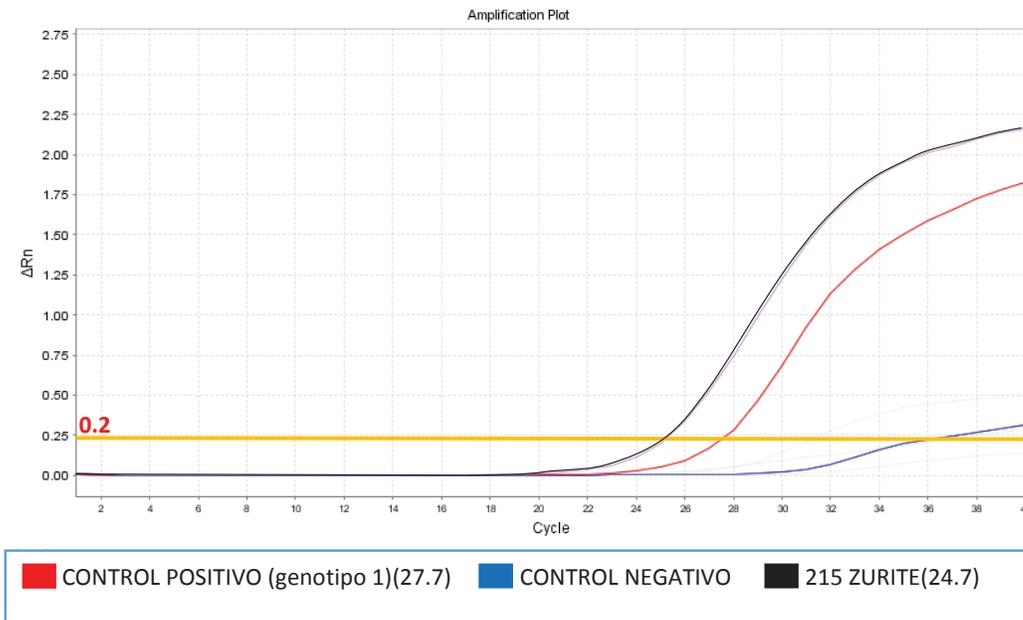
La amplificación de las muestras fue procesada de forma individual usando diferentes controles positivos.

**Grafico 01:** Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 130 del distrito Zurite



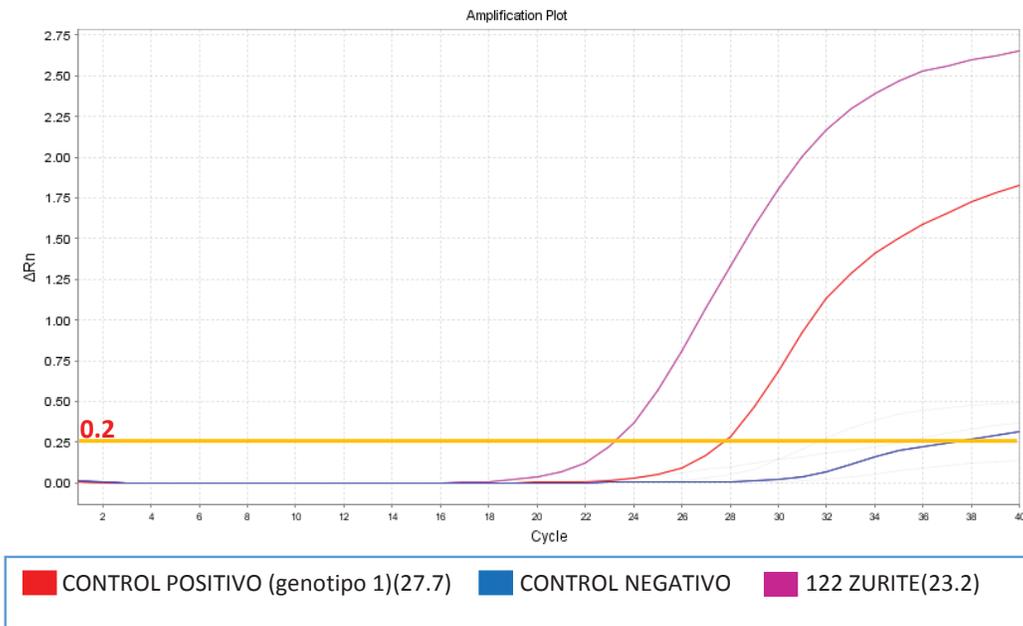
En el gráfico 1 se muestra la amplificación del genotipo 1 de la muestra 130 del distrito de Zurite, siendo su Ct (Ciclo umbral) 24.8, teniendo el Ct del control positivo 27.7 resultando la muestra positivo al genotipo 1.

**Grafico 02:** Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 215 del distrito de Zurite



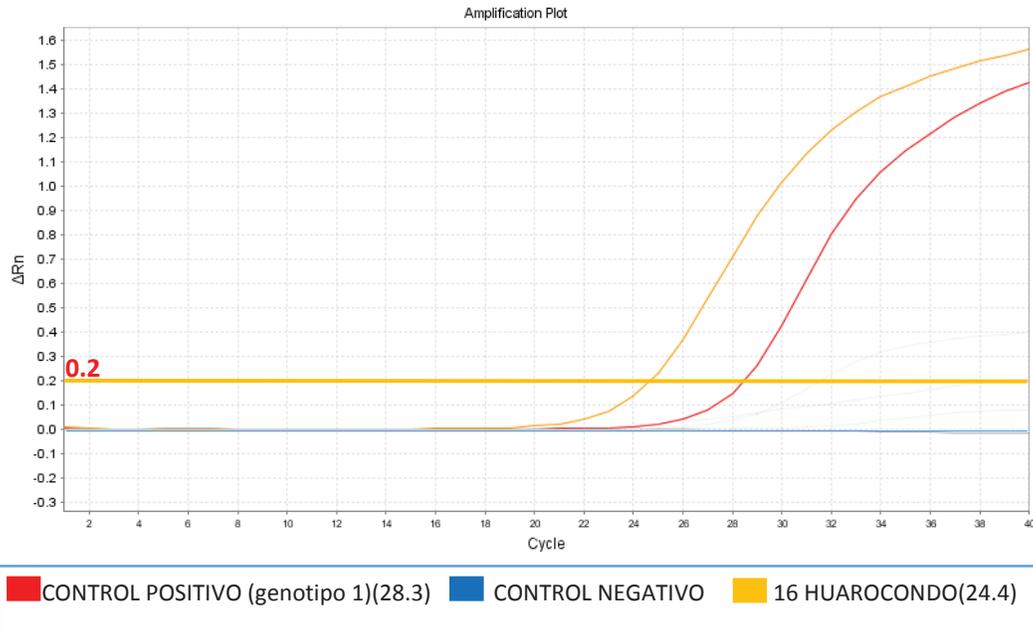
En el gráfico 2 se muestra la amplificación del genotipo 1 de la muestra 215 del distrito de Zurite, siendo su Ct (Ciclo umbral) 24.7, teniendo el Ct del control positivo 27.7; resultando la muestra positivo al genotipo 1.

