



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: “ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO DE
DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA
DIARREA VIRAL BOVINA MEDIANTE LA REACCIÓN EN
CADENA DE POLIMERASA”**

AUTOR: MARTÍNEZ MOLINA VALERIA CAROLINA

DIRECTOR: PROAÑO PÉREZ FREDDY, Ph.D.

SANGOLQUÍ

2017

CERTIFICACIÓN



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA

CERTIFICACION

Certifico que el trabajo de titulación **“ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA”** realizado por la señorita **VALERIA CAROLINA MARTINEZ MOLINA** , ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autoriza a la señorita **VALERIA CAROLINA MARTINEZ MOLINA** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 27 de Julio del 2017

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Freddy Proaño'.

Freddy Proaño, Ph.D.

Director

AUTORIA DE RESPONSABILIDAD



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y
AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA**

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **VALERIA CAROLINA MARTINEZ MOLINA**, con cédula de identidad N° 1714419692, declaro que este trabajo de titulación **“ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA”** ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada

Sangolquí, 27 de Julio del 2017

VALERIA CAROLINA MARTINEZ MOLINA

1714419692

AUTORIZACIÓN



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y
AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA**

AUTORIZACIÓN

Yo, **VALERIA CAROLINA MARTINEZ MOLINA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la Institución el presente trabajo de titulación **“ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA”**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada

Sangolquí, 27 de Julio del 2017

VALERIA CAROLINA MARTINEZ MOLINA

1714419692

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres y mi hermana, por su apoyo incondicional no solo durante mi proceso de formación profesional, sino también por su amor, comprensión y dedicación, por guiarme en cada paso con paciencia, por ser el pilar fundamental en el que se ha cimentado mi vida.

Valeria Carolina Martínez Molina

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por apoyarme en cada paso de mi vida, por guiarme y ayudarme a convertir en la persona que soy hoy en día, por brindarme las herramientas, la fortaleza y el amor para superar cualquier obstáculo.

A mi hermana, por ser mi mejor amiga, por enseñarme a ser fuerte en momentos de adversidad, por ser uno de los apoyos fundamentales de mi vida, por su amor incondicional.

A mi director de Tesis Freddy Proaño por brindarme todo su apoyo y conocimientos poder culminar esta etapa de mi desarrollo profesional.

A todas las personas que conforman el laboratorio de biología molecular de AGROCALIDAD, por brindarme su guía, conocimientos y ayuda.

A mis amigos por ser parte de mi vida y haberme brindado tantos momentos de felicidad, a mi amiga Carolina por apoyarme y compartir durante la realización de este trabajo, y brindarme su sincera amistad

Valeria Carolina Martínez Molina

TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	i
AUTORIA DE RESPONSABILIDAD	ii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xi
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación	2
1.3 Objetivos de investigación	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
1.4 Hipótesis	4
1.5 Marco Teórico	5
1.5.1 Virus de la Diarrea Viral Bovina.	5
1.5.1.1 Taxonomía y estructura	5
1.5.1.2 Genoma	5
1.5.1.3 Clasificación.....	6
1.5.2 Patogenia.....	7
1.5.3 Diagnóstico de la DVB	9
1.5.4 Reacción en cadena de polimerasa: principios.....	11
1.5.4.1 RT-PCR.....	12
1.5.4.2 Parámetros para estandarizar una PCR	13
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1 Descripción de las muestras.....	15
2.2 Selección de los cebadores.....	15
2.3 Evaluación de los cebadores <i>in silico</i>	16
2.4 Extracción de ARN.....	16
2.5 Retrotranscripción	16
2.6 Estandarización de la PCR convencional.	17
2.7 Ensayo de sensibilidad analítica	19
2.8 Ensayo de especificidad.....	21
2.9 RT-PCR como método de diagnóstico	21

