



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

Determinación molecular del virus de la diarrea viral bovina mediante RT-PCR en bovinos de la provincia de El Oro

**CORDOVA LAZO GABRIEL EDUARDO
MEDICO VETERINARIO**

**MACHALA
2024**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**Determinación molecular del virus de la diarrea viral bovina
mediante RT-PCR en bovinos de la provincia de El Oro**

**CORDOVA LAZO GABRIEL EDUARDO
MEDICO VETERINARIO**

**MACHALA
2024**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TRABAJOS EXPERIMENTALES

**Determinación molecular del virus de la diarrea viral bovina
mediante RT-PCR en bovinos de la provincia de El Oro**

**CORDOVA LAZO GABRIEL EDUARDO
MEDICO VETERINARIO**

AGUILAR GALVEZ FERNANDO LENIN

**MACHALA
2024**

DETERMINACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA MEDIANTE RT- PCR EN BOVINOS DE LA PROVINCIA DE EL ORO

por Gabriel Eduardo Córdova Lazo

Fecha de entrega: 12-ago-2024 02:16p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2431179386

Nombre del archivo: iarrea_viral_bovina_mediante_RT-PCR_en_bovinos_de_la_provin.docx (44.15K)

Total de palabras: 4311

Total de caracteres: 22737

DETERMINACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA MEDIANTE RT-PCR EN BOVINOS DE LA PROVINCIA DE EL ORO

INFORME DE ORIGINALIDAD

9%

INDICE DE SIMILITUD

9%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unjbg.edu.pe Fuente de Internet	1%
2	www.ueb.edu.ec Fuente de Internet	1%
3	scielo.iics.una.py Fuente de Internet	1%
4	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	repositorio.utmachala.edu.ec Fuente de Internet	1%
6	1library.co Fuente de Internet	1%
7	lookformedical.com Fuente de Internet	1%
8	bmeditores.mx Fuente de Internet	<1%

9	www.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
10	docplayer.es Fuente de Internet	<1 %
11	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	<1 %
12	fdocuments.ec Fuente de Internet	<1 %
13	repositorio.utc.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
14	pt.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
15	ddd.uab.cat Fuente de Internet	<1 %
16	dokumen.pub Fuente de Internet	<1 %
17	starmedia.mundopadres.com Fuente de Internet	<1 %
18	Andrea Pecora, Darío A. Malacari, María S. Pérez Aguirreburualde, Demian Bellido et al. "Development of an enhanced bovine viral diarrhea virus subunit vaccine based on E2 glycoprotein fused to a single chain antibody which targets to antigen-presenting cells", Revista Argentina de Microbiología, 2015	<1 %

19

hdl.handle.net

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Apagado

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

El que suscribe, CORDOVA LAZO GABRIEL EDUARDO, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado Determinación molecular del virus de la diarrea viral bovina mediante RT-PCR en bovinos de la provincia de El Oro, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.



CORDOVA LAZO GABRIEL EDUARDO

0751017559

DEDICATORIA

"A mis padres, por su amor incondicional, apoyo constante y sacrificio inquebrantable. A mis amigos, por su ánimo y comprensión en los momentos difíciles. A mis profesores, por su guía y conocimiento compartido. A todos aquellos que han sido parte de este viaje académico, gracias por acompañarme en este camino hacia el conocimiento y el crecimiento personal."

RESUMEN

El presente estudio se enfoca en la identificación molecular del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en bovinos de la provincia de El Oro, Ecuador, utilizando la técnica de RT-PCR. La diarrea viral bovina es una enfermedad altamente contagiosa que afecta significativamente la productividad y salud reproductiva del ganado, causando pérdidas económicas considerables. La investigación se centró en estandarizar la técnica molecular de RT-PCR para el diagnóstico del VDVB.

Se muestrearon varias haciendas en la provincia de El Oro y se analizaron las muestras para determinar la presencia del VDVB. Los resultados revelaron una prevalencia del 29% en la Provincia, identificando la presencia del VDVB en animales que, aunque no presentaban síntomas evidentes, eran portadores y contribuían a la diseminación del virus.

Este estudio subraya la importancia de implementar técnicas moleculares precisas como la RT-PCR para mejorar la detección y control del VDVB, especialmente en animales PI que pueden pasar desapercibidos con métodos tradicionales. La estandarización de esta técnica en Ecuador podría establecerse como un "Gold Standard" para el diagnóstico del VDVB.

Palabras clave. - RT-PCR, VDVB, animales PI, molecular, gold standard

ABSTRACT

This study focuses on the molecular identification of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in cattle from the province of El Oro, Ecuador, using the RT-PCR technique. Bovine viral diarrhea is a highly contagious disease that significantly impacts livestock productivity and reproductive health, leading to considerable economic losses. The research aimed to standardize the RT-PCR molecular technique for diagnosing BVDV. Several farms in the province of El Oro were sampled, and the samples were analyzed to determine the presence of BVDV. The results revealed a prevalence of 29% in the province, identifying the presence of BVDV in animals that, although not showing evident symptoms, were carriers and contributed to the spread of the virus.

This study underscores the importance of implementing precise molecular techniques like RT-PCR to improve the detection and control of BVDV, especially in PI animals that may go unnoticed with traditional methods. The standardization of this technique in Ecuador could be established as the "Gold Standard" for BVDV diagnosis.

Keywords.- RT-PCR, VDVB, PI animals, molecular, gold standard

CONTENIDO

INTRODUCCION	10
Problemática	11
Objetivo General	12
Objetivo Especifico	12
Justificación	12
Diarrea viral bovina	13
Etiología.....	13
Clasificación Y Taxonomía	14
Distribución geográfica	15
Transmisión	16
Sintomatología.....	17
Problemas reproductivos	18
Animales persistentemente infectados (PI)	20
Prevención y control	21
Métodos de diagnostico	23
Detección de anticuerpos	24
Aislamiento viral.....	25
Inmunohistoquímica.....	25
RT-PCR para detección de ARN viral	25
MATERIALES Y METODOS	28
Determinación de la Población y muestra	29
Cálculo del tamaño de la muestra:	29
Población.....	30
Materiales y equipos	30
Materiales para la toma de muestra	30
Materiales para trabajar en laboratorio	30
Medición de las variables	31
Procedimiento del ensayo.....	31
Toma de la muestra	32
Procesamiento de la muestra	32
Extracción de ARN.....	32

Primers.....	34
Transcripción Reversa	35
Preparación de la RT-MIX DVB.....	35
Reacción en cadena de la polimerasa	35
Preparación de la PCR mix	35
Preparación de Agarosa al 2 %:	36
Estadística	37
RESULTADOS.....	38
Determinar la presencia del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en hatos ganaderos de la Provincia de El Oro.	38
Distribución de la positividad VDVB de acuerdo con el sitio de procedencia	39
Estandarización de la técnica molecular de RT-PCR convencional para el diagnóstico de VDVB.	41
Establecer factores de riesgo de la diarrea viral bovina mediante una encuesta..	43
Análisis de la variable Estado de vacunación.....	43
Análisis de la variable Distribución de las muestras por Cantón	44
Análisis de la variable Edad.....	45
Análisis de la variable Raza.....	46
Análisis de la variable Sexo	47
Asociación estadística de las variables.....	48
Edad de los animales positivos.....	48
Raza de los animales positivos.....	48
Sexo de los animales positivos.....	49
CONCLUSIÓN	51
RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXOS	58

INDICE DE IMÁGENES

Imagen 1.- Ubicacion geografica de los cantones muestreados.....	28
Imagen 2.- Preparación de un pool de 5 muestras	32
Imagen 3.- (A) Amplificación de la región 5'UTR del genoma del pestivirus, aproximadamente 201 pb. Carril 1 marcador molecular, carril 2 y 3 muestras positivas (201 pb). (B) El carril 1 y 3 muestran el producto obtenido con los primers 189 Foward y 389 Reverse para VDVB; el carril 2 muestra la escalera de 100 pb de marcador molecular.....	42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Proceso para la extraccion de ARN Zymo Research.....	34
Tabla 2.- Positividad en la provincia de El Oro	38
Tabla 3.- Resultados en los animales de cada cantón.....	40
Tabla 4.- Estado de vacunacion de los animales positivos.....	43
Tabla 5.- Distribucion de la positividad por Cantón.....	44
Tabla 6.- Distribucion de la positividad por edad	45
Tabla 7.- Distribución de la positividad por raza	46
Tabla 8.- Distribucion de la positividad por el sexo	47
Tabla 9.- Prueba de Chi-cuadrado para la edad y la positividad	48
Tabla 10.- Prueba de Chi-cuadrado para la raza y la positividad	49
Tabla 11.- Prueba de Chi-cuadrado para el sexo y la positividad.....	49

INTRODUCCION

La diarrea viral bovina es una patología endémica en la mayoría de países, siendo esta un gran problema en los hatos ganaderos del Ecuador ya que no solo afecta a los parámetros productivos de los animales, sino que también desmejora las características reproductivas de las hembras, siendo estas un pilar fundamental en el sistema de producción, que al ver su afectado sus parámetros reproductivos llega a causar grandes estragos en el funcionamiento del sistema de explotación ganadera. Este virus es de fácil diseminación y puede mantenerse por mucho tiempo en animales con un estado de reservorio, esto ocasiona que el virus tenga un impacto económico elevado ya que los contagios a nuevos animales que lleguen al hato ganadero se van a ver infectados y disminuirán su capacidad productiva y de conversión cárnica o producción de leche.

Debido a lo inespecífica patogenia y sinología clínica que ofrecen las infecciones por VDVB, se vuelve indispensable en su diagnóstico usar pruebas de laboratorio que puedan identificar la presencia del virus o los anticuerpos generados por el organismo. Las pruebas estándar que se usan para la confirmación de la enfermedad son el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en ingles), y protocolos de cultivos celulares, estos ensayos tienen la gran desventaja de llegar a proporcionar varios resultados erróneos por lo susceptibles que son a la contaminación, sobre todo el cultivo celular.

En Ecuador, muy poco se ha incursionado en técnicas diagnósticas diferentes a las inmunoenzimáticas, por lo tanto, para un mejor diagnóstico se debe empezar a normalizar y estandarizar pruebas moleculares, en este caso hablamos de la RT-PCR(transcripción reversa), esto ayudaría mucho a dar diagnósticos mucho más precisos en cuanto a la especificidad y sensibilidad de la prueba, esto tomaría en

cuenta también ah animales persistentemente infectados (PI) que generalmente no se pueden identificar con exámenes inmunoenzimaticos como el ELISA.

Problemática

La diarrea viral bovina es causada por un Pestivirus que tiene una alta capacidad de mutación, esta variabilidad genética que presenta el virus hace que las pruebas diagnósticas más comunes en Ecuador como pueden ser las ELISA tengan un gran problema al detectar animales verdaderamente positivos. Así mismo, este virus se caracteriza por generar animales persistentemente infectados (PI) que son reservorios y ayudan a la diseminación de la enfermedad, generalmente los laboratorios tienen problemas con el diagnóstico de este grupo de animales al usar las técnicas convencionales de detección de anticuerpos.

El virus de la diarrea viral bovina tiene gran impacto en las producciones cárnicas y lecheras ya que puede generar animales persistentemente infectados, siendo así indispensable implementar técnicas de diagnóstico adecuadas, como la Rt-PCR, para la determinación de la presencia del virus en las explotaciones ganaderas.

Esta prueba de Rt-PCR toma relevancia porque es capaz de determinar la presencia del virus como tal en animales que ya no presentan síntomas, pero aun así siguen siendo portadores y una fuente importante para la diseminación de la enfermedad.

Objetivo General

Determinar la presencia del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en hatos ganaderos en la Provincia del Oro

Objetivo Especifico

- Identificar la presencia del virus de DVB en las ganaderías muestreadas
- Estandarizar la técnica molecular de RT-PCR convencional para el diagnóstico de VDVB
- Establecer factores de riesgo de la diarrea viral bovina mediante una encuesta

Justificación

La detección molecular por medio de la prueba de RT-PCR nos brinda una mayor sensibilidad al momento de diagnosticar animales con un nivel de viremia bajo pero que sirven como reservorio y fuente de transmisión, estos animales PI son detectables debido a la capacidad de la RT-PCR de trabajar con pequeñas cantidades de material genético.

De cara al futuro es necesario que pruebas diagnósticas como esta se estandaricen para la detección de VDVB en el país para así poder determinar inclusive la filogenia del virus ya que como se mencionó anteriormente este presenta una gran capacidad de mutación y variabilidad con diferentes características patogénicas.

Una vez estandarizada la técnica se puede dar paso a la utilización de la técnica como una “Gold Standard” para el diagnóstico del virus de la diarrea viral bovina en animales con cuadros patológicos, así como en animales PI, a su vez se podrían asociar de mejor manera esta positividad a los factores de riesgo que tiene la enfermedad.

Diarrea viral bovina

Esta es una enfermedad infectocontagiosa de origen vírico con una amplia distribución mundial, una de sus características es la de poder afectar a bovinos en cualquier etapa de desarrollo, desde su juventud hasta edades más avanzadas, afecta tanto al macho y a la hembra por igual y no distingue entre razas; esta patología se encuentra asociada, sobre todo, a la afectación de parámetros tanto reproductivos como productivos (1)

Dado a su fácil transmisión, y su alto impacto en los aspectos productivos y la salud del animal, esta enfermedad acarrea pérdidas económicas de gran importancia para la el ámbito ganadero mundial (1)

La diarrea viral bovina (DVB) es una de las principales enfermedades virales a nivel mundial, siendo endémica en muchos países incluidos el Ecuador. Debido a los grandes problemas reproductivos que trae consigo esta enfermedad, se la ha asociado a grandes pérdidas económicas a nivel mundial, impidiendo además la comercialización eh importación de ganado. (2)

Etiología

El virus causante de la diarrea viral bovina pertenece al género Pestivirus subclasificado en la familia Flaviviridae, este virus tiene una alta capacidad de variación genética lo que hace que sea difícil de clasificar, siendo así que se puede clasificar en varios genotipos y subgenotipos (3).