**Grafico 03:** Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 122 del distrito de Zurite



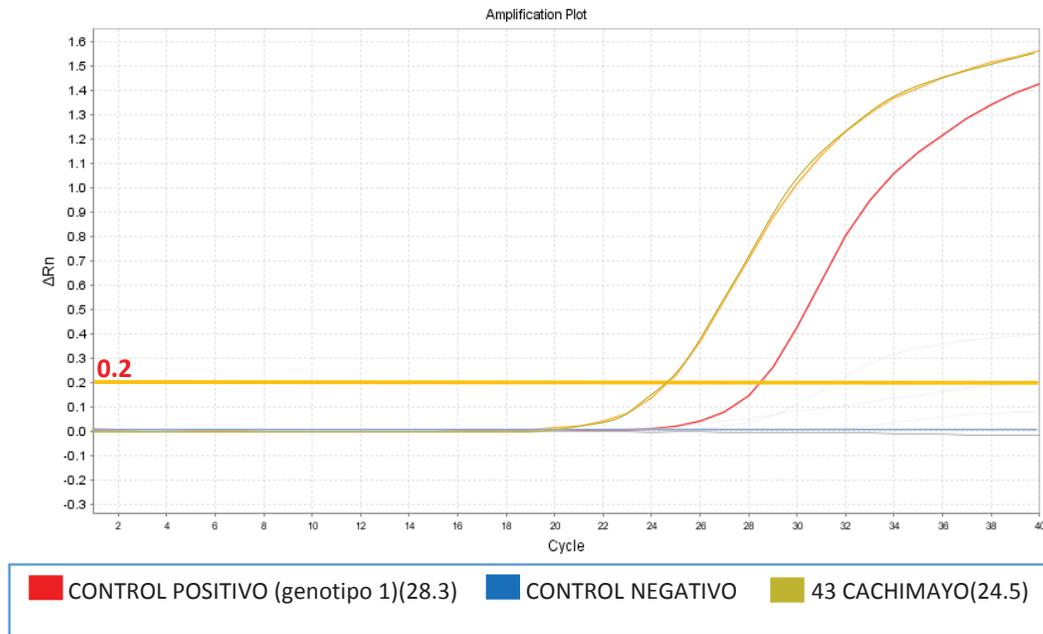
En el gráfico 3 se muestra la amplificación del genotipo 1 de la muestra 122 del distrito de Zurite, siendo su Ct (Ciclo umbral) 27.7, teniendo el Ct del control positivo 27.7; resultando la muestra positivo al genotipo 1.

**Grafico 04:** Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 16 del distrito de Huarucondo



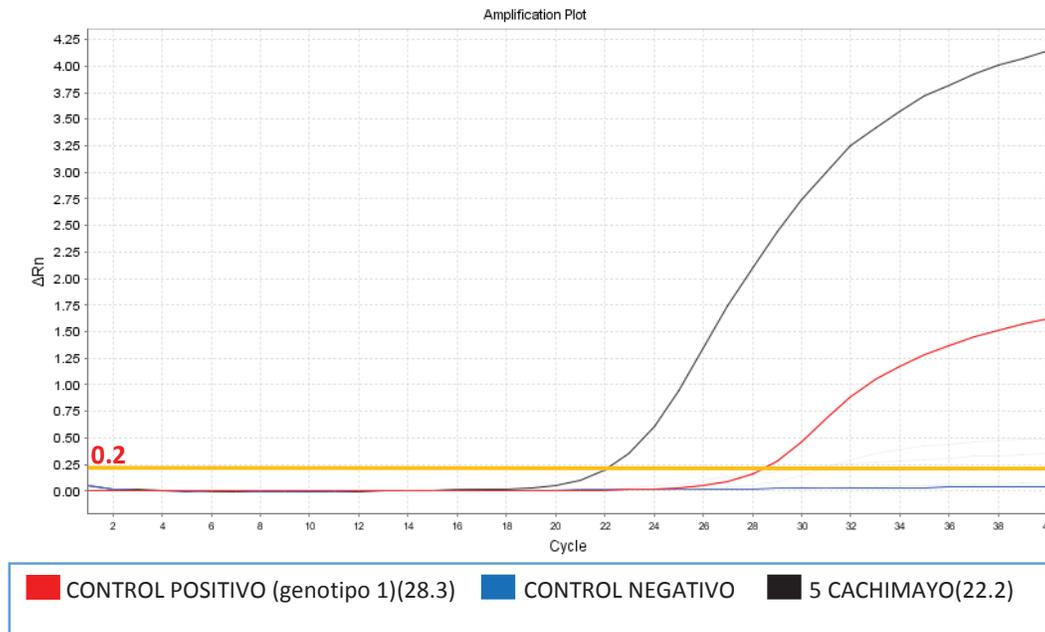
En el gráfico 4 se muestra la amplificación del genotipo 1 de la muestra 16 del distrito de Huarucondo, siendo su Ct (Ciclo umbral) 24.4, teniendo el Ct del control positivo 28.3; resultando la muestra positivo al genotipo 1.

**Grafico 05:** Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 43 del distrito de Cachimayo



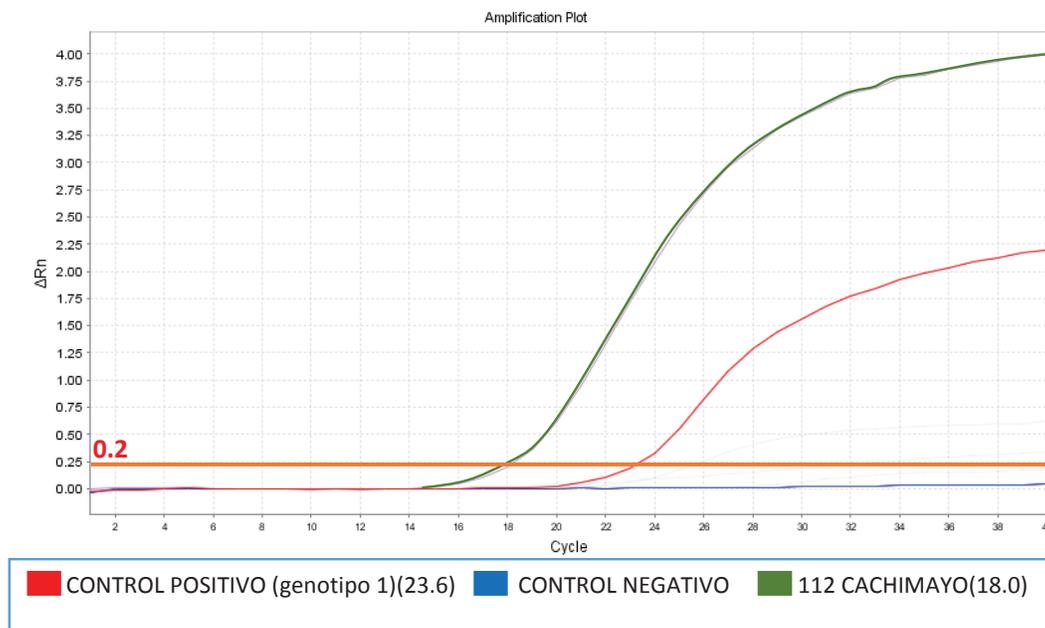
En el gráfico 5 se muestra la amplificación del genotipo 1 de la muestra 43 del distrito de Cachimayo, siendo su Ct (Ciclo umbral) 24.5, teniendo el Ct del control positivo 28.3; resultando la muestra positivo al genotipo 1.