CAPÍTULO III: RESULTADOS	24
3.1 Evaluación <i>in silico</i> de los cebadores	24
3.2 Extracción de ARN	25
3.3 Estandarización de la PCR convencional	25
3.3.1 Evaluación de temperaturas de fusión	25
3.3.2 PCR con gradiente de temperaturas	25
3.3.3 Ensayo de variación de concentraciones de cebadores	26
3.3.4 Ensayo de variación de concentraciones de Cloruro de magnesio	27
3.3.5 Ensayo de tiempo de alineamiento	27
3.3.6 Condiciones de la PCR estandarizada	28
3.3.7 Especificidad de reacción	29
3.3.8 Sensibilidad analítica	30
3.4 PCR como método de diagnóstico	32
3.4.1 Ensayo con Beta actina	34
3.4.2 Ensayo con los cebadores para Panpestivirus de las muestras de animales con sospecha de DVB	36
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	37
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
5.1 Conclusiones	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Concentraciones recomendadas de reactivos para estandarizar una PCR	13
Tabla 2.	Condiciones de ciclado recomendadas para una PCR estándar de tres etapas	14
Tabla 3.	Descripción de las secuencias de los cebadores y la posición genómica que amplifican del VDVB.....	15
Tabla 4.	Concentraciones y volúmenes para la elaboración del Mix I para Reverso transcripción con rando hexámeros y la enzima RT-M-MLV	16
Tabla 5.	Concentraciones y volúmenes de los reactivos necesarios para la elaboración del Mix II para Reverso transcripción con rando hexámeros y la enzima - RT-M MLV	17
Tabla 6.	Concentraciones y volúmenes de los reactivos necesarios para la amplificación de la región 5' UTR del VDVB.	18
Tabla 7.	Perfil térmico para la amplificación de la región 5' UTR del VDVB con gradiente de temperaturas.....	18
Tabla 8.	<i>Perfil térmico para la amplificación de la región 5' UTR del VDVB.</i>	19
Tabla 9.	<i>Tabla de concentraciones para la amplificación del control interno Beta-actina</i>	22
Tabla 10.	<i>Perfil térmico para la amplificación del gen Beta actina</i>	22
Tabla 11.	Descripción de los cebadores para Panpestivirus	23
Tabla 12.	<i>Condiciones de reactivos estandarizadas para la detección del VDVB.....</i>	28
Tabla 13.	<i>Condiciones de ciclado para la PCR estandarizada para la detección del Virus de DVB.....</i>	29
Tabla 14.	Datos de los animales muestreados con sospecha de DVB.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procedimiento para la realización de diluciones seriadas del producto purificado del control positivo de la cepa Singer del VDVB para el ensayo de sensibilidad. (A)Procedimiento de diluciones seriadas en agua DEPC (B) Procedimiento de diluciones en cADN	20
Figura 2. Resultados de Primer Blast para la evaluación <i>in silico</i> de los cebadores para DVB con todas las secuencias del NCBI.....	24
Figura 3. Resultados del ensayo de gradiente de temperaturas de alineamiento	26
Figura 4. Productos de PCR del ensayo de variación de concentraciones de cebadores en gel de agarosa al 1,5%	26
Figura 5. Productos de PCR del ensayo de variación de concentraciones de magnesio en gel de agarosa al 1,5%	27
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR variando el tiempo de alineamiento.....	28
Figura 7. Productos de PCR del ensayo de especificidad.:.....	29
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR purificados..	30
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR del ensayo de sensibilidad en agua.....	31
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR del ensayo de sensibilidad en cADN.....	32
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de las muestras de lavado prepucial.	33
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR correspondientes a las muestras:con sospecha de DVB	34
Figura 13. Ensayo con control interno de muestras de lavado prepucial	35
Figura 14. Ensayo con control interno de muestras sanguíneas.....	35
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se observan los productos de PCR con los cebadores para pan-pestivirus de las muestras sanguíneas.	36

RESUMEN

La diarrea viral bovina (DVB) es una de las enfermedades de mayor prevalencia en el ganado vacuno, siendo la causa grandes pérdidas económicas, ya que merma los procesos de producción y reproducción. Debido a la amplia gama de manifestaciones clínicas que puede presentar esta enfermedad el diagnóstico en laboratorio es imprescindible para identificar a los animales con infecciones agudas y persistentes, para ello se puede contar con la reacción en cadena de polimerasa PCR. El objetivo de este trabajo fue estandarizar las concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado necesarias para identificar una sección de 290 pb de la región 5'UTR de la cepa de control positivo Singer, mediante el par de cebadores P 103 y P 372, posterior a la extracción, purificación y retrotranscripción del ARN. Después de haber establecido las condiciones para la detección del fragmento de 290 pb se trabajó con 8 muestras de sangre venosa de animales con sospecha de la enfermedad procedentes de dos haciendas lecheras del cantón Mejía, a las cuales se extrajo en ARN al igual que con los controles positivos y se realizó la RT-PCR. No se detectaron amplicones para las muestras sanguíneas, sin embargo para corroborar el diagnóstico se realizaron dos PCRs de las mismas muestras, una para detectar el control interno beta actina y otra utilizando el par de cebadores para Panpestivirus PanPest 1 y PanPest 2. Se confirmó la ausencia de virus en los animales de los cuales se tenía sospecha de enfermedad mediante los cebadores para Panpestivirus y el control interno generó amplicones para todas las muestras evidenciando que la calidad del cDNA fue adecuada.

Palabras claves:

- **DIARREA VIRAL BOVINA**
- **ECUADOR**
- **ENFERMEDADES INFECCIOSAS**
- **PESTIVIRUS**
- **REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA**

ABSTRACT

Bovine viral diarrhea is one of the most prevalent diseases in cattle, and causes great economic losses, since it reduces production and causes reproductive failure. As a result of the wide variety of clinical manifestations of the disease, laboratory diagnosis is essential to identify animals with acute and persistent infections, one of them is the polymerase chain reaction PCR.