En este género podemos encontrar a varias especies virales como lo son el virus de la peste porcina clásica y el virus de la enfermedad de la frontera que ataca a los ovinos, también podemos incluir a los dos genotipos comunes del VDVB siendo estos los de tipo 1 y 2. Los agentes virales antes mencionados tienen entre si marcadas diferencias antigénicas, a su vez dentro del grupo de los genotipos 1 y 2 de la diarrea viral bovina nos encontramos con cepas que mantienen una amplia diversidad

biológica entre sí (3).

Teniendo en cuenta esta variabilidad, se han hecho estudios donde se crearon varias subdivisiones gracias de los análisis genéticos a los que se sometieron estos genotipos del VDVB. Los anticuerpos monoclonales de estos genotipos son los responsables de poder diferenciarlos de otros virus del género pestivirus y entre ellos, estos anticuerpos van dirigidos en contra de ciertas glucoproteínas conocidas como ERNS y E2 (4).

A nivel etiológico podemos decir que la mayor característica del virus de la diarrea viral bovina es su variabilidad y capacidad de mutación genética, está dado porque los virus de ARN tienen la propiedad de plasticidad lo que los hace tan adaptables a diferentes medios, esto está mediado por la ausencia de la exonucleasa necesaria para arreglar las bases que sufrieron alteraciones, esto ocasiona que muchas bases sean sustituidas provocando así las mutaciones genéticas, es mediante este mecanismo que el virus puede escapar a la respuesta inmune del huésped (5).

Clasificación Y Taxonomía

Los Pestivirus de la diarrea viral bovina se pueden dividir en 3 diferentes especies basándonos en sus variaciones genómicas, teniendo así, diarrea viral bovina tipo 1, diarrea viral bovina tipo 2 y una tercera variación llamada genotipo 3 o virus HoBi, esta última se considera relativamente nueva y con una baja incidencia a nivel mundial (6).

Dado a que la discusión sobre este nuevo genotipo es relativamente nueva, la preocupación su identificación se ha agrandado cada vez más sobre todo por el hecho de que los métodos diagnósticos se han diseñado en base y específicamente para los genotipos 1 y 2, dando así la gran posibilidad de que estos no sean eficientes para la detección del virus HoBi, dificultando así el conocer cuál es su verdadera

distribución alrededor del mundo (7)

Biotipo citopático y no citopático. Hablando más a fondo de sus características genómicas, tenemos que, cada uno de estos genotipos se pueden dividir en biotipos citopáticos y biotipos no citopáticos, esta división se realiza en base a la capacidad de estos virus de generar lisis en pruebas con cultivos celulares (8).

El biotipo no citopático es comúnmente el más diseminado en los hatos ganaderos del mundo, y se habla que a partir de este se pueden generar los biotipos citopáticos, los cuales son menos comunes y se les atribuye una infección subclínica o con pocos signos digestivos, respiratorios, reproductivos, etc. (9).

Distribución geográfica

La enfermedad de la diarrea viral bovina es endémica en las zonas donde hay una agrupación de rumiantes ya sean domésticos o silvestres, esta enfermedad data desde el año 1946 y desde entonces se la ha identificado en todos los continentes del planeta exceptuando la Antártida. Como se ha mencionado anteriormente, este virus tiene una alta capacidad de mutación, entre los varios genotipos se destaca el VDVB tipo 1 como el que tiene la más amplia distribución a nivel mundial (10).

Hablando sobre el continente europeo en general, encontramos que el virus de la diarrea viral bovina tipo se encuentra en aproximadamente el 40 y 80% del territorio continental. El virus tipo 1 se ha asociado a casi el 90% del territorio europeo, en contraste con la poca distribución del VDVB tipo 2 que solo se tienen reportes de aislamiento en países como Bélgica, Alemania, Holanda, Austria, Reino Unido (10).

En cuanto al contexto suramericano se tiene que los hatos de Chile, Uruguay, Perú, alcanzan porcentajes de seroprevalencia de 83, 100 y 96% respectivamente; por otro lado, a nivel de individuos en países como Venezuela, Argentina, Brasil y Ecuador tienen menores índices de seroprevalencia del virus, siendo estos de 42, 45, 72 y

36.2% respectivamente (10).

Entrando más a fondo en el contexto ecuatoriano referente al virus de la diarrea viral bovina, hay estudios que indican que la enfermedad está presente en el territorio desde el 2005. Se han reportado casos de DVB en un gran número de provincias del país, desatacando la provincia de Loja que tiene un porcentaje de seropositividad del 16,06%, mientras que las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas, Azuay, Tungurahua, Pichincha, Cotopaxi y Chimborazo en conjunto suman poco más del 30% de animales y el 74% de hatos seropositivos (11)

Transmisión

El VDVB es un virus con un gran margen de especies a las que infectan, todas estas pertenecientes al género artiodáctilo, aunque comúnmente se lo asocia mucho más con la transmisión entre bovinos domésticos causando en ellos cuadros subclínicos, agudos, crónicos, etc. (12).

Este virus tiene la capacidad de transmisión vertical, pudiendo ser de manera transplacentaria o inclusive por la ingesta de calostro, también se reportan infecciones durante la monta o en programas de inseminación artificial (13).

Otra forma de transmisión de este virus es la horizontal por culpa del contacto directo o indirecto de los animales, esto mediante las secreciones de todo tipo que eyectan los animales infectados. Existen a su vez varios factores que ayudan a la propagación del virus, tales como, el confinamiento en potreros comunes y la movilización de ganado infectado a diferentes sitios para su comercialización, de igual manera las fuentes de agua son una zona común donde gran cantidad de virus pueden acumularse e infectar a la población del hato ganadero (12).

Teniendo en cuenta la capacidad del virus de sobrevivir en el ambiente por más de dos semanas sin sufrir alteraciones en su estructura, la transmisión por la ruta aérea

se ha empezado a plantear como una potencial fuente de infección sobre todo en hatos con una densidad poblacional elevada (14).

Diferentes estudios han demostrado evidencia de que el VDVB puede ser transportado por insectos hematófagos como lo son el tábano y las moscas de los establos durante por lo menos 96 días sin sufrir alteraciones, a pesar de esto, se dice que la transmisión mediada por este insecto es de poca relevancia para la epidemiología del virus de la diarrea viral bovina (15).

Resumiendo, se podría decir que la diarrea viral bovina tiene una facilidad para diseminarse y llegar inclusive a lugares que se encontraban libres de la enfermedad, esto debido sobre todo al comercio del gano vivo, así como, movimientos a través de fronteras de animales contagiados, y en menor medida por artrópodos y fómites (15).

Sintomatología

Dentro del cuadro clínico común que presentan las infecciones por VDVB encontramos problemas respiratorios, reproductivos y gastrointestinales. En cuanto al apartado económico, los problemas reproductivos son los que generan mayores pérdidas anuales en los gatos ganaderos infectados, estos debido a que los abortos, momificación, animales PI, distorsionan la organización productiva de la hacienda (16).

La diarrea viral bovina en muchos casos suele presentar cuadros clínicos leves, el gran problema viene a raíz de que entra patología puede inmunodeprimir al animal lo que hace que este predispuesto a otros agentes infecciosos, lo que puede agravar en gran medida los cuadros enteritos y respiratorios (17).

En ciertos animales el virus puede llegar a desarrollar cuadros clínicos agudos, sobre todo en animales jóvenes, pasando desde problemas gastrointestinales, respiratorios, inclusive llegando a la muerte súbita del animal. Esta gravedad depende en el mayor

de los casos del tipo de cepa que circule en la ganadería y también de si existen otros patógenos que agraven el cuadro clínico. Las presentaciones más agresivas, que se caracterizan por lesiones hemorrágicas, problemas de coagulación y alta mortalidad, se presentan de manera esporádica (18).

Hablando sobre la presentación clínica y sintomatología que produce el VDVB tipo 2 tenemos que se ha demostrado que este puede causar una trombocitopenia y disminución de la función plaquetaria. Las infecciones agudas de este virus se caracterizan por un periodo de viremia que dura aproximadamente 8 días, momento donde el virus es posible de detectar en diversas secreciones del animal. Al ser una enfermedad que deprime el sistema inmune del animal, esta predispone a que patógenos oportunistas o agentes del ambiente produzcan coinfecciones (19).

Por si solo el virus de la diarrea viral bovina tiene la capacidad suficiente para causar cuadros respiratorios agravados, siendo así que este virus forma parte primordial entre los patógenos causantes del complejo respiratorio bovino (19)

Problemas reproductivos

En toda producción ganadera, los abortos son una de las mayores fuentes de pérdidas económicas y desmejore de la eficiencia productiva (20). Hablando de los problemas que ocasiona el virus de la diarrea viral bovina, tenemos que en hembras que han sido contagiadas durante los días posteriores a ser inseminadas o momentos antes de su ovulación, son propensas a desarrollar trastornos de la fecundación y muerte de los embriones en sus primeras etapas de vida (11) . Las hembras infectadas tienden a padecer problemas de infertilidad, esto se relaciona con la secreción de hormonas, como las gonadotropinas y la progesterona, desde los ovarios por una disfuncionalidad en estos. Los machos pueden transmitir el virus a través del semen, este semen se caracteriza por contener bajas cargas de antígeno viral y solo se

encuentra en este fluido por un corto periodo de tiempo después de ser infectado. A pesar de esto, se han relacionado problemas de fertilidad con este periodo de viremia del semen (11). Las hembras infectadas tienden a padecer problemas de infertilidad, esto se relaciona con la secreción de hormonas, como las gonadotropinas y la progesterona, desde los ovarios por una disfuncionalidad en estos. Los machos pueden transmitir el virus a través del semen, este semen se caracteriza por contener bajas cargas de antígeno viral y solo se encuentra en este fluido por un corto periodo de tiempo después de ser infectado. A pesar de esto, se han relacionado problemas de fertilidad con este periodo de viremia del semen (11). A pesar de la poca cantidad de virus que se encuentra en el semen, se sabe que este puede llegar a ser un medio de contagio eficaz sobre todo en hatos ganaderos que nunca han tenido la enfermedad, sobre todo a través de la inseminación con pajuelas comerciales (11). A pesar de la poca cantidad de virus que se encuentra en el semen, se sabe que este puede llegar a ser un medio de contagio eficaz sobre todo en hatos ganaderos que nunca han tenido la enfermedad, sobre todo a través de la inseminación con pajuelas comerciales (11).

Cuando se habla de infecciones en animales gestantes, dependiendo el periodo de gestación en que se encontraba el animal al momento de la infección, se darán diferentes alteraciones. Estas presentaciones clínicas pueden ir desde una infertilidad, aumento en el tiempo entre partos, muerte embrionaria o reabsorciones embrionarias, abortos, nacimiento de animales persistentemente infectados, hasta incluso animales que ya nacen con los anticuerpos para el virus, esto es una señal de que la infección se dio en el último periodo de la gestación (21).

Durante el periodo de gestación comprendido entre los días 100-180 los embriones tienden a desarrollar malformaciones con mayor frecuencia, al ser este un periodo de

organogénesis del feto el virus puede causar severos efectos teratogénicos, sobre todo a nivel del sistema nervioso, presentándose como una hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, etc. De igual manera se ven afectados los ojos produciendo cataratas, atrofia de retina, etc. (11).

Dependiendo el manejo y control que lleve cada ganadería, por lo general estas malformaciones con las que nacen los terneros son las primeras o las únicas señales de la introducción del virus a los animales. Cuando la infección se da en el último tercio de la gestación no se dan malformaciones en los fetos y los animales suelen nacer sanos, esto dado a que en esta parte de la gestación el feto tiene un sistema inmune lo suficientemente capaz para neutralizar al virus, formando anticuerpos que los hacen ser seropositivos a pruebas diagnósticas (11).

Animales persistentemente infectados (PI)

Los animales persistentemente infectados son aquellos que fueron infectados en el periodo embrionario de los primeros 125 días de gestación, esto por medio de una cepa no citopática del virus. Estos animales pueden nacer de una madre con características de PI, en este caso los neonatos adquieren una resistencia inmunológica al virus desarrollando así una presencia persistente del virus en el organismo. Según lo mencionado, podemos decir que un animal nacido con una infección persistente no obtendrá una respuesta inmunológica contra el virus (18).

Los animales PI solo pueden surgir cuando la vaca gestante es un animal PI o cuando esta se infecta en el primer tercio de la gestación, ya que esta etapa es la “ventana” para que el virus infecte a un feto con un sistema inmunológico inmaduro, incapaz de contrarrestar al virus. Dado que es corto el periodo de tiempo los animales PI suelen tener una baja prevalencia a nivel mundial, hablamos de entre un 0.5 a 2% de prevalencia (22).

Esta baja prevalencia hace que su identificación necesite de un gran número de animales muestreados para poder identificar el virus (23). Debido a que estos animales persistentemente infectados no generan anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina, su identificación se basa en encontrar el virus que puede estar presente en gran cantidad de tejidos, secreciones, etc. Esto los hace una importante fuente de diseminación viral en las explotaciones pecuarias (21).

El virus es eliminado permanentemente durante la vida del animal a través de secreciones nasales, orales, leche, orina, e inclusive semen (24). Al nacimiento los terneros PI aparentan estar sanos, un número reducido de estos pueden nacer con malformaciones o débiles, en si se caracterizan por reducidas ganancias de peso e inmunosupresión (24).

En estos animales con una infección persistente las tasas de mortalidad tienden a subir, dado que estos animales suelen presentar inmunosupresión que los hace susceptibles a otras enfermedades. La mayor parte de estos terneros infectados mueren entre los 6 y 24 meses de edad. A pesar de estos, se han encontrado reportes de animales PI que llegan a edades avanzadas entre los 5 y 7 años (18).

Prevención y control

En el mundo ha ido en auge cada vez más y más la demanda de carne vacuna y los derivados lácteos que podemos aprovechar de estos animales, gracias a esto la industria ha tenido que irse adaptando y evolucionando a la par, aumentando así el comercio y movilización del ganado, gracias a esto la diseminación del virus de la DVB ha aumentado bastante, haciendo que se busquen nuevas medidas de prevención y control de la enfermedad (25).