**Grafico 06:** Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 5 del distrito de Cachimayo



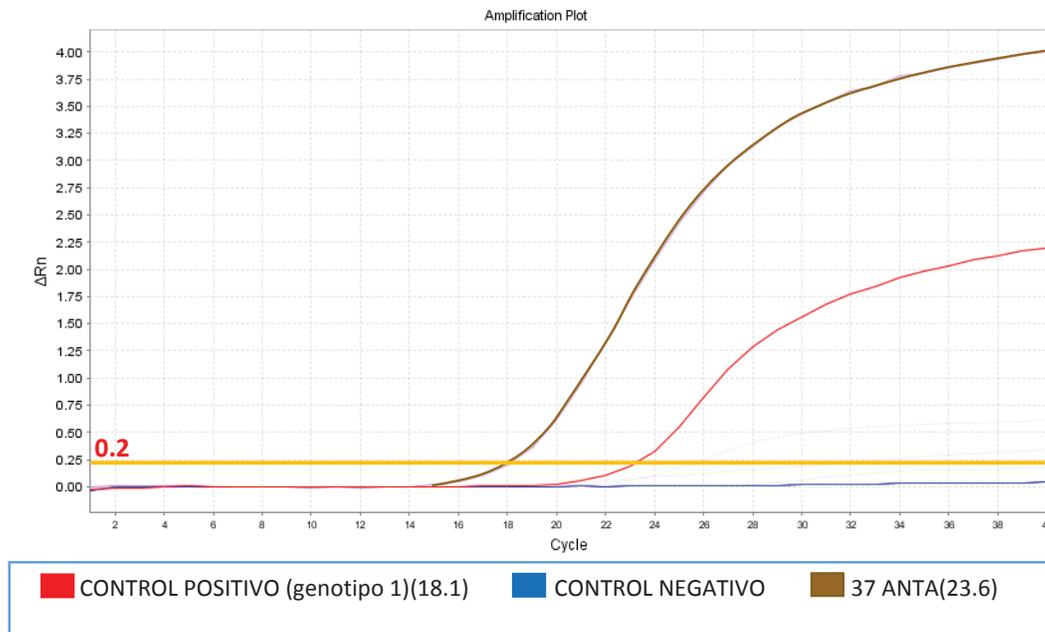
En el gráfico 6 se muestra la amplificación del genotipo 1 de la muestra 5 del distrito de Cachimayo, siendo su Ct (Ciclo umbral) 22.2, teniendo el Ct del control positivo 28.3; resultando la muestra positivo al genotipo 1.

**Grafico 07:** Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 112 del distrito de Cachimayo



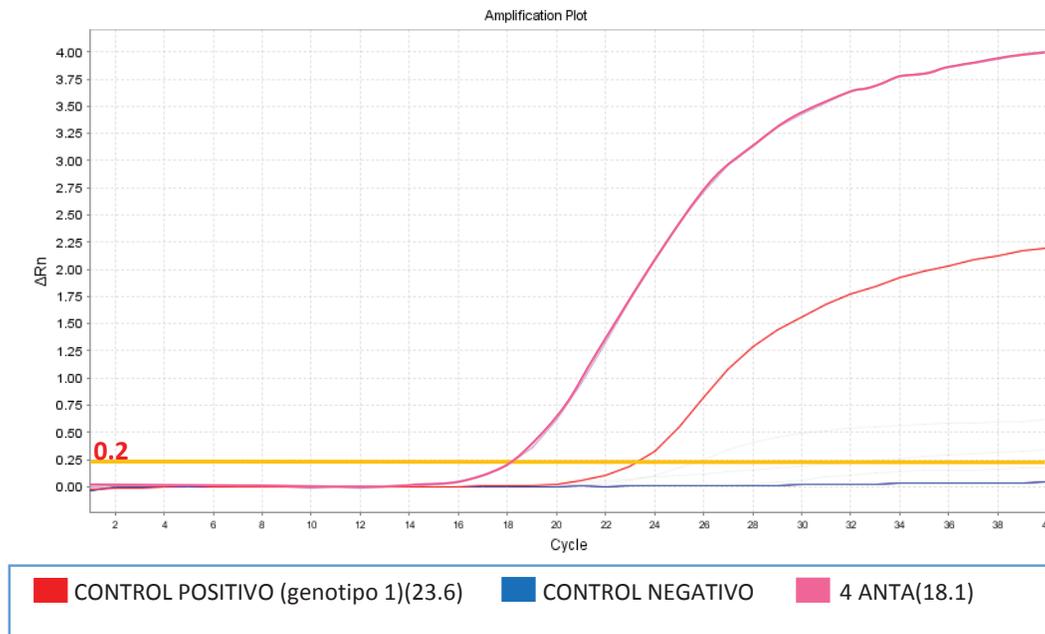
En el gráfico 7 se muestra la amplificación del genotipo 1 de la muestra 112 del distrito de Cachimayo, siendo su Ct (Ciclo umbral) 18.0, teniendo el Ct del control positivo 23.6; resultando la muestra positivo al genotipo 1.