Following the RNA extraction and purification of the viral positive control, the aim of this investigation was to standardize the reagents concentrations and thermocycler conditions necessary to amplify a 290 bp section of the positive control 5'UTR region, employing an RT-PCR using the primer pair P103-P372.

After establishing the optimal PCR conditions, eight venous blood samples from suspect animals from two dairy farms from the Mejia canton were taken. The RNA of both, positive controls and field samples, was extracted and RT-PCR was performed. No amplicon was produced when field samples were tested. However, to confirm the correct diagnosis an internal control, beta actin, and the primer pair for the panpestivirus PanPest 1 and PanPest 2 were tested.

The Panpestivirus amplicon was absent but the internal control was present in the field samples indicating that cDNA quality was adequate for amplification and the virus was not present.

Key words:

- **BOVINE DIARRHEA VIRUS**
- **ECUADOR**
- **INFECTIOUS DISEASE**
- **PESTIVIRUS**
- **POLYMERASE CHAIN REACTION**

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

cADN: ADN complementario.

DVB: diarrea viral bovina

g: gramos

M: molar

mM: mili molar

ng: nano gramos

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de Polimerasa

pg: pico gramos

PI: persistentemente infectado

PPC: Peste porcina clásica

UTR: Región no traducida

VDVB: virus de diarrea viral bovina

μ L: micro litros

μ l: microlitro

μ M: micro molar

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

En 1940 por primera vez se reportó en Canadá una enfermedad del ganado caracterizada por diversos signos clínicos como diarrea, fiebre, descarga nasal, ulceraciones nasales y orales, así como lesiones en la piel, la región inguinal y perianal, dentro de las orejas y muslo interior. En 1946 en Estados Unidos surge una enfermedad cuyos signos clínicos coincidía con la enfermedad descrita anteriormente en Canadá. En 1953 Ramsay y Chivers reportaron una enfermedad cuyos signos clínicos abarcaban además la diarrea, adelgazamiento patológico con ulceraciones de la mucosa del tracto alimenticio y una mortalidad del 100%. Años después se determinó que el mismo virus fue el causante de los signos clínicos reportados en los distintos países, el cual fue llamado Virus de diarrea viral bovina (DVB). En la década de los 60s y 70s se estableció la relación de la DVB con anomalías reproductivas como abortos y teratogenicidad (Bohórquez, Vargas, & Jaime, 2013; Goens, 2002).

Desde sus inicios, pasando por la década de los 90s donde los brotes de la enfermedad fueron devastadores, se ha podido observar el impacto de esta enfermedad en el sector ganadero, ya que provoca grandes pérdidas económicas a nivel mundial; en Estados Unidos se ha calculado una pérdida de aproximadamente 7000 millones de dólares asociados a la DVB. Actualmente esta es una de las enfermedades de mayor prevalencia en el ganado bovino (Lanyon, Hill, Reichel, & Brownlie, 2013).

Los signos clínicos de la DVB dependerán de la edad, estado inmunológico y edad gestacional en la cual se produce la infección (Rondón, 2006); siendo este último de gran importancia, ya que conlleva a la aparición de animales persistentemente infectados (PI), que constituyen el mayor reservorio de virus en las poblaciones. La identificación de animales PI es crítica para el control de la enfermedad, su detección puede llevarse a cabo por métodos serológicos como ELISA o de detección de ácido nucleico como la RT-PCR, esta última presenta como ventaja su alta sensibilidad y especificidad (OIE, 2015).

Gracias al avance en el campo de la biología molecular, a nivel internacional se ha realizado muchos estudios para la estandarización de métodos de detección moleculares como la PCR para el diagnóstico del virus de la diarrea viral bovina (VDVB), como el propuesto por Hamel, Wasylshen, & Nayar, en 1995, brindando una alternativa de diagnóstico frente al aislamiento viral en cultivo celular. Otro ensayo para la detección del VDVB mediante PCR fue desarrollado por Pilz, Alfieri, Lunardi, & Alfieri, en 2007, utilizando un par de primers específicos para la región 5'UTR.

En el Ecuador se ha determinado que existen casos de DVB con infección subclínica, siendo la provincia de Pichincha la que más casos reporta. Esta enfermedad merma los procesos productivos y reproductivos en la ganadería. Actualmente, el método de detección utilizado en el país es ELISA, que ha servido para desarrollar estudios de prevalencia de la enfermedad (Labanda, 2015). Al momento en el Ecuador no se realizan ensayos de RT-PCR para el diagnóstico de la DVB.