Dado que los animales PI son una de las principales fuentes de transmisión para el virus, los programas de control y erradicación de la enfermedad de varios países

apuntan como objetivo primordial a la identificación y posterior descarte de estos animales, en su mayoría se los evalúa por medio de una muestra de oreja (26).

Instaurar un sistema de bioseguridad es de suma importancia para cualquier explotación ganadera, varios estudios nos hablan acerca de estrategias preventivas que ayudan a desarrollar varios niveles de bioseguridad para las granjas (27).

Países como Dinamarca y Noruega, han tenido éxito en la erradicación del virus de la diarrea viral bovina convirtiéndose así en países con el certificado de estar “libres de VDV”, Este estatus solo se puede mantener a través de la implementación de sistemas de seguimiento epidemiológico (28).

El método más famoso es el conocido como “enfoque escandinavo”, este consiste en la detección inicial del rebaño problema mediante exámenes de serología. Si detecte la posibilidad de que el hato ganadero haya sido recientemente infectado, todos los animales serán examinados con pruebas de laboratorio confirmatorias para detectar a los animales PI (28).

Básicamente, la clave en el control del Virus de la diarrea viral bovina es la identificación prematura de los animales persistentemente infectados y su posterior descarte. En base a esto, todos los hatos ganaderos en su protocolo de control deben tener la autorización de realizar las pruebas virológicas pertinentes para la detección del virus, por ejemplo, Antígeno-ELISA y RT-PCR son las más comunes (29).

Vacunación. Un apropiado protocolo de vacunación debe seleccionar el antígeno correcto, con liberación óptima y en el tiempo correcto logrando una respuesta que pueda proteger al animal; en general, una respuesta inmune exitosa debe producir la misma respuesta humoral y celular que las resultantes de una infección natural, con mínimos efectos adversos en el animal (30).

En la actualidad las vacunas comerciales contra el virus de la diarrea viral bovina se

basan en líneas celulares comunes y actúan para cepas de VDVB-1 y VDVB-2, de momento no se ha confirmado que existan vacunas autorizadas para la prevención del virus tipo HoBi. Ya sean vacunas de tipo virus vivo modificado o las de virus inactivado, son comercializadas en todo el mundo, aunque en ciertos lugares su uso no tiene licencia ya que con esto se busca evitar que haya cruzamientos con los resultados de pruebas serológicas de diagnóstico (31).

La vacunación de los animales es de suma importancia para prevenir que animales susceptibles contraigan infecciones transitorias, así como para proteger al animal en la etapa de desarrollo fetal previniendo de esta manera la aparición de animales PI, en base a esto muchos programas de vacunación se basan solo en vacunar a las hembras destinadas como vientres (32).

Actualmente ha quedado en evidencia que al vacunar los terneros contra este virus puede desarrollar una respuesta inmune y muchas más marcado, con tasas de conversión y crecimiento mayores en contraste con los animales sin vacunación que entran en contacto con animales PI (32).

En base a lo anteriormente mencionado, se sugiere que la vacunación es de gran importancia tanto para ganado joven como para el ganado que está destinado a la reproducción, pudiendo así controlar pérdidas embrionarias y de producción asociadas a infecciones con el virus de la diarrea viral bovina (32).

Métodos de diagnóstico

Para un correcto manejo y control del VDVB es indispensable poder diferenciar entre los animales que son persistentemente infectados o atravesaron una infección transitoria. En la actualidad, las pruebas diagnósticas para el VDVB se basan en identificar los antígenos específicos del virus, los anticuerpos, inclusive el ARN viral (32).

Debido al amplio tipo y severidad de lesiones inespecíficas, en ocasiones solo evidenciadas por microscopía, el diagnóstico se basa únicamente en el aislamiento del virus o detección del antígeno viral específico. El objetivo principal del diagnóstico es la detección y remoción de bovinos persistentemente infectados (PI), principal fuente de infección y reservorio del virus (33).

Detección de anticuerpos

Los anticuerpos específicos para el VDVB son útiles para identificar a los animales que han sido expuestos al virus, ya sea por vacunación con virus inactivados o por exposición natural al agente etiológico, para así comprobar la circulación de anticuerpos y que animales puede ser susceptibles al contagio (32).

Dependiendo como se maneje la bioseguridad del hato ganadero, los programas de control pueden usar la detección de anticuerpos como un tamiz para saber en qué rebaños ha habido el paso del virus y cuales aún no se han visto afectados. Entre las pruebas de identificación de anticuerpos más usadas tenemos al ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), la neutralización viral (VNT) y menos frecuentes los de inmunodifusión en gel de agarosa (32)

En una ganadería afectado por el VDVB, identificar a los animales PI siempre va a ser el punto de mayor conflicto dado que estos animales no presentan una signología clínica, a su vez, su organismo no produce anticuerpos contra el virus, esto hace que las pruebas antes descritas no tengan efectividad y solo se pueda llegar a un diagnóstico mediante detección del virus en muestras de tejido (34).

Hablando específicamente de las pruebas de ELISA, se ha descrito que los anticuerpos adquiridos de la madre mediante el calostro pueden interferir en el resultado de la prueba, así es que ciertos autores han estipulado que la edad para realizar estos exámenes debe ser entre las 10 y 12 semanas de edad, en Nueva

Zelanda se recomienda no realizar estas pruebas antes de los 35 días de edad (35).

Aislamiento viral

Esta técnica de diagnóstico se ha considerado por mucho tiempo como la Gold standard para la detección del virus ya que esta puede realizarse en una gran variedad de muestras biológicas, más comúnmente se realiza a partir de sangre entera, plasma, suero, buffy coat, etc. Uno de los impedimentos para la realización de esta prueba como método de vigilancia es su elevado costo, el tiempo necesario para obtener los resultados y el nivel de experticia que se necesita para evitar artefactos que distorsionen los resultados (36).

Inmunohistoquímica

El virus de la diarrea viral bovina se aloja en diversos órganos del individuo, así como en varios tipos de tejidos, de modo que, realizando biopsias de ganglios linfático, placenta y hasta encéfalo, se han logrado tener buenos resultados detectando la presencia del virus. Teniendo en cuenta a los animales vivos, las biopsias recomendadas y más fáciles de llevar a cabo son en el pabellón auricular, sobre todo si se sospecha de animales PI (36).

Este método se puede considerar como el más conveniente para la identificación del virus en fetos abortados, posee una alta sensibilidad y especificidad. La técnica de inmunohistoquímica debe realizarse en tejido formolizado y embebido en parafina, esto permite una buena conservación de las muestras, posibilitando los estudios retrospectivos de las muestras, también permite una mejor identificación del antígeno en relación con las lesiones histopatológicas (37).

RT-PCR para detección de ARN viral

El aislamiento viral es considerado como la prueba estándar para la detección del VDVB, pero esta solo puede detectar virus infecciosos, en contraposición a esto, la RT-PCR es capaz de obtener resultados adecuados a partir de virus no viables. Con

lo dicho anteriormente hay que mantener presente que el detectar ARN del VDVB no siempre nos da certeza de que el virus infeccioso se encuentre en el animal.

La RT-nPCR y RT-qPCR se consideran más capacitadas que el AgELISA para identificar el virus en muestras de fetos abortados o neonatales, inclusive hay estudios que demuestran que estas pruebas pueden detectar el virus en muestras con 21 años de almacenamiento (38).

En base a un estudio realizado, se mostró que la prueba de RT-nPCR tiene una alta sensibilidad al ser usada en suero de animales, estas muestras podrían ser individuales o combinadas (Pool), siendo así una herramienta confiable para la identificación del VDVB (39).

La RT-PCR es una variante a la PCR común, esta tiene como objetivo ayudar a la identificación de moléculas diana del ARN las cuales una PCR convencional no puede detectar. En primer lugar, se debe tratar al ARN de forma que consigamos convertirlo en un ADN complementario, esto mediante reacciones conseguidas por la enzima transcriptasa reversa (39).

En la primera fase de la reacción, se tienen dos opciones de cebadores: los hexámeros, que son oligonucleótidos de seis nucleótidos con una secuencia aleatoria y se unen de forma aleatoria en cualquier parte del ARN molde, o un oligonucleótido, típicamente un oligo dT, que facilita la captura y generación del ADNc a partir del ARNm o ARN que tiene colas poliA. Una vez obtenido el ADNc, se procede a su amplificación mediante una ADN polimerasa, comúnmente la ADN polimerasa. (40).

En términos generales, los procesos para la realización de una RT-PCR con problemáticos debido a que la enzima empleada no soporta temperaturas muy altas como las que se utilizan en el proceso de PCR. Teniendo así que la transcripción reversa suele hacerse por separado a las etapas de PCR, este problema limita

bastante el alcance de aplicación de esta técnica en el diagnóstico clínico (40).

En la actualidad existen empresas que han desarrollado productos que contienen una mezcla de ADN polimerasa y RTase, este tipo de productos comerciales hacen que el inconveniente anteriormente mencionado en la RT-PCR se resuelva y esta pueda realizarse en un solo paso. Una vez realizada la transcripción, las reacciones resultantes se deben trabajar en un termociclador para mantener temperaturas altas (normalmente 95°C), de esta forma se activa el ADN polimerasa estable y se inactiva de manera simultánea el RTase (40). Cabe mencionar que, realizando la transcripción reversa para la PCR, se llevan a incrementar de manera exponencial el potencial diagnóstico para la identificación de los agentes etiológicos virales que contengan ARN (40). Cabe mencionar que realizando la transcripción reversa para la PCR, se llevan a incrementar de manera exponencial el potencial diagnóstico para la identificación de los agentes etiológicos virales que contengan ARN (40).

MATERIALES Y METODOS

Localización de la zona de estudio.

El estudio se llevará a cabo en hatos de producción mixta (leche/carne) de diferentes cantones de la provincia de El Oro, Ecuador. Esta provincia está ubicada en la región costera al sur del país y está constituida por 14 cantones que difieren en cuanto a las características geográficas altitudinales.

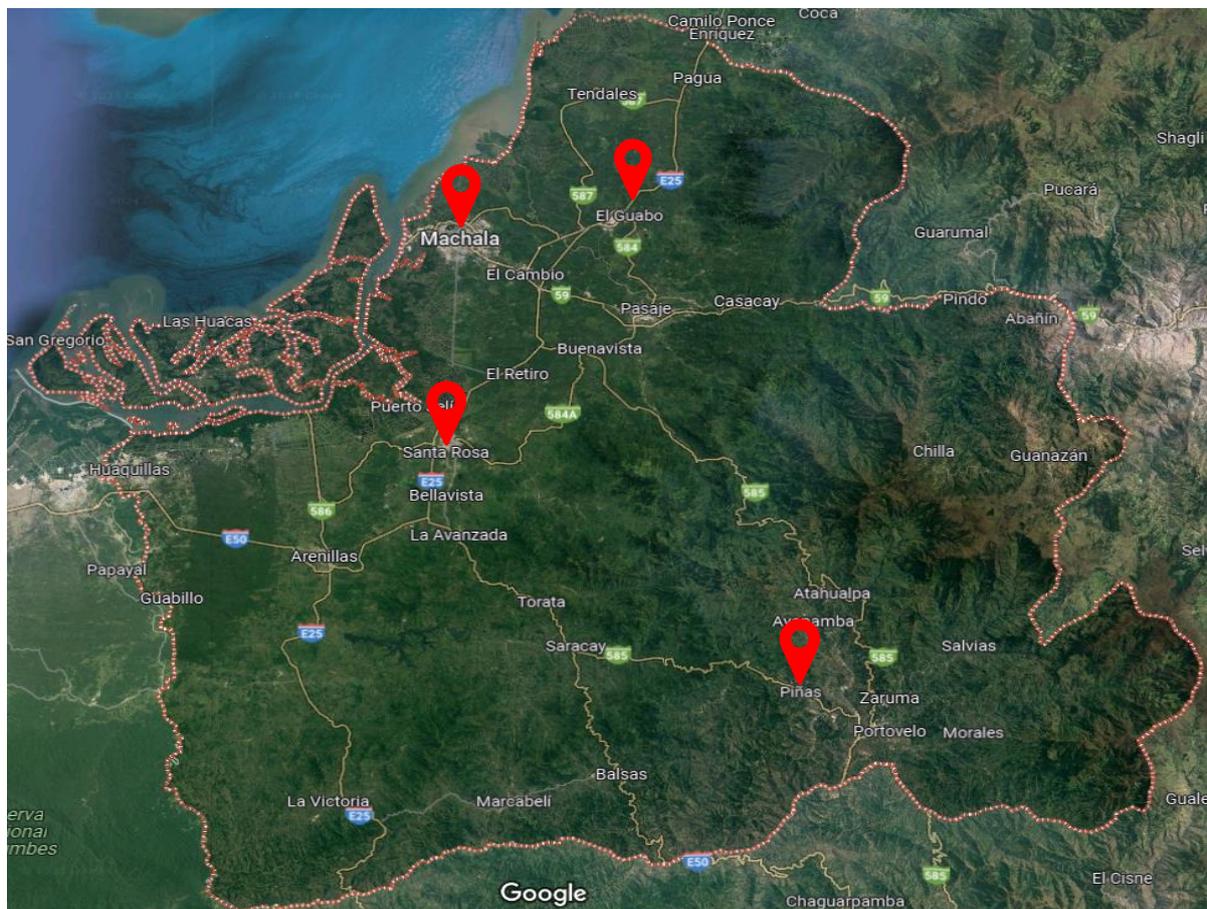


Imagen 1.- Ubicacion geografica de los cantones muestreados

Para la presente investigación se muestreo los cantones de Santa Rosa, Piñas, Guabo y Machala, los mismo considerados los más representativos en producción ganadera a nivel de la provincia. Para cada cantón se usó como referencia entre uno a dos hatos ganaderos en relación con la población total de animales.

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de citogenética de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala, Ecuador [Procesamiento inicial de la muestra]. Y para los procesos como la extracción de ARN, RT-PCR mix , termociclado y electroforesis fueron trabajados en el laboratorio de biología molecular “*Animal Life*”.