**Grafico 08:** Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 37 del distrito de Anta



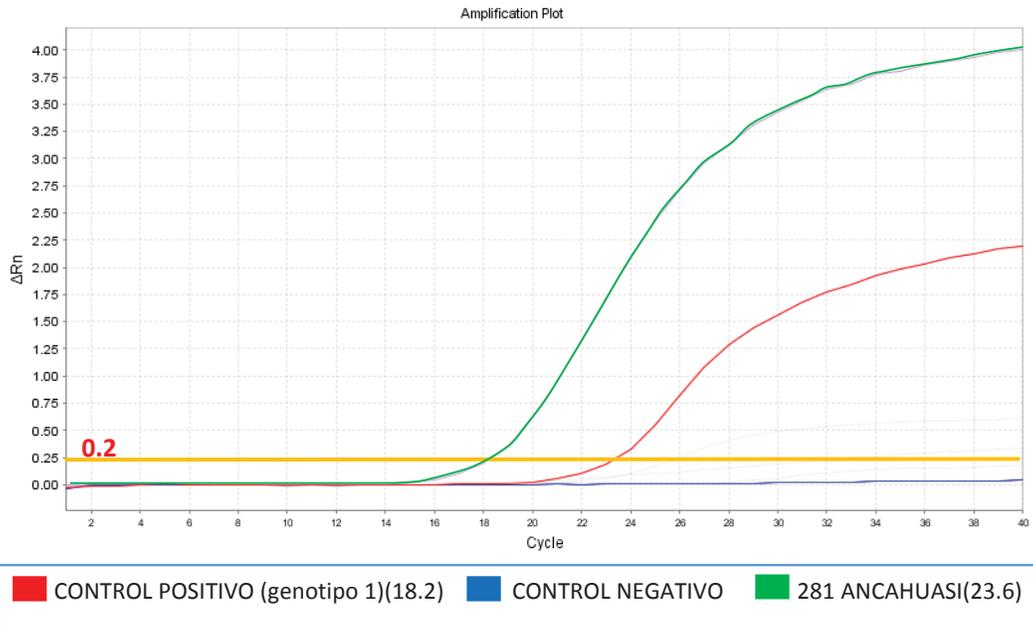
En el gráfico 8 se muestra la amplificación del genotipo 1 de la muestras 37 del distrito de Anta, siendo su Ct (Ciclo umbral) 23.6, teniendo el Ct del control positivo 18.1; resultando la muestra positivo al genotipo 1.

**Grafico 09:** Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1), de la muestra 16 del distrito de Anta



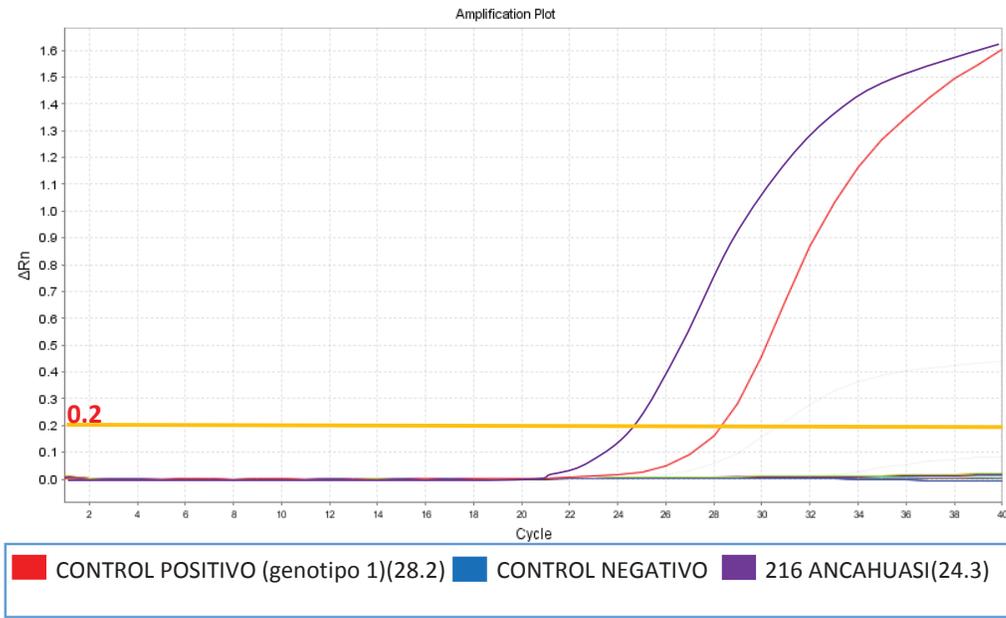
En el gráfico 9 se muestra la amplificación del genotipo 1 del distrito de Anta de la muestra 4, siendo su Ct (Ciclo umbral) 18.1, teniendo el Ct del control positivo 23.6; resultando la muestra positivo al genotipo 1.

**Grafico 10:** Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 281 del distrito de Ancahuasi



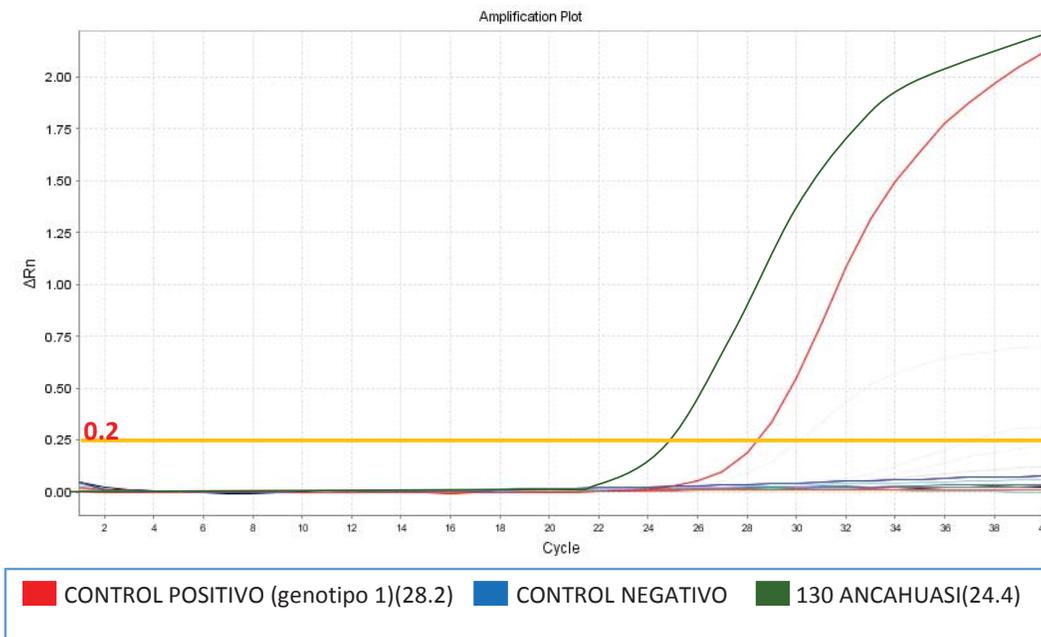
En el gráfico 10 se muestra la amplificación del genotipo 1 de la muestra 281 del distrito de Ancahuasi, siendo su Ct (Ciclo umbral) 23.6, teniendo el Ct del control positivo 18.2; resultando la muestra positivo al genotipo 1.