Determinación de la Población y muestra

El número de muestra fue calculado a partir de la población de 112.805 bovinos, en toda la provincia, obtenidos de la encuesta de superficie y producción agropecuaria (ESPAC) del instituto nacional de estadística y censos (INEC) realizada en el 2023 (41); de donde se determinó una muestra de 200 animales, calculados con la fórmula correspondiente con un intervalo de confianza del 99% y estimación de error del 9%.

Cálculo del tamaño de la muestra:

Se calculó mediante la siguiente fórmula para población finita:

$$n = \frac{z^2 * p * q * N}{e^2(N - 1) + z^2 * p * q}$$

Descripción:

- N= tamaño de la población: 112.805 bovinos
- n= tamaño de la muestra
- p= población a favor: 0,5.
- q= población en contra: 0,5.
- z= nivel de confianza: 99% = 2,56.
- e= margen de error: 9% = 0,09
- l = precisión o error admitido

Población

La población en estudio estuvo constituida por bovinos hembra en producción, toros, toretes y vacas secas, así como becerros de menos de un año, dependiendo de las prácticas de movilización de estos en los diferentes hatos.

Materiales y equipos

Materiales para la toma de muestra

- Guantes
- Algodón
- Alcohol
- Botas
- Overol
- Jeringas de 10 ml
- Tubo con citrato de sodio
- Corcho o hielera
- Gradilla para tubos
- Geles para mantener las muestras en refrigeración
- Marcador permanente

Materiales para trabajar en laboratorio

- Mandil
- Guantes
- Micropipetas de diferentes calibres
- Gradillas con puntas para micropipeta
- Mechero

Variables

1. Edad
2. Sexo
3. Raza
4. Estado de vacunación

Medición de las variables

- La variable edad se la evaluó de la siguiente forma: de 0 a 1 año; 2 a 5 años y de 6 a 8 años.
- La variable sexo se la evaluó en: Hembra (H) y Macho (M)
- La variable raza se la evaluó en relación al tipo de raza encontrada en el muestreo: Mestizas, Brahman, Brown suis, Holstein, Ghyr
- La variable estado de vacunación se la evaluó: vacunado (V) y no vacunado (NV)

Procedimiento del ensayo

Se seleccionaron las unidades experimentales determinadas por la fórmula de muestreo seleccionada, el tipo de muestra tomada fue sangre entera de los bovinos de los diferentes hatos ganaderos. A cada animal se procedió a tomar una muestra de sangre de 4 ml en un tubo con citrato de sodio, la misma fue conservada en frío (+4 - +8°C), hasta su procesamiento en el laboratorio molecular. Del total de las muestras de sangre se trabajó con grupos de muestra mezcladas (pool) de 5 animales (n=5). De cada grupo de muestras se procedió a realizar el análisis molecular, y solo de aquel grupo-pool que resulto positivo a VDVB se procesó nuevamente la muestra de cada animal, para realizar un análisis molecular individual e identificar a los animales positivos de todo el pool problema.

Durante el muestreo de cada uno de los animales se procedió a realizar una encuesta epidemiológica a los propietarios de las ganaderías sobre las condiciones de los animales y su ecología, buscando información sobre factores condicionantes a la enfermedad y su epidemiología.

Toma de la muestra

Las muestras con las que se trabajó la presente investigación fueron muestras de sangre con anticoagulante (citrato de sodio). Se tomo una muestra de sangre de la vena coccígea de manera directa y se colocó en tubos de 4 cc. con anticoagulante, se procedió a homogenizar y conservada en frío (+4 - +8°C).

Procesamiento de la muestra

Se procedió a centrifugar las muestras durante 15 min a una velocidad de 1500 rpm, después se extrajo un aproximado de 1 cc. el plasma resultante con una micropipeta y se almaceno en tubos eppendorf de 1,5 cc.

Inmediatamente se realizaron pool de muestras extrayendo un total de 50 µl de cada muestra para la elaboración de pool de 5 muestra con un volumen final de 250 µl. El mismo se homogenizo correctamente y se conservó en congelación (-20 °c) hasta su uso.



Imagen 2.- Preparación de un pool de 5 muestras

Extracción de ARN.

La extracción de ARN de las muestras se realizó empleando el kit de extracción Quick-RNA Viral Kit (Cat. No.: R1035, Lot. No.:235453), de Zymo Research, siguiendo las recomendaciones del fabricante (42). Una vez extraídos los ácidos nucleicos fueron preservados a - 20 °c hasta el momento de su uso.

Se realizaron todos los pasos a temperatura ambiente y centrifugación a 10 000-16 000 x g. La entrada de muestra se puede ampliar o reducir proporcionalmente.

Preparación inicial: Para cada muestra a tratar, se preparó la mezcla de reacción de ADNasa I (35 µl de Tampón de digestión de ADN + 5 µl de ADNasa I) en un tubo sin ARNasa y mezcle mediante inversión suave.

(I) Preparación de tampón	Se agrego 500 µl de β-Mercaptoetanol por 100 ml de tampón de ARN viral
	Se agrego 192 ml de etanol al 100 % (204 ml de 95 % de etanol) a los 48 ml de concentrado de Viral Wash Buffer.
(II) Preparación de muestras	Se agrego 200 µl de DNA/RNA Shield™ a 200 µl de muestra y mezcle bien. Transferir hasta 400 µl de la mezcla y proceder con la purificación.
(III) Purificación de ARN	Agregue 800ul de tampón ARN viral a 400ul de muestra
	Transferir la mezcla a una columna IC Zymo-Spin en un tubo de recolección y centrifugue 2 min. Transferir columna a un nuevo tubo de colección.
	<p>Tratamiento con ADNasa</p> <p>Agregue 400 µl de tampón de lavado de ARN a la columna, centrifugue y deseche el flujo.</p> <p>Agregue 40 µl de mezcla de reacción de ADNasa I directamente a la matriz de la columna, incubar por</p>

	15min. Añadir 500 µl de tampón de preparación de ARN a la columna, centrifugar y desechar el flujo.
	Agregue 500ul de tampón de lavado viral a la columna, centrifugue por 30 seg, desechar el flujo. Repita este paso.
	Agregue 500 ul de etanol (95-100%) a la columna y centrifugue por 1 min. Transferir la columna a un tubo libre de nucleasas.
	Agregue 15ul de agua libre de ADNasa/ARNasa a la matriz de la columna y centrifugue por 30 seg.

Tabla 1.- Proceso para la extracción de ARN Zymo Research

Primers

Para la presente investigación se usaron los pares de primers 189 y 389 . Las secuencias de primers fueron en el caso de 189 (primer foward) 5'-AGTCGTCARTGGTTCGAC-3' y 389 (primer reverse) 5'-TCCATGTGCCATGTACA-3' los cuales amplifican un amplicon de 201 pares de base del 5'UTR del genoma del pestivirus bovino. La relación guanina-citosina (G-C), es del 52,78% para el primer foward y este tiene una temperatura de fusión (Tm) de 49,18 °c. El primer reverse tiene una relación guanina-citosina de 47,06% con una Tm de 44,64 °c.

Transcripción Reversa

Preparación de la RT-MIX DVB

Se desinfecto el área de trabajo, luego sacamos los reactivos para el mix en hielo y los descongelamos poco a poco, para la realización del mix primero se colocó en un tubo cónico 1 μ l de DTT (0,1M), luego se colocó 0,5 μ l del primer reverse (389), seguido a esto se agregó 1 μ l de dNTPs (10nM), se usaron 5 μ l del buffer 5x, después de esto se agregó 12 μ l de agua molecular libre de RNAasas y se mezcló todo muy bien mediante vortex, una vez homogenizado se procedió a agregar 0,5 μ l de la transcriptasa reversa de ABM (200U/ μ l) y se mezcló suavemente con la micropipeta teniendo como resultado un volumen de 20 μ l. Finalmente se colocó 5 μ l del ARN muestra para realizar el termociclado mediante el siguiente programa:

- 42°C por 60 min
- 95°C por 5 min
- 4° C, infinito

Una vez finalizado el termociclado se almaceno el cDNA resultante a -20 °c hasta que se realice la reacción de PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa

Preparación de la PCR mix

Se aplico el mismo proceso de desinfección del área de trabajo, los reactivos se descongelaron lentamente, en un tubo cónico se agregó 3 μ l de cloruro de magnesio (25mM), 0,5 μ l de dNTPs (10mM), 1 μ l de primer reverse, 1 μ l de primer forward, 5 μ l del buffer 5x, 9,25 μ l de agua libre de ARN/ADNasa, esto se mezcló muy bien

mediante vortex y luego se procedió a colocar 0,25 μ l de la Go Taq Flexi polimerasa de Promega (5u/ μ l), se mezcló suavemente con la micropipeta hasta homogeneizar. Luego se colocó el cDNA resultante de la RT en volumen de 5 μ l, dando un volumen final de 25 μ l por muestra. Para la PCR se generó el siguiente programa en el termociclador:

- 94 °c 5 min [stage one]
- (35 ciclos) [stage two]
 - 94 °c 1 min
 - 55 °c 1 min
 - 72 °c 1 min / 30 seg
- 72 °c 7 min [stage three]
- 10 °c infinito

Retiramos las muestras resultantes del PCR y luego se realizó el proceso de electroforesis.

Preparación de Agarosa al 2 %:

Mezclamos 30 ml de solución buffer Tris – acetato – EDTA 1X (TAE Buffer, molecular biology grade - Promega), añadimos 0.6 g de Agarosa, LE, Analytical Grade (Promega), luego calentamos y finalmente colocamos 10 μ l de intercalante (gelstaint) mezclamos bien. Finalmente, en una cama armada de electroforesis procedemos a llenar los pocillos con la muestra resultante (5 μ l), y en una posición cargamos [5 μ l

de marcador de peso molecular 100 pb]. El programa de trabajo que usamos fue 25 min 100 a voltios.

El producto final de la electroforesis se visualizó en un transiluminador "TruBlue 2" de la marca EDVOTEK.

Estadística

El manejo de los datos y análisis estadístico se desarrolló mediante tablas de contingencia para una prueba no paramétrica de ji cuadrado con una confiabilidad del 95 %, utilizando el software estadístico SPSS versión 22.

RESULTADOS

Determinar la presencia del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en hatos ganaderos de la Provincia de El Oro.

De la presente investigación a partir de un total de 200 animales (n=200), resultaron positivos 58 animales a la técnica de RT-PCR convencional (58/200), representando el 29%. Mientras que los animales que resultaron negativos fueron 142 (142/200), representando el 71 %, como se explica en la tabla 2 y el grafico 1.

	ANIMALES	PORCENTAJE [%]
<i>ANIMALES POSITIVOS</i>	58	29
<i>ANIMALES NEGATIVOS</i>	142	71
TOTAL	200	100

Tabla 2.- Positividad en la provincia de El Oro

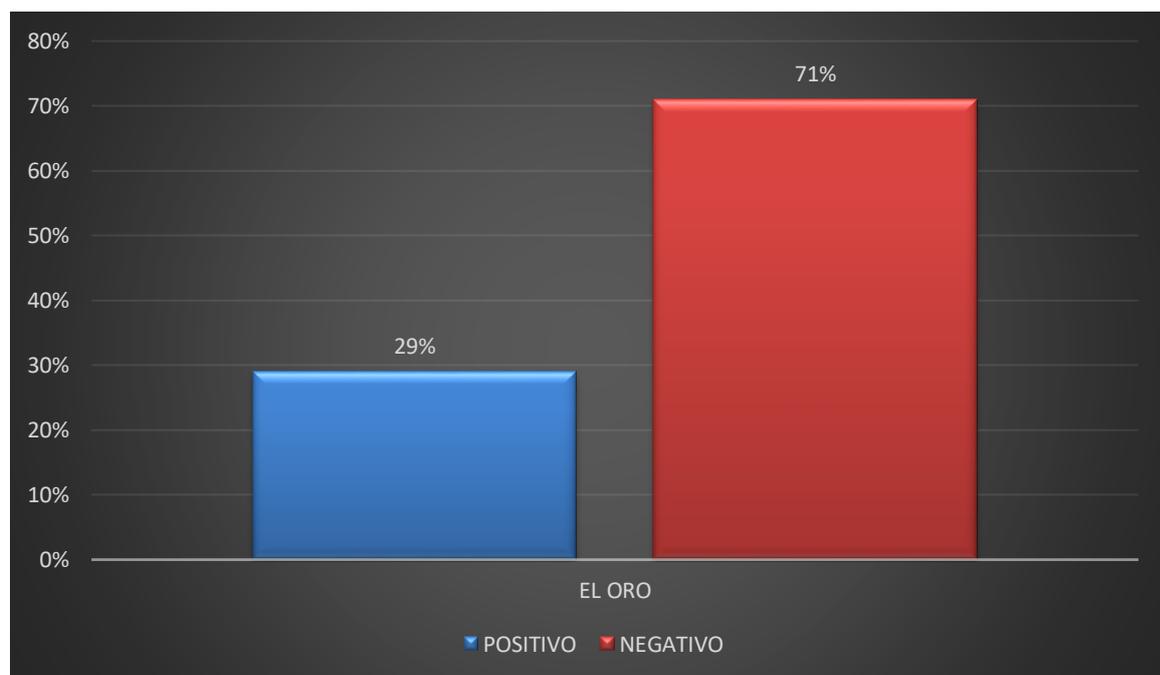


Gráfico 1.- Porcentaje de positividad y negatividad en la provincia

Los resultados obtenidos en la investigación demuestran una positividad el 29% a nivel de la provincia de El Oro, no se han encontrado investigaciones similares para determinar la presencia del virus por medio de RT-PCR en la provincia, pero si se han encontrado datos sobre la seroprevalencia de anticuerpos, teniendo que en un estudio para la detección de la presencia de anticuerpos contra la proteína p80 realizado por (Aguilar-Gálvez, et al., 2024) (43), demostraron una circulación de anticuerpos en muestras de leche de un 52,94% en la provincia de El Oro, así mismo en la Provincia de Cotopaxi se encontraron datos de prevalencia del 14,73% en muestras de suero sanguíneo(44). En Colombia se ha encontrado la presencia de Diarrea Viral Bovina trabajando con RT-PCR, teniendo como resultados 7,69 % de animales positivos al pestivirus en una finca, mientras que en otra finca se encontró un 7,92% de animales positivos (9). En el estudio realizado por (Valdez, et al., 2018) (21) en la provincia de Anta, Cusco, Perú, se muestran datos de prevalencia de antígeno de DVB en 558 sueros que previamente dieron negativos a anticuerpos contra VDVB donde el 7.2% (40/558) fueron positivos, demostrando que la detección de anticuerpos puede tener una baja especificidad para detectar animales infectados y las pruebas de detección de antígeno realmente tienen mayor capacidad para detectar animales infectados.

Distribución de la positividad VDVB de acuerdo con el sitio de procedencia

En la siguiente **Tabla 3** y **Gráfico 2**, 115 animales pertenecieron al cantón El Guabo, representando el 57,5% del total de las muestras, teniendo como resultado 35 animales positivos (35/115), los cuales corresponden a una positividad del 30,43%, y una negatividad del 69,57%. En el cantón Santa Rosa se tomó un total de 32 animales, representando el 16% de las muestras, teniendo como resultado 1 animal positivos (1/32), el cual corresponde a una positividad del 3,12%, y una negatividad

del 96,88%. En el cantón Machala se tomó un total de 24 animales, representando el 12% de las muestras, teniendo como resultado 4 animales positivos (4/24), los cuales corresponden a una positividad del 16,66%, y una negatividad del 83,34%. En el cantón Piñas se tomó un total de 29 animales, representando el 14,5% de las muestras, teniendo como resultado 18 animales positivos (18/29), los cuales corresponden a una positividad del 62,07%, y una negatividad del 37,93%.

CANTONES	POSITIVOS	%	NEGATIVOS	%	TOTAL
GUABO	35	30,43	70	69,57	115
SANTA ROSA	1	3,12	31	96,88	32
MACHALA	4	16,66	20	83,33	24
PIÑAS	18	62,07	11	37,93	29
TOTAL	58	29	142	71	200

Tabla 3.- Resultados en los animales de cada cantón

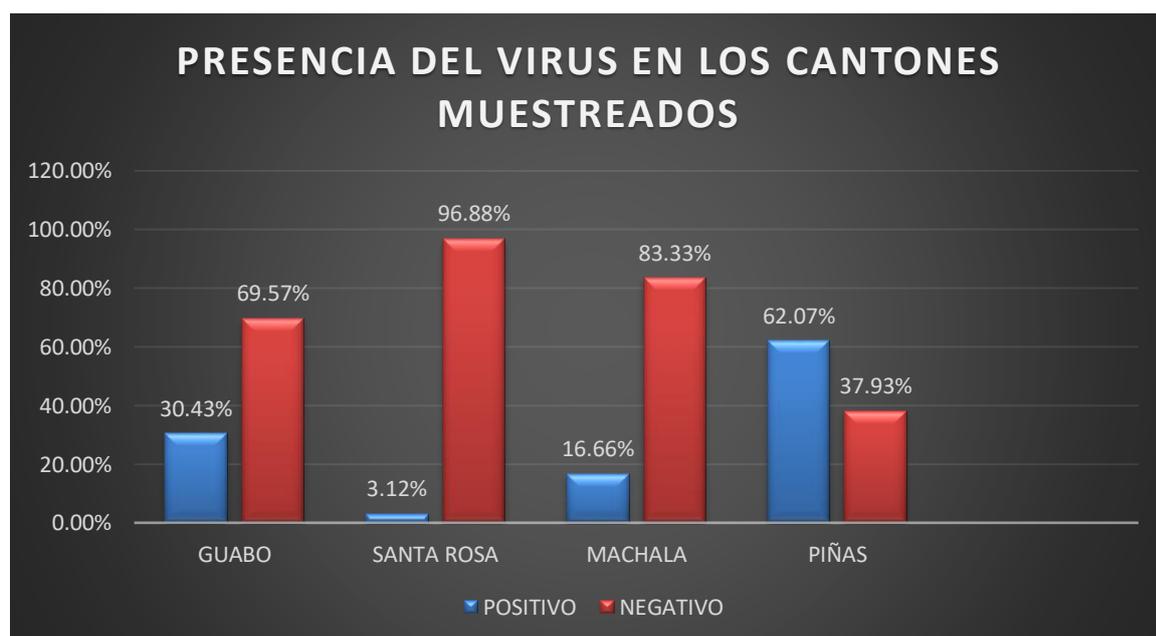


Gráfico 2.- Presencia del virus en los cantones muestreados

Los resultados para el cantón de El Guabo indican un 30,43% de positividad, Santa Rosa un 3,12%, Machala un 16,66 y Piñas un 27,93%, tomando como referencia investigaciones realizadas para la detección de anticuerpos, como la realizada por (Aguilar, et al., 2024) nos reportan una prevalencia del 5,52% en muestras de suero sanguíneo en el cantón Santa Rosa (45), otros estudio demostró una prevalencia de anticuerpos en tanque leche del 100% para El Guabo, 37,5% para Santa Rosa, 25% para Machala (43). En la provincia de Cañar se han encontrado prevalencias del 31,52% para circulación de anticuerpo del virus (46), En el canton Pillaro de la provincia de Tungurahua se han reportado prevalencias del 18% y en el cantón Latacunga igualmente en prevalencia de anticuerpos se ha encontrado un 14,73% (47) (44). Este tipo de estudios nos dan un acercamiento a como se encuentra la circulación del virus en el territorio ya que la presencia de anticuerpos denota el paso del virus por los hatos ganaderos (pudiendo tener animales que ya superaron la enfermedad), y esto contrasta con los datos obtenido en el presente trabajo ya que se determina la real presencia de animales con infecciones tempranas o persistentemente infectados.

Estandarización de la técnica molecular de RT-PCR convencional para el diagnóstico de VDVB.

Se demostró la amplificación por RT-PCR convencional, utilizando primers específicos para la región 5'UTR del genoma de los tres tipos de pestivirus bovinos (tipo 1, tipo 2 y tipo 3) en 58 animales de un total de 200 muestreados, dando una tasa de infección del 29%, con un amplicón de 201 pb de producto final.

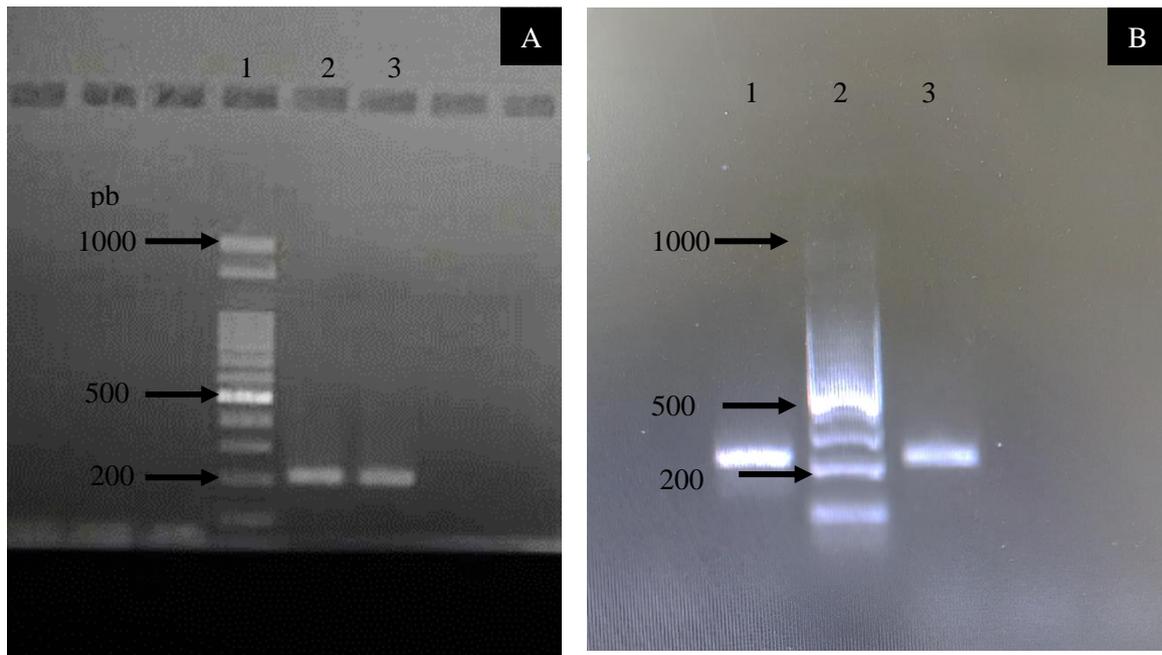


Imagen 3.- (A) Amplificación de la región 5'UTR del genoma del pestivirus, aproximadamente 201 pb. Carril 1 marcador molecular, carril 2 y 3 muestras positivas (201 pb). **(B)** El carril 1 y 3 muestran el producto obtenido con los primers 189 Forward y 389 Reverse para VDVB; el carril 2 muestra la escalera de 100 pb de marcador molecular.

(Monteiro et al. 2019) diseñaron y evaluaron varios conjuntos de primers para la detección de 135 muestras de suero positivas para antígenos de BVDV, utilizando un método de ELISA. Los primers BP189-389, recientemente desarrollados, demostraron una superioridad en la capacidad de detectar todas las muestras identificadas como positivas mediante ELISA, lo que incluyó subtipos de BVDV como BVDV-1 (n = 64), BVDV-2 (n = 45) y un pestivirus afín al HoBi (n = 26) (48). Esto pone en evidencia que los primers usados son altamente sensibles para la detección de los tres subtipos del VDVB que se tienen registros, de igual manera (Ridpath, 1996) nos dice que la región del genoma escogida (5'UTR) tiene la tasa más baja de variación de secuencia al ser comparada con las secuencias de pestivirus publicadas y tiende a ser muy estable (49)

Establecer factores de riesgo de la diarrea viral bovina mediante una encuesta.

Análisis de la variable Estado de vacunación

En los resultados se presenta que, de los 58 animales que resultaron positivos, todos pertenecen al grupo de los animales no vacunados, dando así que el 100% (58/58) de los animales positivos no fueron vacunados.

	Positivos	Porcentaje
<i>Animales Vacunados</i>	0	0
<i>Animales No vacunados</i>	58	100
Total	58	100

Tabla 4.- Estado de vacunación de los animales positivos

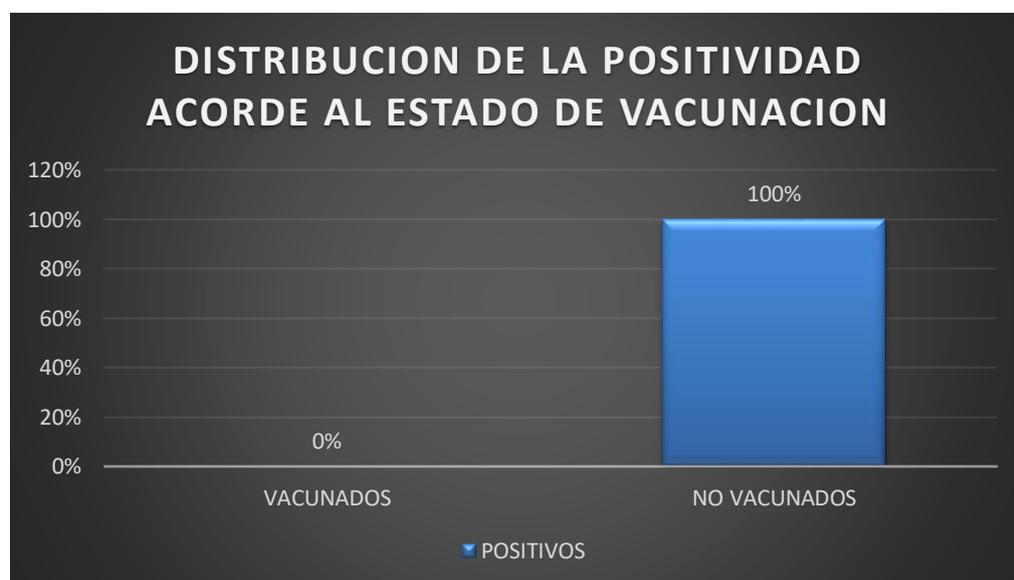


Gráfico 3.- Distribución de la positividad acorde al estado de vacunación

La carencia de un plan vacunal en todas las haciendas muestreadas es un punto de suma importancia para entender el porcentaje de positividad moderado que se obtuvo en la provincia, este mal manejo de los animales permite que se vean expuestos a numerosos virus entre ellos el VDVB que se puede llegar a diseminar por todo el hato ganadero. En un estudio llevado a cabo por (Buitrago, Jiménez y Zambrano, 2018), se encontró que el 77,4% de los animales muestreados estaban inmunizados contra el virus de la diarrea viral bovina (VDVB). De este grupo, el 67,7% había sido

vacunado con un virus inactivado, mientras que el 9,7% recibió una vacuna con virus vivo atenuado. Además, se detectó que el 27,1% de los animales presentaba el DVB.

Análisis de la variable Distribución de las muestras por Cantón

En los resultados se presenta que, de los 58 animales que resultaron positivos, al cantón El Guabo pertenecen 35 animales dando un 60,34% (35/58) de los animales positivos, al cantón Santa Rosa pertenece 1 animal teniendo un 1,72% (1/58), en el cantón Machala se tuvieron 4 animales dando así un 6,9% (4/58), y finalmente en el cantón Piñas se hallaron 18 animales positivos teniendo así un 31,03% (18/58) del total de animales positivos.