**Grafico 11:** Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 216 distrito Ancahuasi



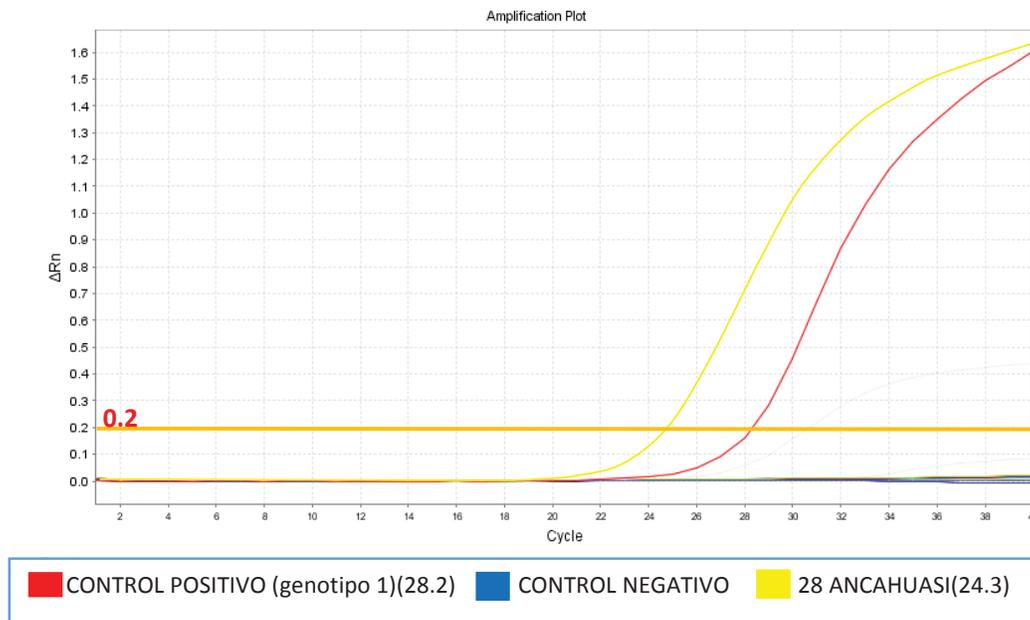
En el gráfico 11 se muestra la amplificación del genotipo 1 de la muestra 216 del distrito de Ancahuasi, siendo su Ct (Ciclo umbral) 24.3, teniendo el Ct del control positivo 28.2; resultando la muestra positivo al genotipo 1.

**Grafico 12:** Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 130 del distrito Ancahuasi



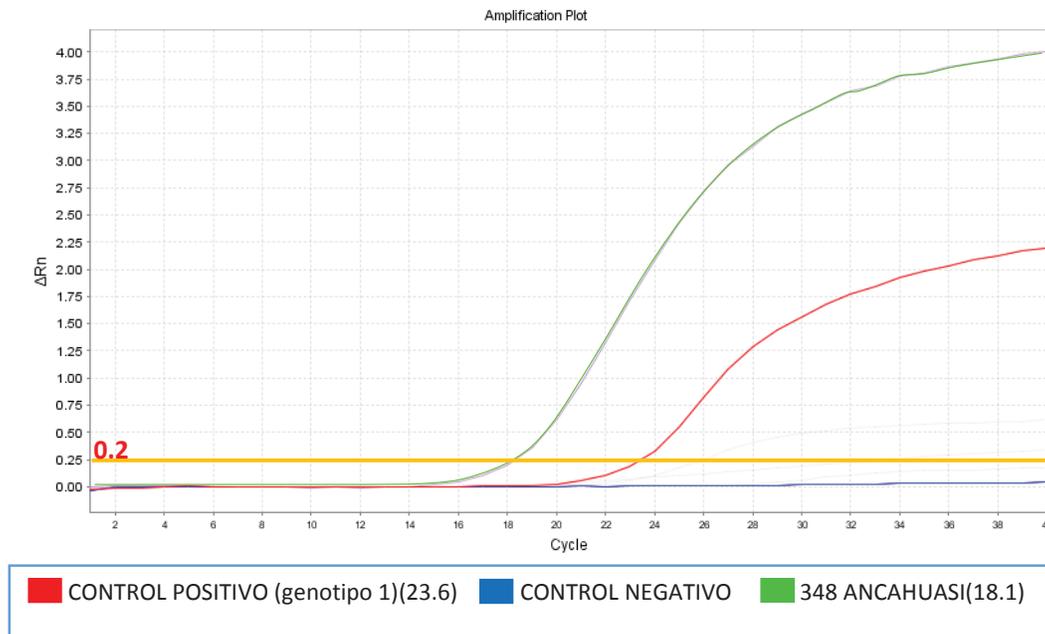
En el gráfico 12 se muestra la amplificación del genotipo 1 de la muestras 130 del distrito de Ancahuasi, siendo su Ct (Ciclo umbral) 24.4, teniendo el Ct del control positivo 28.2; resultando la muestra positivo al genotipo 1.

**Grafico 13:** Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 16 del distrito de Ancahuasi



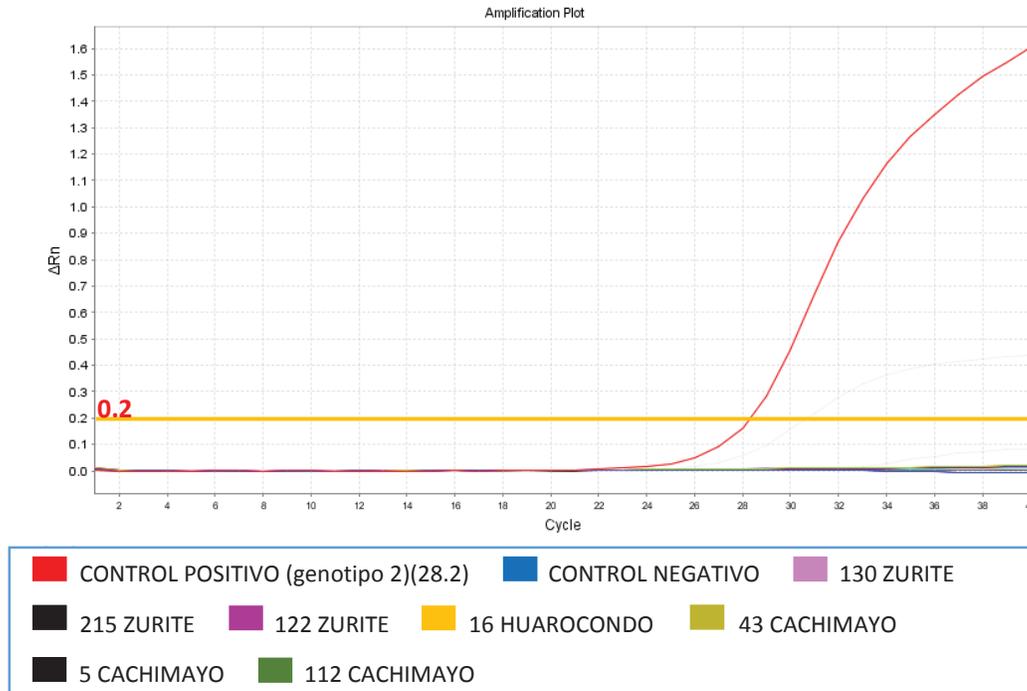
En el gráfico 13 se muestra la amplificación del genotipo 1 de la muestras 28 del distrito de Ancahuasi, siendo su Ct (Ciclo umbral) 24.3, teniendo el Ct del control positivo 28.2; resultando la muestra positivo al genotipo 1.

**Grafico 14:** Resultado del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) de la muestra 16 del distrito de Ancahuasi



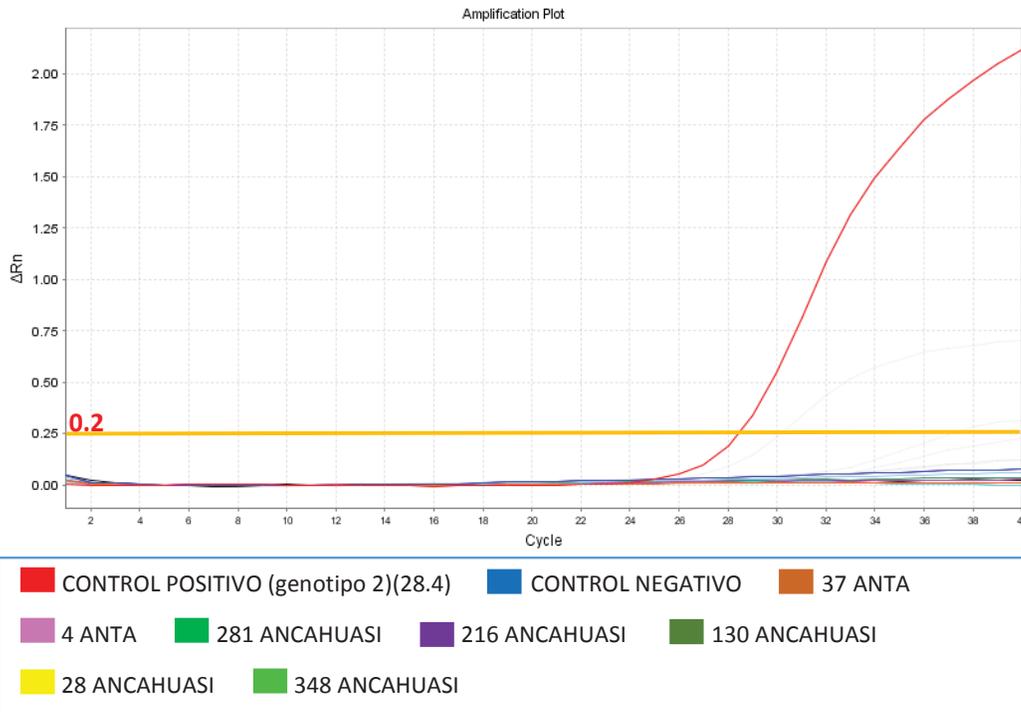
En el gráfico 14 se muestra la amplificación del genotipo 1 de la muestras 348 del distrito de Ancahuasi, siendo su Ct (Ciclo umbral) 18.1, teniendo el Ct del control positivo 23.6; resultando la muestra positivo al genotipo 1.

**Grafico 15:** Resultado del genotipo 2 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-2), de la muestra 130; 215; 122 del distrito de Zurite, 16 del distrito de Huarcocondo y 43; 5; 112 del distrito de Cachimayo



En el gráfico 15 se muestra la amplificación del genotipo 2 de las muestras 130; 215; 122 del distrito de Zurite, de la muestra 16 del distrito de Huarcocondo, de las muestras 43; 5; 112 del distrito de Cachimayo, los cuales fueron negativos por que no presentaron señal fluorescencia, teniendo el Ct del control positivo 28.2; resultando las muestras negativo al genotipo 2.

**Grafico 16:** Resultado del genotipo 2 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-2), de las muestras 37; 4 del distrito de Anta, las muestras 281; 216; 130; 28; 248 del distrito Ancahuasi



En el gráfico 16 se muestra la amplificación del genotipo 2 de las muestras 37; 4 del distrito de Anta, de las muestras 281; 216; 130; 28; 248 del distrito de Ancahuasi, los cuales fueron negativos por que no presentaron señal de fluorescencia, teniendo el Ct del control positivo 28.2; resultando las muestras negativo al genotipo 2.

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **5.1 CONCLUSIONES**

1. En las 14 muestras evaluadas se determinó la presencia del genotipo 1 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-1) y la ausencia del genotipo 2 del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB-2), en vacas de la pampa de Anta de la Región del Cusco.

## **5.2 RECOMENDACIONES.**

1. Basándonos en los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se recomienda eliminar a los animales Persistentemente Infectados (PI) ya que son los principales focos de diseminación del Virus de la Diarrea Viral bovina.
2. Basándonos a los resultados obtenidos en este trabajo se recomienda crear una vacuna específico contra el genotipo presente en el Perú para tener un control de la enfermedad.
3. Implementar medidas de bioseguridad manteniendo a los animales adquiridos por los pobladores en cuarentena, para evitar la propagación de la enfermedad.
4. Realizar charlas o capacitaciones a las poblaciones para brindar un mayor conocimiento de la enfermedad.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Alvarez., R. P. (2002).** Detección de anticuerpos contra pestivirus en rumiantes de una comunidad campesina de la provincia de Canchis, Cusco. Rev. Inv. Vet., Perú., 13 (3), 46-51.
2. **Araínga., R. H. (2010).** Fenotipo y genotipo del virus de la diarrea viral aislado de bovinos en el Perú. Rev. Inv. Vet. Perú., 21 (2), 192-203.
3. **Baker. (1995).** The clinical manifestations of bovine diarrhea infections. Vet Clin Noeth Am Food Anim Pract, 425-446.
4. **Becher, P., Orlich, M., Shannon, A.D., Horner, G., Konig, M., Thiel, H.J., 1997.** Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. The Journal of general virology 78 (Pt 6), 1357-1366.
5. **Bolin. (1995).** The pathogenesis of mucosal disease. In: Bovine viral diarrhoea virus. Vet Clin Food Anim., 20, 51-68.
6. **Brownlie., H. T. (1998).** Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV)- the pestivirus. Clin and Diag Viral., 10, 141-150.
7. **Carman S, Van Dreumel T, Ridpath J, Hazlett M, Alves D, Dubovi E, Tremblay R, Bolin S, Godkin A, Anderson N. (1998).** Severe acute Bovine Viral Diarrhea in Ontario. J Vet Diagn Invest, 10: 27-35.
8. **Contreras. (2000).** Prevalencia del VDVB en la cuenca lechera del valle del Mantaro. Rev. Inv. Pec. IVITA.