	POSITIVOS	[%]
<i>GUABO</i>	35	60,34
<i>SANTA ROSA</i>	1	1,72
<i>MACHALA</i>	4	6,9
<i>PIÑAS</i>	18	31,03
TOTAL	58	100

Tabla 5.- Distribucion de la positividad por Cantón

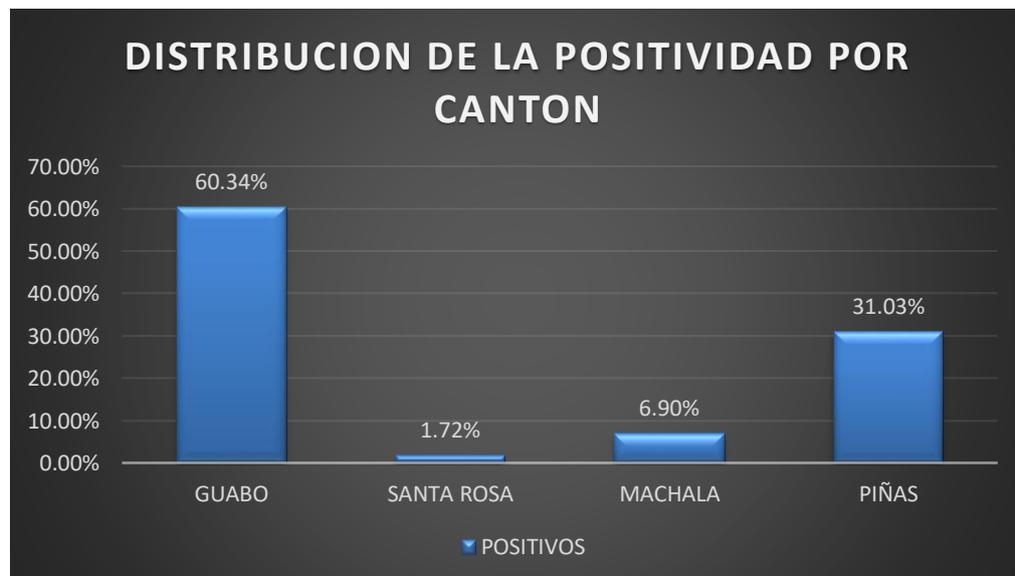


Gráfico 4.- Distribucion de la positividad por Cantón

Análisis de la variable Edad

En los resultados se presenta que, de los 58 animales que resultaron positivos, al grupo de 0 a 1 años pertenecen 1 animales dando un 1,72% (3/58) de los animales positivos, al grupo de 2 a 5 años pertenecen 35 animales tenido un 60,34% (35/58), finalmente en el grupo de 6 a 9 años se hallaron 22 animales positivos teniendo así un 37,93% (22/58) del total de animales positivos.

	POSITIVOS	Porcentaje
0-1 años	1	1,72
2-5 años	35	60,34
6-9 años	22	37,93
Total	58	100

Tabla 6.- Distribucion de la positividad por edad

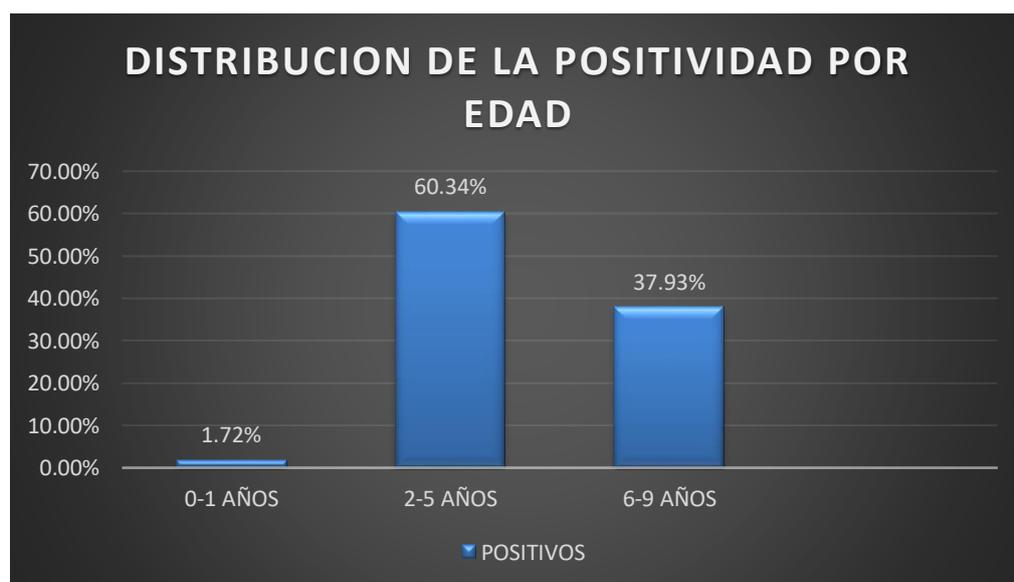


Gráfico 5.- Distribución de la positividad por edad

Se obtuvo que el 60,34% de los animales de entre 2 a 5 años fueron positivos convirtiéndolos en el grupo con mayor afectación por el virus, en una investigación de (González y Barragan, 2016) los animales de 8 años en adelante fueron el grupo con mayor positividad con un 37,71% de un total de 154 animales (50), estos resultados coinciden con la investigación realizada en Manabi donde los animales de 8 años en

adelante igual resultaron ser el grupo con mayor positividad con un 17,14% y en un segundo muestreo esta cifra sube hasta un 25% de positividad (51).

Análisis de la variable Raza

En los resultados se presenta que, de los 69 animales que resultaron positivos, a los animales mestizos pertenecen 23 dando un 39,66% (23/58) de los animales positivos, al grupo de los brahman pertenecen 23 animales tenido un 39,66% (23/58), en los animales Brown suis se tuvieron 6 dando así un 10,34% (6/58), a los animales holstein pertenecen 5 dando un 8,62% (5/58) y finalmente en el grupo de los animales ghyr se halló 1 animal positivo teniendo así un 1,72% (1/58) del total de animales positivos.

	POSITIVOS	Porcentaje
Mestizo	23	39,66
Brahman	23	39,66
Brown suis	6	10,34
Holstein	5	8,62
Ghyr	1	1,72
Total	58	100

Tabla 7.- Distribución de la positividad por raza

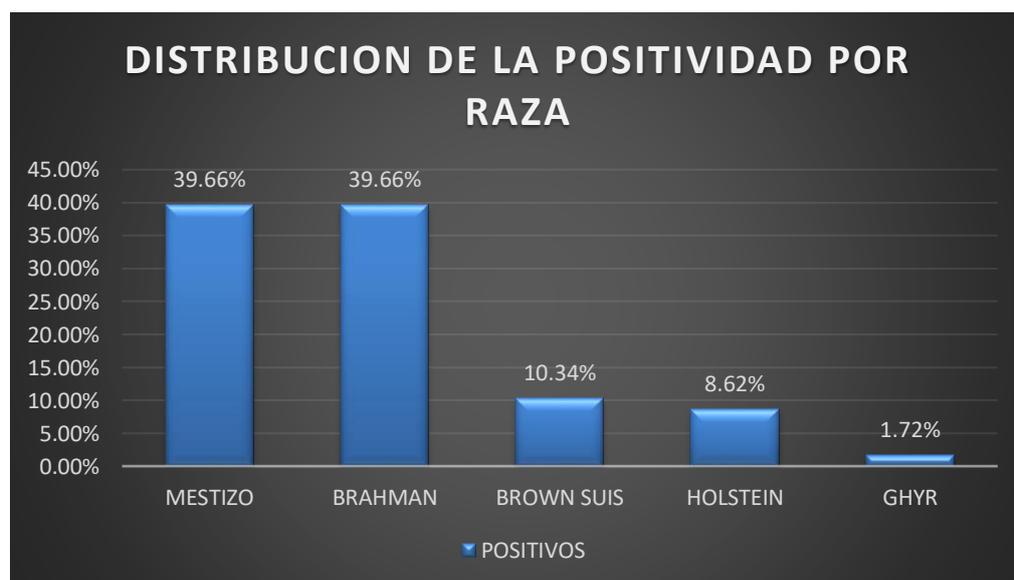


Gráfico 6.- Distribución de la positividad por raza

La raza Brahman y los animales mestizos con los grupos con mayor positividad compartiendo ambos un 39,66%, esto puede ser debido a que más de la mitad de los animales muestreado en la presente investigación pertenecían a estas razas. En una investigación realizada por (Arauco y Lozano, 2018), obtuvo datos de ganaderías con razas Holstein, Pardo Suizo, cruzadas y razas criollas de las cuales obtuvieron un 64,8% de animales positivos (52).

Análisis de la variable Sexo

En las siguiente **Tabla #8** y **Gráfico #7**, de los 58 animales que resultaron positivos, todos pertenecen al grupo de las animales hembras, dando así que el 100% (58/58) de los animales positivos fueron hembras.

	POSITIVOS	Porcentaje
Hembra	58	100
Macho	0	0
TOTAL	58	100

Tabla 8.- Distribución de la positividad por el sexo



Gráfico 7.- Distribución de la positividad por el sexo

Asociación estadística de las variables

Edad de los animales positivos

Tabla 9.- Prueba de Chi-cuadrado para la edad y la positividad

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	14,660 ^a	8	,066
Razón de verosimilitud	15,875	8	,044
Asociación lineal por lineal	,868	1	,352
N de casos válidos	200		

a. 4 casillas (22,2%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,29.

Los resultados de las pruebas de chi-cuadrado ofrecen conclusiones mixtas. Mientras que la razón de verosimilitud sugiere que podría haber una asociación significativa entre la edad y el estado de ser positivo, el chi-cuadrado de Pearson no alcanza el umbral de significancia convencional, y la asociación lineal por lineal no encuentra evidencia de una relación lineal.

Raza de los animales positivos

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	23,950 ^a	4	<,001
Razón de verosimilitud	24,639	4	<,001
Asociación lineal por lineal	9,757	1	,002
N de casos válidos	200		

a. 2 casillas (20,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 2,61.

Tabla 10.- Prueba de Chi-cuadrado para la raza y la positividad

Los resultados de las pruebas de chi-cuadrado, la razón de verosimilitud, y la asociación lineal sugieren que existe una asociación significativa entre la raza de los animales muestreados y que es positivo. Sin embargo, hay que destacar el hecho de que la mayoría de los animales muestreados en la investigación pertenecían a la raza Brahman y Mestizo, dado la poca uniformidad en la raza de los animales, estos valores de chi cuadrados podrían no ser determinantes de una verdadera asociación estadística.

Sexo de los animales positivos

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,411 ^a	1	,522		
Corrección de continuidad ^b	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	,687	1	,407		
Prueba exacta de Fisher				1,000	,710
Asociación lineal por lineal	,408	1	,523		
N de casos válidos	200				

a. 2 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,29.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Tabla 11.- Prueba de Chi-cuadrado para el sexo y la positividad

Todos los resultados apuntan a la misma conclusión: no hay una asociación estadísticamente significativa entre el sexo de los animales muestreados y el estado de ser positivo. Las pruebas de chi-cuadrado, la corrección de continuidad, la razón

de verosimilitud, y la prueba exacta de Fisher coinciden en que el sexo no parece influir en la probabilidad de que un animal sea positivo.

Esto sugiere que, dentro de la muestra analizada, el ser macho o hembra no está relacionado con la probabilidad de ser positivo

CONCLUSIÓN

Se demostró la circulación del virus de DVB en los hatos ganaderos de la Provincia de el Oro, resultando una moderada tasa de infección (29%), (58/200). Esta investigación nos permite tener un acercamiento al nivel de la circulación viral que hay en las ganaderías de los cantones más representativos de la provincia de El Oro.

La implementación de la RT-PCR convencional para la identificación de animales infectados por el VDVB se realizó con éxito en la presente investigación, esta técnica puede ser usada como un análisis confirmatorio para el diagnóstico tanto de animales con infecciones agudas, así como animales PI. Teniendo en cuenta que todos los animales positivos no contaban con un esquema vacunal, se evidencia la importancia de adoptar correctas prácticas sanitarias para la prevención de contagios y mayor diseminación del virus en la provincia.

No se encontró una verdadera significancia de asociación entre factores de riesgo y la presencia del VDVB, esto debido a que la distribución de las variables no fue uniforme en los animales que conformaron la muestra de estudio.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar nuevos estudios más especializados para la tipificación molecular y filogenética para identificar que cepas son las que están circulando en la provincia.
- Ampliar las zonas de muestreo a nuevos cantones de la provincia para tener un mapa epidemiológico más amplio y representativo de la circulación del VDVB.
- Implementar protocolos de erradicación del VDVB usando pruebas tamiz como el ELISA para la identificación de hatos problema y posteriormente mediante RT-PCR identificar a los animales realmente infectados y proceder a su sacrificio.
- Realizar campañas de bioseguridad en los hatos problema para reducir el daño que genera la presencia VDVB. Tomando en cuenta la necesidad de realizar vacunaciones a los animales para evitar la diseminación viral.

BIBLIOGRAFÍA

1. QuishpeMendoza X, Velásquez Quinaluisa J, Toro Molina B, Silva Deley L, Cueva Salazar N. SEROEPIDEMIOLOGÍA DE LADIARREAVIRALBOVINAENÁREAS DE LA PROVINCIA DE COTOPAXI, ECUADOR. Universidad & Ciencia. 2023; 12(2).
2. Martínez C, Rubio E, Rodríguez S, Figueroa J, Aguilar F, Lagunes R, et al. Antecedentes y perspectivas de algunas enfermedades prioritarias que afectan a la ganadería bovina en México. Revista Mexicana de ciencias pecuarias. 2021; 12(3).
3. Rojas Martinez C, Loza Rubio E, Figueroa Millán JV, Rodríguez Camarillo SD, Aguilar Romero F, Lagunes Quintanilla RE, et al. Antecedentes y perspectivas de algunas enfermedades prioritarias que afectan a la ganadería bovina en México. Revista Mexicana de ciencias pecuarias. 2021; 12(3).
4. Kirkland P. Organización mundial de la sanidad animal. [Online].; 2018. Acceso 31 de Enero de 2024. Disponible en: https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/0.05_COLABORADO_RES_2023.pdf.
5. Rosete Fernández J, Socci Escatell G, Fragoso Islas A, Zárate Martínez J, Jenkins S, Granados Zurita L, et al. Frecuencia de anticuerpos séricos contra los virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina y diarrea viral bovina en toros, y su relación con la presencia de los virus en semen. Revista Mexicana de ciencias pecuarias. 2021; 12(4).
6. Donoso A, Inostroza F, Celedon M, Pizarro J. Diversidad genética del virus de la diarrea viral bovina en bovinos en Chile entre 2003 y 2007. BMC Veterinary Research. 2018; 14.
7. Pecora A, Perez M, Ridpath J, Dus Santos M. Molecular Characterization of Pestiviruses in Fetal Bovine Sera Originating From Argentina: Evidence of Circulation of HoBi-Like Viruses. Frontiers in veterinary science. 2019; 6.
8. González-Bautista E, Bulla-Castañeda D, Díaz-Anaya A, García-Corredor D, Pulido-Medellín M. Determinación de anticuerpos antidiarrea viral bovina (DVB) en vacas lecheras de un municipio de Boyacá (Colombia). Revista de medicina veterinaria. 2021;(43).
9. Villamil V, Ramirez G, Vera V, Jaime J. Primera evidencia del Virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB). Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. 2018; 65(1).
10. Buitrago E, Jiménez C, Zambrano J. Identificación de factores asociados con la exposición al virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en terneras de hatos lecheros de la sabana de Bogotá. Revista medica veterinaria. 2018;(36).