9. **Corapi WV, Elliott RD, Frech TW, Arthur DG, Bezek DM, Dubovi EJ. 1990.** Trombocitopenia and hemorrhages in veal calves infected with Bovine Viral Diarrhea Virus. *J Am Vet Med Assoc* 196:590-596.
10. **Deregt., & Loewen. (1995).** Bovine viral diarrhoea virus: biotypes and disease. *Conf OIE* 147-156.
11. **Donis. (1995).** Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host., *Vet Clin North Amer*, 11: 393.
12. **Dubovi. (1994).** Impact of bovine viral diarrhoea virus on reproductive performance in cattle., *Vet. Med*, 91: 867-872.
13. **Duffel., S. B. (1986).** Financial loss resulting from BVD-MD virus infection in a dairy herd., *Vet Rec*, 117: 240-245.
14. **Edwards., D. B. (1987).** Prevalence of bovine virus diarrhoea virus viraemia.
15. **Fray. (1998).** Immunohistochemical evidence for the localization of bovine viral diarrhoea virus, a single - stranded RNA virus, in ovarian oocytes in the cow., *Vet Pathol*, 35: 253-259.
16. **Fredriksen. (1999).** Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine viral diarrhoea virus., *The Vet Record*, 30: 11-114.
17. **Glew. (2001).** Antigen-presenting cells from calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, a member of the flaviviridae, are not compromised in their ability to present viral antigen., *J Gen Virol*, 82: 1677-1685.

18. **Gollán., C. P. (2006).** Aislamiento y caracterización del virus de la diarrea viral bovina en un ternero con síndrome purpúrico. Med. Vet. Argentina.
19. **Grahn. (1984).** Nature of early reproductive failure caused by bovine viral diarrhoea virus., JAVMA 185: 429-432.
20. **Grooms. (1998).** Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus in the ovaries of cattle acutely infected with Bovine viral diarrhoea virus., J Vet Diagn Invest, 10: 125-129.
21. **Houe. (1995).** Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. Vet. Din. North Am. Food Anim., 20 (1), 30-40.
22. **Houe. (1999).** Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections., Vet Microbiol, 64: 89-107.
23. **Inei.** IV Censo Nacional Agropecuario 2012.
24. **Jones L, Zandomeni R, Weber L.2001.** Genetic typing of Bovine Viral Diarrhoea Virus isolates from Argentina. VetMicrobiol, 81: 367-375.
25. **Jubb. (1993).** Pathology of domestic animals., Fourth edition. London. Academic press Inc, 2: 149-158.
26. **Kelling. (1996).** The effects of BVDV infection on cattle., Vet. Med, 91: 862-863.
27. **Kümmerer., T. B. (2000).** The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses., Vet Microbiol 77: 117-128.

28. **Lambot. (1997).** Characterization of immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus., J Gen Virol, 78: 1041-1047.
29. **Lambot. (1998).** Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes., J Gen Virol, 79: 1745-1749.
30. **Lindberg. (1999).** Principles for eradication of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle populations., Vet Microbiol, 64: 197.222.
31. **Mars., B. O. (1999).** Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions., Vet Microbiol, 66: 197-207.
32. **Moennig. (1995).** Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. In: Bovine Viral Diarrhoea Virus., Vet Clin Noth Am: Food Anim Pract 11 (3): 477-487.
33. **Moennig, V., Plagemann, P.G., 1992.** The pestiviruses. Adv Virus Res 41, 53-98.
34. **Morrell., G. O. (2014).** Diarrea viral bovina: presentación de casos clínicos y evaluación de disversas tecnicas para el diagnostico. Rev. Inv. Vet. Argentina.
35. **Mullis. (1990).** The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American.

36. **Murray. (1991).** Lesions in aborted bovine fetuses and placenta associated with bovine viral diarrhoea virus infection., Arch Virol (Suppl 3): 217-224.
37. **Nakamura, S., Sakamoto, K., Sakoda, Y., Shimazaki, T., Inoue, Y., Ogawa, N., Fukusho, A., 1997.** Variation from cytopathogenic biotype to non-cytopathogenic biotype is correlated with the deletion of cellular sequence from bovine viral diarrhea viruses. J Vet Med Sci 59, 361-370.
38. **Paton. (1995).** Pestivirus diversity., J Comp Path 112: 215-236.
39. **Pedreira., R. R. (2008).** Diarrea Virica Bovina: Etiologia, Formas clinicas, Distribucion del Virus y Patologias. Real Academia Veterinarias de Andalucia Oriental., 20(1), 135-158.
40. **Pellerin C, van den Hurk J, Lecomte J, Tijssen P. 1994.** Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreak and high mortalities. Virology, 203: 260-268.
41. **Pizarro-Lucero J, Celedon M, Aguilera M, de Calisto A. 2006.** Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. Vet Microbiol 115: 208-217.
42. **Potgieter. (1995).** Immunology of Bovine viral Diarrhea virus., Veterinary Clinics of America Food Animal: Food Animal Practice 11 (3): 501-520.
43. **Ridpath. (2003).** BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control., Biologicals 31: 127-131.
44. **Ridpath, J.F., Bendfeldt, S., Neill, J.D., Liebler-Tenorio, E., 2006.** Lymphocytopathogenic activity in vitro correlates with high virulence in

vivo for BVDV type 2 strains: Criteria for a third biotype of BVDV. Virus research 118, 62-69.

45. **Rivera. (1993).** El virus de la diarrea viral bovina (DVB)., Rev. Inv. Pec. IVITA (PERÚ), 6 (1): 1-7.
46. **Rivera. (2001).** Etiología infecciosa del aborto bovino., Rev. Inv. Vet., Perú. Supl (1): 95-99.
47. **Rivera. (2003).** Prevalencia del virus de la diarrea viral bovina y animales portadores del virus en un hato lechero del valle del Mantaro. Rev. Acad. Peru., Rev Inv Vet Peru 19 (1): 93-112.
48. **SENAMHI. (2010).** Caracterización Agroclimática de la Región Cusco. In Programa de Adaptación al Cambio Climático PACC - Perú.
49. **Spanakis. (1993).** Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. Nucleic Acids Research., Nucleic Acids Res. Aug 11; 21(16): 3809–3819.
50. **Stahl., B. F. Z. R. R. B. M. (2009).** Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from Peru and Chile, Pesq. Vet. Bras 29(1): 41-44, janeiro 2009.
51. **Tizard. (2002).** Inmunología Veterinaria. Sexta edición. Mc Graw Hill Interamericana Mexico.
52. **Tremblay. (1996).** Transmission of bovine viral diarrhoea virus., Vet Med 9: 858-866.