- 11 Ordóñez G, Ojeda C. DIARREA VIRAL BOVINA. Revista Científica Arbitrada . Multidisciplinaria PENTACIENCIAS. 2023; 5(4).
- 12 Medina-Gudiño J, Gómez-Romero N, Ramírez-Lezama J, Padilla-Noriega L, Venegas-Cureño E, Basurto-Alcántara F. Detección del virus de la diarrea viral bovina en artiodáctilos silvestres en cautiverio en Mexico. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 2022; 13(3).
- 13 Yitagesu E, Jackson W, Kebede N, Smith W, Tsegaw F. Prevalencia de aborto bovino, mortalidad de terneros y terneros infectados persistentemente por el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) entre granjas ganaderas pastoriles, periurbanas y de cultivos mixtos en el centro y noroeste de Etiopía. Investigacion veterinaria BMC. 2021; 17(87).
- 14 Hou P, Xu Y, Wang H, He H. Detection of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 in aerosol . by a real time RT-PCR assay. BMC Veterinary research. 2020; 16(114).
- 15 Zhigailov A, Perfilyeva Y, Ostapchuk Y, Kan S, Lushova A, Kuligin A, et al. Molecular and . serological survey of bovine viral diarrhoea virus infection in cattle in Kazakhstan. Research in Veterinary Science. 2023; 162.
- 16 Naranjo Guerrero L, Rodríguez Colorado N, Mejía Araque J. Prevalencia de diarrea viral . bovina, neosporosis bovina, leucosis bovina enzoótica y paratuberculosis bovina en vacas de doble propósito en condiciones del trópico colombiano. Revista de investigacion veterinaria Peru. 2022; 33(2).
- 17 Iotti B, Valdano E, Savini L, Candeloro L, Giovannini A, Rosati S, et al. Farm productive . contexts and the dynamics of bovine viral diarrhoea (BVD) transmission. Preventive veterinary medicine. 2019; 165.
- 18 Navarro-López R, Perez-de la Rosa J, Villarreal-Silva M, Solís-Hernández M, Rojas-Torres E, Gómez-Romero N. Caracterización del virus de la diarrea viral bovino subtipo 1b aislado de un caso de la enfermedad de las mucosas. Revista Mexicana de Ciencia Pecuaria. 2023; 14(1).
- 19 Barbosa J, Corredor A, Salas S, Camargo H, Sanchez A, Tobon J, et al. High prevalence . of persistently infected animals from bovine viral diarrhoea in Colombian cattle. BMC Veterinary Research. 2019; 15(23).
- 20 Morrell E, Campero C, Cantón G, Odeón A, Moore D, Odriozola E, et al. Current trends . in bovine abortion in Argentina. Pesquisa Veterinaria Brasileira. 2019; 39(1).
- 21 Valdez E, Pacheco I, Vergara W, Pinto J, Fernández F, Guzmán F, et al. Identificación de . bovinos persistentemente infectados y genotipo del virus de la diarrea viral en bovinos de Anta, Cusco, Perú. Revista de investigacion veterinaria Peru. 2018; 29(4).

- 22 Falkenberg S, Dassanayake R, Walz P, Casas E, Neill J, Ridpath J. Frequency of bovine viral diarrhoea virus detected in subpopulations of peripheral blood mononuclear cells in persistently infected animals and health outcome. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2019; 207.
- 23 Casey-Bryars M, Tratalos J, Graham D, Guelbenzu-Gonzalo M, Barrett D, O'Grady L, et al. Risk factors for detection of bovine viral diarrhoea virus in low-risk herds during the latter stages of Ireland's eradication programme. *Preventive Veterinary Medicine*. 2022; 201.
- 24 Oguejiofor C, Thomas C, Cheng Z, Wathes C. Mechanisms linking bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection with infertility in cattle. *Anim Health Res Rev*. 2019; 20(1).
- 25 Deng M, Chen N, Guidarini C, Xu Z, Zhang J, Cai L, et al. Prevalence and genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus in dairy herds of China. *Veterinary Microbiology*. 2020; 242.
- 26 Wernike K, Beer M. Diagnostics in the context of an eradication program: Results of the German bovine viral diarrhoea proficiency trial. *Veterinary Microbiology*. 2019; 239.
- 27 Benavides B, Casal J, Diéguez J, Yus E, Moya S, Armengol R, et al. Development of a quantitative risk assessment of bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 introduction in dairy cattle herds to improve biosecurity. *Journal of Dairy Science*. 2020; 103(7).
- 28 van Duijn L, Veldhuis A, Mars M, de Roo B, Lam T. Efficacy of a voluntary BVDV control programme: Experiences from the Netherlands. *The veterinary Journal*. 2019; 245.
- 29 Beaudeau F, Vermesse R, Maurin L, Madouasse A, Joly A. Assessing the reliability of innovative criteria to certify that cattle are non-Persistently Infected (non-PI) with the Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV). *Microbiologia veterinaria*. 2023; 286.
- 30 Báez M, Lara M, González de Vicioso A, Ortega O, Valenzano P, Aponte G. EVALUACIÓN DE NIVELES DE ANTICUERPOS GENERADOS CONTRA EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA (VDVB) A PARTIR DE LA INMUNIZACIÓN CON DIFERENTES MARCAS COMERCIALES DE VACUNAS. *Compendio de ciencias veterinarias*. 2018; 8(2).
- 31 Evans C, Hemmatzadeh F, Reichel M, Cockcroft P. Natural transmission of bovine viral diarrhoea virus-1c from a persistently infected neonate lamb to naïve sheep and cattle. *Veterinary Record*. 2018; 182(12).
- 32 Evans C, Pinior B, Larska M, Graham D, Schweizer M, Guidarini C, et al. Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2019; 66(2).

- 33 Ordoñez-Andrade G. DETERMINACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DEL .
PERFIL REPRODUCTIVO EN BOVINOS: REVISIÓN. Revista de investigacion Talentos.
2018;(1).
- 34 Freitas B, Correa A, Valotto A, Marcom N, Paulino L, Brum J, et al. Prevalence of bovines
. persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy cattle herds in Paraná
State, Brazil. Pesquisa veterinaria Brasileira. 2021; 41.
- 35 McDougall S. Effect of calf age on bovine viral diarrhoea virus tests. Journal of veterinary
. diagnostic investigation. 2021; 33(3).
- 36 Cornejo J, Salas M. Repositorio Institucional de la Universidad Politécnica Salesiana.
. [Online].; 2023. Acceso 18 de FEBRERO de 2024. Disponible en:
<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/26134>.
- 37 Guerrero I, Romero K. Repositorio institucional de la Universidad Cooperativa de
. Colombia. [Online].: Universidad Cooperativa de Colombia , sede Ibagué-Espinal,
programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia. ; 2022. Acceso 18 de Febrero de 2024.
Disponible en: <https://repository.ucc.edu.co/entities/publication/f77d68b2-fbd8-41c2-9046-31c380673e56>.
- 38 Spetter M, Louge E, Armendano J, Morrell E, Canton G, Verna A, et al. Detection methods
. and characterization of bovine viral diarrhoea virus in aborted fetuses and neonatal calves
over a 22-year period. Brazilian Journal of microbiology. 2020; 51(4).
- 39 Spetter M, Louge E, Armendano J, Álvarez I, Norero N, Storani L, et al. Frequency of
. bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in Argentinean bovine herds and comparison of
diagnostic tests for BVDV detection in bovine serum samples: a preliminary study.
Brazilian Journal of Microbiology. 2021; 52(1).
- 40 Perera C, Acevedo A. Nuevas tendencias en el diagnóstico de enfermedades virales en
. los animales. Revista de salud animal. 2018; 40(3).
- 41 Instituto nacional de estadística y censos. INEC. [Online].; 2024. Acceso 20 de Abril de
. 2024. Disponible en: <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>.
- 42 Zymo Research. Zymo Research web site. [Online]; 2024. Acceso 5 de Abril de 2024.
. Disponible en: <https://zymoresearch.eu/collections/quick-rna-viral-kits/products/quick-rna-viral-kit>.
- 43 Aguilar-Galvez F, Román-Olaya A, Sánchez-Prado R, Ludeña-Jiménez I, Dus-Santos
. M, Carruyo-Núñez G. Detección de anticuerpos contra el virus de Diarrea Viral Bovina
(VDVB) en tanques de leche en la Provincia de El Oro, Ecuador. Revista científica de la
Facultad de ciencias veterinarias Universidad del Zulia. 2024; XXXIV.

- 44 Velasquez Quinaluisa F. Seroepidemiología de la diarrea viral bovina en los cantones: Latacunga, La Maná y Sigchos. Tesis de grado. Universidad Tecnica de Cotopaxi.
- 45 Aguilar F, Moreno L, Luna J, Aguilar C. DETERMINACIÓN CUALITATIVA A LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE DIARREA VIRAL BOVINA A TRAVÉS DE ELISA DE BLOQUEO EN EL CANTÓN SANTA ROSA, ECUADOR. Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar. 2024; 8(3).
- 46 Pacheco Iñiguez D. Universidad Politécnica Salesiana. [Online].; 2022. Acceso 10 de Agosto de 2024. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/23776>.
- 47 Narvaez Morales K, Sangucho Lema S. Repositorio Universidad Técnica de Cotopaxi. [Online].; 2021. Acceso 10 de Agosto de 2024. Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/8001>.
- 48 Monteiro F, Cargnelutti J, Martins B, Noll J, Weiblen R, Flores E. Detection of bovine pestiviruses in sera of beef calves by a RT-PCR based on a newly designed set of pan-bovine pestivirus primers. J. Vet. Diagn. Invest. 2019; 31(255-258).
- 49 Rdpath J. Sequence diversity and genotyping. International symposium bovine diarrhea virus a 50 years review. 1996;(39-42).
- 50 Barragan G, Gonzalez KJ. Repositorio digital de la universidad de Loja. [Online].; 20216. Acceso 11 de Agosto de 2024. Disponible en: <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/11259>.
- 51 Escudero M, Morales NC. Repositorio digital Universidad de las Americas. [Online].; 2013. Acceso 11 de Agosto de 2024. Disponible en: <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/2894>.
- 52 Arauco F, Lozano E. Seroprevalencia de diarrea viral bovina en hatos lecheros del Valle del Mantaro, Región Junín, Perú. Revista de Investigacion Veterinaria de Peru. 2018; 29(4).
- 53 AIAAM, AAK, AS, JH, MK, BF, et al. A longitudinal study of bovine viral diarrhea virus in a semi-closed management dairy cattle herd, 2020–2022. Frontiers Veterinary Science. 2023; 10.

ANEXOS



Anexo1.- Muestreo en hacienda de El Guabo



Anexo 2.- Muestreo en hacienda Santa Rosa



Anexos 3.- Extracción de plasma y realización de pools



Anexo 4.- Pools de trabajo



Anexo 5.- Extracción de ARN



Anexo 6.- Transcriptasa reversa de la marca “abm”



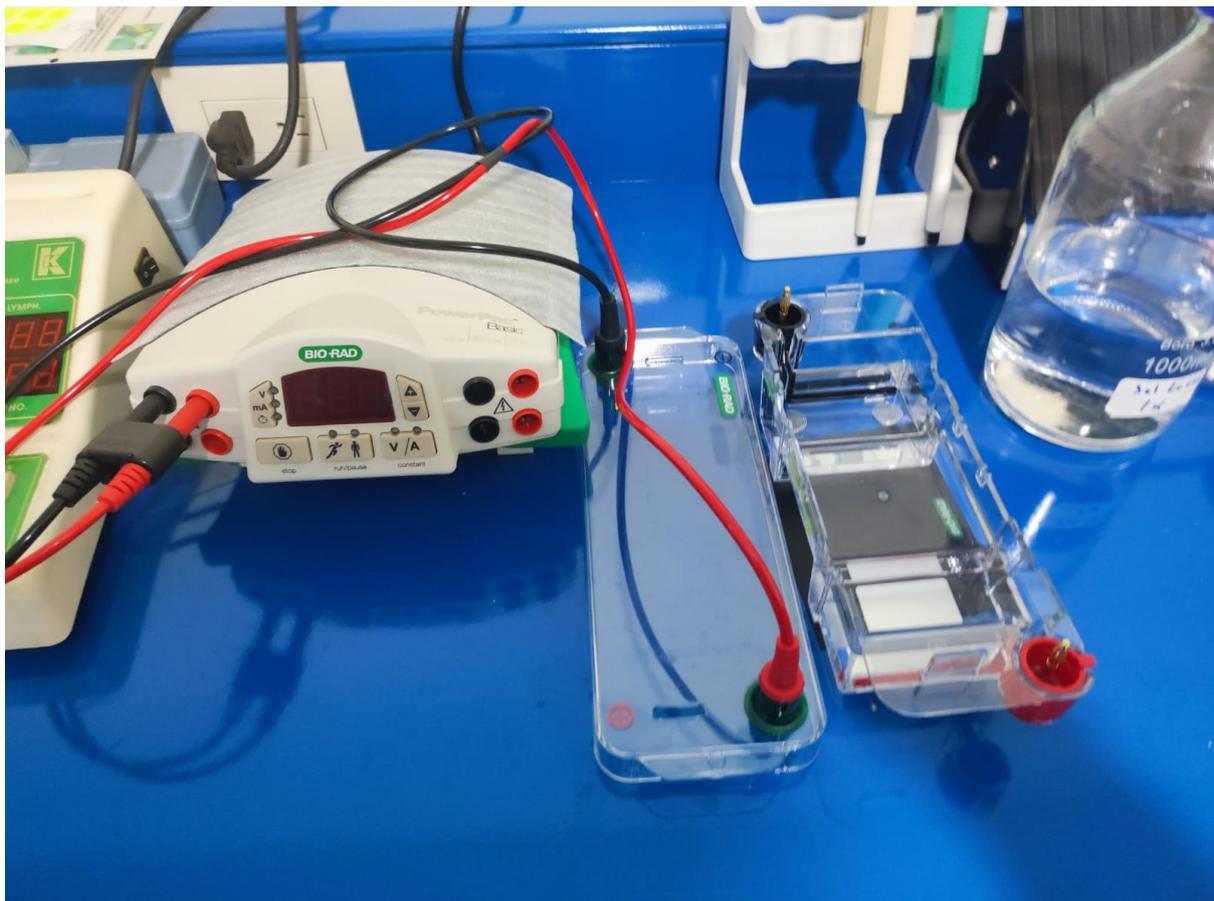
Anexo 7.- Polimerasa marca “Promega” para reacción de PCR