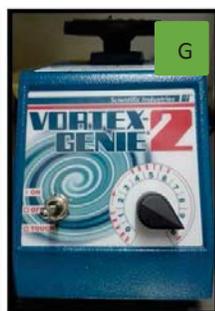
53. **Vanroose., N. S. (1998).** Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in zon-free and zon-intact in vitro-produced bovine and the effect on embryo quality., *Biology of reproduction* 58: 857-866.
54. **Walz, P.H., Grooms, D.L., Passler, T., Ridpath, J.F., Tremblay, R., Step, D.L., Callan, R.J., Givens, M.D., 2010.** Control of bovine viral diarrhea virus in ruminants. *J Vet Intern Med* 24, 476-486.
55. **Weller., E. S. (2000).** Detec-tion of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*.
56. **Zanabria., R. R. (2000).** Etiología del síndrome neumónico agudo en vacunos de engorde en Lima. *Rev. Inv. Vet., Perú*.
57. <http://homepage.usask.ca/~vim458/virology/studpages2007/AshleyB/bvdvvirus.html>, 2007

# ANEXOS

**Anexo 01:** Ambiente de Reacción de la Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT- PCR)



**Anexo 02:** Materiales para la extracción del material genético y detección del genotipo del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB)



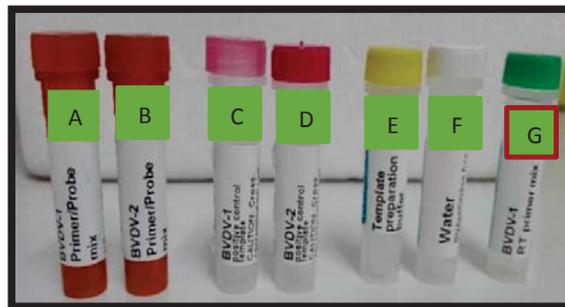
(A. Lentes, B. Mandil descartable, C. gorro, D. Barbijo, E. Guantes de latex, F. Cabina de bujo laminar, G. Vortex, H. Pipetas, I. Tips esteriles, J. Multi portador de tubo para el vortex, K. Rack magnetico, L. Viales criogénicos).

### Anexo 03: Reactivos para la extracción de material genético



A. Wash solution 1, B. Wash solution 2, C. Lysis solution, D. Binding solution, E. Elution buffer, F. Magnetic beads, G. Proteinase K (Los reactivos mantener a T° ambiente).

### Anexo 04: Reactivos para la identificación del genotipo del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB)



A. BVDV1 primer/probe mix, B. BVDV2 primer/probe mix, C. BVDV1 positive control template, D. BVDV2 positive control template, E. Template preparation buffer, F. RNase/DNase free water, G. BVDV1 and BVDV2 RT primer mix (los reactivos mantener en hielo durante todo el proceso).

**Anexo 05:** Registro de vacunos Persistentemente Infectados (PI) de los distritos de Anta, Ancahuasi, Huaracocondo, Cachimayo y Zurite.

### DISTRITO DE ZURITE

#### Mayores a 6 meses

N°	SECTOR	NOMBRE/PROPIETARIO	N° MUESTRA	NOMBRE / ANIMAL	DENSIDAD OPTICA	COCIENTE M/P	DIAGNOSTICO
7	Ancachuro		130	s/n	0.618	0.3175	POSITIVO
119	Ancachuro	Santusa Succno Paguada	215	Blanca	0.519	0.3108	POSITIVO
182	Tambo Real	Doris Sinchi	122	Candy	0.504	0.2244	POSITIVO

### DISTRITO DE HUAROCONDO

#### 3 - 4 Años

N°	SECTOR	NOMBRE/PROPIETARIO	N° MUESTRA	NOMBRE / ANIMAL	DENSIDAD OPTICA	COCIENTE E M/P	DIAGNOSTICO
1	Rawanqui	Comunidad	16	Dalmata chata cachuda	0.754	0.4736	POSITIVO

**DISTRITO DE CACHIMAYO**

<b>1 - 2 Años</b>							
<b>N°</b>	<b>SECTOR</b>	<b>NOMBRE/ PROPIETARIO</b>	<b>N° MUESTRA</b>	<b>NOMBRE / ANIMAL</b>	<b>DENSIDAD OPTICA</b>	<b>COCIENTE M/P</b>	<b>DIAGNOSTICO</b>
12	Alamos	Walter Curi La Torre	43	Cria de Rosa	0.477	0.1657	<b>POSITIVO</b>

<b>2 - 3 Años</b>							
<b>N°</b>	<b>SECTOR</b>	<b>NOMBRE/ PROPIETARIO</b>	<b>N° MUESTRA</b>	<b>NOMBRE / ANIMAL</b>	<b>DENSIDAD OPTICA</b>	<b>COCIENTE M/P</b>	<b>DIAGNOSTICO</b>
15	Quinta Cajamarca	Johan Paucarmayta Becerra	5	Rosi	0.557	0.2857	<b>POSITIVO</b>

<b>5 - 6 Años</b>							
<b>N°</b>	<b>SECTOR</b>	<b>NOMBRE/ PROPIETARIO</b>	<b>N° MUESTRA</b>	<b>NOMBRE / ANIMAL</b>	<b>DENSIDAD OPTICA</b>	<b>COCIENTE M/P</b>	<b>DIAGNOSTICO</b>
36	Granja 3	Leon Salas Carlos	112	Gilberta	0.451	0.1631	<b>POSITIVO</b>

**DISTRITO DE ANTA**

<b>4 - 5 Años</b>							
<b>N°</b>	<b>SECTOR</b>	<b>NOMBRE/ PROPIETARIO</b>	<b>N° MUESTRA</b>	<b>NOMBRE / ANIMAL</b>	<b>DENSIDAD OPTICA</b>	<b>COCIENTE M/P</b>	<b>DIAGNOSTICO</b>
9	Compone	Hilario Cantoy Vargas	37	Bartola	0.616	0.5300	<b>POSITIVO</b>

**2 - 3 Años**

N°	SECTOR	NOMBRE/ PROPIETARIO	N° MUESTRA	NOMBRE / ANIMAL	DENSIDAD OPTICA	COCIENTE M/P	DIAGNOSTICO
14	Occoruro	Camilla Ana Maria	4	Pancha	0.851	0.5850	POSITIVO

**DISTRITO DE ANCAHUASI****Mayores a 6 meses**

N°	SECTOR	NOMBRE/ PROPIETARIO	N° MUESTRA	NOMBRE / ANIMAL	DENSIDAD OPTICA	COCIENTE M/P	DIAGNOSTICO
5	Catañiray	Hermelinda Castillo Bañares	281	Rosa	0.559	0.4336	POSITIVO

**2 - 3 Años**

N°	SECTOR	NOMBRE/ PROPIETARIO	N° MUESTRA	NOMBRE / ANIMAL	DENSIDAD OPTICA	COCIENTE M/P	DIAGNOSTICO
12	Ichubamba	Franklin Ccancha	216	Flora	0.888	0.3040	POSITIVO
15	Asoc. Misti Socomarca	Yoni Mendoza A.	130	Fany	0.553	0.1560	POSITIVO
125	Catañiray	Arturo Ccapcha Kunchu	348	Nicolasa	0.645	0.3485	POSITIVO

**1 - 2 Años**

N°	SECTOR	NOMBRE/ PROPIETARIO	N° MUESTRA	NOMBRE / ANIMAL	DENSIDAD OPTICA	COCIENTE M/P	DIAGNOSTICO
103	San Martin	Cirila Huallparimachi	28	Justina	0.834	0.2801	POSITIVO