Anexo 8.- Perfil térmico para proceso de transcripción reversa



Anexo 9.- Perfil térmico para proceso de PCR



Anexo 10.- Equipo de electroforesis



Anexo 11.- Carga de las muestras para electroforesis

Anexo 12.- Matriz de datos de encuesta realizada a ganaderos

Nº	GANADERIA	ANIMALES	VACUNA	EDAD	SEXO	RAZA	ANIMALES POSITIVOS
1	GUABO	24-20	NV	4	H	BRHAMAN	Positivo
2		218-20	NV	4	H	BRHAMAN	Positivo
3		238-20	NV	4	H	BRHAMAN	Positivo
4		168-19	NV	5	H	BRHAMAN	Positivo
5		186-20	NV	4	H	BRHAMAN	Positivo
6		26-19	NV	5	H	BRHAMAN	Negativo
7		70-18	NV	6	H	BRHAMAN	Negativo
8		1692	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
9		58-18	NV	6	H	BRHAMAN	Negativo
10		148-21	NV	3	H	BRHAMAN	Negativo
11		100-21	NV	3	H	BRHAMAN	Negativo
12		116-20	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
13		83-49	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
14		1576-16	NV	8	H	BRHAMAN	Negativo
15		1390-15	NV	9	H	BRHAMAN	Negativo
16		96-20	NV	4	H	BRHAMAN	Positivo
17		182-20	NV	4	H	BRHAMAN	Positivo
18		268-21	NV	3	H	BRHAMAN	Negativo
19		114-20	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
20		50-18	NV	6	H	BRHAMAN	Negativo
21		1688	NV	1	H	BRHAMAN	Negativo
22		30-21	NV	3	H	BRHAMAN	Positivo
23		1070-17	NV	7	H	BRHAMAN	Negativo

24	770-12	NV	8	H	BRHAMAN	Positivo
25	176-20	NV	4	H	BRHAMAN	Positivo
26	154-20	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
27	118-21	NV	3	H	BRHAMAN	Negativo
28	1562-16	NV	8	H	BRHAMAN	Negativo
29	108-20	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
30	224-20	NV	4	H	BRHAMAN	Positivo
31	150-19	NV	5	H	BRHAMAN	Negativo
32	124-20	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
33	2-21,	NV	3	H	BRHAMAN	Negativo
34	188-19	NV	5	H	BRHAMAN	Positivo
35	1026-13	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
36	1512-15	NV	4	H	BRHAMAN	Positivo
37	194-20	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
38	214-20	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
39	184-20	NV	4	H	BRHAMAN	Positivo
40	1076-13	NV	8	H	BRHAMAN	Positivo
41	126-20	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
42	18-19	NV	5	H	BRHAMAN	Negativo
43	48-18	NV	6	H	BRHAMAN	Negativo
44	118-20	NV	4	H	BRHAMAN	Positivo
45	78-21	NV	3	H	BRHAMAN	Negativo
46	1020-13	NV	7	H	BRHAMAN	Negativo
47	178-20	NV	4	H	BRHAMAN	Positivo

9	48		124	NV	8	H	BRHAMAN	Positivo
0	49		83-64	NV	4	H	BRHAMAN	Positivo
1	50		8-19,	NV	5	H	BRHAMAN	Negativo
2	51		48-21	NV	3	H	BRHAMAN	Negativo
3	52		94-19	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
4	53		110-21	NV	3	H	BRHAMAN	Negativo
5	54		1306-13	NV	6	H	BRHAMAN	Positivo
5	55		1304-15	NV	6	H	BRHAMAN	Positivo
7	56		46-21	NV	3	H	BRHAMAN	Negativo
8	57		198-21	NV	3	H	BRHAMAN	Negativo
9	58		1410-15	NV	6	H	BRHAMAN	Negativo
0	59		10-21,	NV	3	H	BRHAMAN	Negativo
1	60		4-21,	NV	3	H	BRHAMAN	Negativo
2	61		22-21,	NV	3	H	BRHAMAN	Negativo
3	62		1040-13	NV	7	H	BRHAMAN	Positivo
4	63		234-20	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
5	64		1784-17	NV	7	H	BRHAMAN	Negativo
5	65		116-19	NV	5	H	BRHAMAN	Positivo
7	66		1354-14	NV	6	H	BRHAMAN	Negativo
8	67		56-19	NV	5	H	BRHAMAN	Negativo
9	68		36-18	NV	6	H	BRHAMAN	Negativo
0	69		238-18	NV	6	H	BRHAMAN	Negativo
1	70		1050-13	NV	7	H	BRHAMAN	Negativo
2	71	PAGUA	6205	NV	6	H	BROWN SUIS	Negativo
3	72		2218	NV	1	H	BROWN SUIS	Negativo

4	73	1348	NV	4	H	BROWN SUIS	Negativo
5	74	2018	NV	6	H	BROWN SUIS	Negativo
5	75	6125	NV	1	H	BROWN SUIS	Negativo
7	76	1219	NV	7	H	GHYR	Negativo
8	77	2114	NV	8	H	GHYR	Negativo
9	78	7254	NV	8	H	GHYR	Negativo
0	79	1221	NV	6	H	GHYR	Negativo
1	80	1003	NV	5	H	GHYR	Negativo
2	81	1111	NV	2	H	GHYR	Positivo
3	82	1197	NV	2	M	GHYR	Negativo
4	83	2106	NV	1	H	GHYR	Negativo
5	84	4914	NV	2	H	GHYR	Negativo
5	85	1143	NV	1	H	GHYR	Negativo
7	86	7293	NV	8	H	MESTIZA	Negativo
8	87	7263	NV	4	H	MESTIZA	Negativo
9	88	6243	NV	5	H	MESTIZA	Positivo
0	89	7251	NV	5	H	MESTIZA	Negativo
1	90	6239	NV	3	H	MESTIZA	Positivo
2	91	2133	NV	6	H	MESTIZA	Positivo
3	92	2017	NV	7	H	MESTIZA	Negativo
4	93	2223	NV	6	H	MESTIZA	Negativo
5	94	6244	NV	1	H	MESTIZA	Negativo
5	95	6213	NV	2	H	MESTIZA	Positivo
7	96	1271	NV	5	H	MESTIZA	Negativo

97		6511	NV	3	H	MESTIZA	Negativo
98		4922	NV	3	H	MESTIZA	Positivo
99		4116	NV	4	H	MESTIZA	Negativo
100		6230	NV	6	H	MESTIZA	Negativo
101		1287	NV	7	H	HOLSTEIN	Positivo
102		2222	NV	3	H	HOLSTEIN	Negativo
103		2102	NV	5	H	HOLSTEIN	Positivo
104		4201	NV	7	H	HOLSTEIN	Positivo
105		2209	NV	6	H	HOLSTEIN	Negativo
106		2120	NV	2	H	HOLSTEIN	Negativo
107		4921	NV	7	H	HOLSTEIN	Positivo
108		1410	NV	7	H	HOLSTEIN	Positivo
109		1220	NV	3	H	BROWN SUIS	Negativo
110		7250	NV	2	H	BROWN SUIS	Negativo
111		4911	NV	3	H	BROWN SUIS	Positivo
112		3205	NV	1	H	BROWN SUIS	Negativo
113		2108	NV	5	H	BROWN SUIS	Negativo
114		2255	NV	4	H	BROWN SUIS	Negativo
115		COLA QUEBRADA	NV	7	H	BROWN SUIS	Negativo
116	POMA ROSA	1	NV	6	H	BROWN SUIS	Positivo
117		2	NV	1	H	BROWN SUIS	Negativo
118		3	NV	8	H	BROWN SUIS	Negativo
119		4	NV	5	H	BROWN SUIS	Negativo
120		5	NV	5	H	BROWN SUIS	Negativo
121		6	NV	3	H	BROWN SUIS	Negativo

122		7	NV	6	H	BROWN SUIS	Negativo
123		8	NV	4	H	BROWN SUIS	Negativo
124		9	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
125		10	NV	7	H	BRHAMAN	Negativo
126		11	NV	1	H	BRHAMAN	Negativo
127		12	NV	5	H	BRHAMAN	Negativo
128		13	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
129		14	NV	1	H	BRHAMAN	Negativo
130		15	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
131		16	NV	6	H	BRHAMAN	Negativo
132		17	NV	7	H	BRHAMAN	Negativo
133		18	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
134		19	NV	4	H	BRHAMAN	Negativo
135		20	NV	6	H	BRHAMAN	Negativo
136	CASA LAGOS	CACHONA	NV	4	H	HOLSTEIN	Negativo
137		NEGRA MUCA	NV	5	H	BROWN SUIS	Negativo
138		PINTADA SUCA	NV	7	H	BROWN SUIS	Negativo
139		OREJA CHURO	NV	8	H	BROWN SUIS	Negativo
140		NEGRA GRANDE (406)	NV	3	H	BROWN SUIS	Negativo
141		LA PAYASA	NV	6	H	BROWN SUIS	Negativo
142		LA AMARILLA	NV	4	H	BROWN SUIS	Negativo
143		BROWN SUIS CACHONA	NV	4	H	BROWN SUIS	Negativo
144		PINTADA GRANDE	NV	6	H	BROWN SUIS	Negativo
145		BROWN SUIS MUCA	NV	5	H	BROWN SUIS	Negativo

7	146	CHAVELA	NV	4	H	BROWN SUIS	Negativo	
8	147	CARA DE BURRO	NV	1	H	BROWN SUIS	Negativo	
9	148	SANTA INES	391	NV	8	H	BROWN SUIS	Negativo
0	149		2113	NV	6	H	BROWN SUIS	Negativo
1	150		656	NV	7	H	BROWN SUIS	Negativo
2	151		4919	NV	4	H	BROWN SUIS	Negativo
3	152		383	NV	1	H	BROWN SUIS	Negativo
4	153		1180	NV	3	H	BROWN SUIS	Negativo
5	154		1242	NV	7	H	BROWN SUIS	Negativo
5	155		1286	NV	6	H	BROWN SUIS	Negativo
7	156		1366	NV	6	H	BROWN SUIS	Positivo
8	157		568	NV	3	H	BROWN SUIS	Negativo
9	158		2023	NV	3	H	BROWN SUIS	Negativo
0	159		2103	NV	4	H	BROWN SUIS	Positivo
1	160		2014	NV	8	H	BROWN SUIS	Negativo
2	161		1360	NV	2	H	BROWN SUIS	Negativo
3	162		270	NV	6	H	BROWN SUIS	Negativo
4	163		6143	NV	7	H	BROWN SUIS	Positivo
5	164		1383	NV	8	H	MESTIZA	Negativo
5	165		1398	NV	6	H	MESTIZA	Negativo
7	166	2115	NV	4	H	BROWN SUIS	Positivo	
8	167	1378	NV	3	H	MESTIZA	Negativo	
9	168	1272	NV	3	H	HOLSTEIN	Negativo	
0	169	1127	NV	1	H	HOLSTEIN	Negativo	

170		1256	NV	5	H	HOLSTEIN	Negativo
171		TORO	NV	3	M	MESTIZO	Negativo
172	PIÑAS	1	NV	4	H	MESTIZA	Negativo
173		2	NV	4	H	MESTIZA	Positivo
174		3	NV	8	H	MESTIZA	Positivo
175		4	NV	7	H	MESTIZA	Positivo
176		5	NV	2	H	MESTIZA	Positivo
177		6	NV	4	H	MESTIZA	Positivo
178		7	NV	7	H	MESTIZA	Positivo
179		8	NV	8	H	MESTIZA	Positivo
180		9	NV	6	H	MESTIZA	Negativo
181		10	NV	3	H	MESTIZA	Negativo
182		11	NV	2	H	MESTIZA	Positivo
183		12	NV	2	H	MESTIZA	Positivo
184		13	NV	6	H	MESTIZA	Positivo
185		14	NV	6	H	MESTIZA	Positivo
186		15	NV	7	H	MESTIZA	Positivo
187		16	NV	2	H	MESTIZA	Positivo
188		17	NV	6	H	MESTIZA	Negativo
189		18	NV	4	H	MESTIZA	Negativo
190		19	NV	5	H	MESTIZA	Negativo
191		20	NV	1	H	MESTIZA	Positivo
192		21	NV	5	H	MESTIZA	Positivo
193		22	NV	8	H	MESTIZA	Negativo
194		23	NV	7	H	MESTIZA	Negativo

195		24	NV	5	H	MESTIZA	Positivo
196		25	NV	2	H	MESTIZA	Negativo
197		26	NV	2	H	MESTIZA	Positivo
198		27	NV	8	H	MESTIZA	Positivo
199		28	NV	6	H	MESTIZA	Negativo
200		29	NV	8	H	MESTIZA	Negativo