1.2 Justificación

De acuerdo con Baker (1990), la DVB es una enfermedad de fácil transmisión, distribuida alrededor de todo el mundo. Económicamente es una de las enfermedades que mayores pérdidas provoca debido a la disminución en la productividad ganadera a causa de los trastornos de la reproducción asociados a los signos clínicos de la enfermedad, así como la muerte en la etapa prenatal y el apareamiento de individuos persistentemente infectados (PI), que representan el mayor reservorio del virus en las poblaciones.

Acorde con los datos de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC), en 2015 realizada por el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), entre las actividades pecuarias del país, la producción de ganado bovino es el de mayor importancia a nivel nacional, con 4,12 millones de cabezas. Pese a que la reproducción juega un papel primordial en la cadena cárnica y láctea, la falta de conocimiento entre los ganaderos sobre los problemas reproductivos y económicos

ligados a la DVB, impide la identificación de animales con infección aguda y persistente (Cangahuamin, 2011; EL UNIVERSO, 2011; ESPAC, 2015).

Debido al impacto de la DVB en el sector pecuario se han desarrollado planes de mitigación y erradicación de la enfermedad alrededor de todo el mundo, incluyendo el Ecuador, que a través de la Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro (AGROCALIDAD); investiga las enfermedades que afecten a la ganadería a nivel nacional, para poder realizar el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades de notificación obligatoria , que incluye a la Diarrea Viral Bovina (AGROCALIDAD, 2013).

El amplio rango de manifestaciones clínicas de la enfermedad hace indispensable el diagnóstico en laboratorio empleando técnicas altamente específicas y sensibles. Pese a que en el país existen estudios sobre la prevalencia de la enfermedad utilizando la técnica de ELISA, en el Ecuador no se ha aplican técnicas de diagnóstico molecular como es la PCR, que presenta claras ventajas frente a los métodos serológicos, debido a su alta especificidad y sensibilidad, además de la reducción considerable del tiempo para obtener un diagnóstico, en comparación con otros métodos.

Por los motivos anteriormente expuestos, la presente investigación que tiene como objetivo diagnosticar DVB mediante la estandarización de una RT-PCR para la detección del VDVB, presenta una clara ventaja para AGROCALIDAD, la institución que financia el proyecto. De igual manera, este proyecto incide en el sector ganadero del país, ya que se pueden identificar de manera rápida y segura a los animales persistentemente infectados y evitar su comercialización, contribuyendo a los planes de control agro sanitario del país y mejorando las expectativas de comercialización.

1.3 Objetivos de investigación

1.3.1 Objetivo general

Validar un método de diagnóstico para la detección del virus de la diarrea viral bovina mediante la reacción en cadena de polimerasa.

1.3.2 Objetivos específicos.

- Estandarizar un método de diagnóstico para la detección del virus de la diarrea viral bovina mediante la reacción en cadena de polimerasa, analizando las concentraciones de $MgCl_2$, cebadores, y condiciones de termociclado para la detección de VDVB
- Evaluar la especificidad de cebadores para la DVB *in sílico* e *in vitro*
- Determinar la sensibilidad de la prueba

1.4 Hipótesis

La reacción de RT-PCR que fue estandarizada posee una sensibilidad analítica superior a 1 ng.

1.5 Marco Teórico

1.5.1 Virus de la Diarrea Viral Bovina.

1.5.1.1 Taxonomía y estructura

La DVB es causada por un virus de ARN de cadena simple, no segmentado y polaridad positiva, perteneciente a la familia Flaviviridae, del género *Pestivirus*. A este género también pertenecen virus como el virus de la peste porcina clásica (VPPC) y la enfermedad ovina de la frontera (VEF) (OIE, 2015). Al ser un virus de RNA de cadena simple, su genoma es altamente propenso a mutaciones, las cuales le confieren heterogeneidad para poder adaptarse y evadir al sistema inmune del hospedero (Ridpath, 2003).

Es un virus esférico y envuelto, con un tamaño de 40 a 60 nm, su cápside proteica, en cuyo interior se compacta el material genético, está rodeada por una membrana fosfolipídica a la cual se encuentran ancladas tres glicoproteínas (Escudero & Morales, 2013; Labanda, 2015).

1.5.1.2 Genoma

La longitud del genoma del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es de aproximadamente 12 Kpb. Consiste en un solo marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés), flanqueado por dos regiones no codificantes (UTR por sus siglas en inglés) en el extremo 5' y el 3', respectivamente.

Se ha determinado que la región más conservada en el genoma es la región 5' UTR, donde se encuentran los marcadores de virulencia. Posee una identidad de 86% a 93% entre las cepas de virus del genotipo tipo 1, y de más del 90% entre las cepas del virus del genotipo 2, y un 75% entre los virus de tipo 1 con los del tipo 2. Por tales motivos, a más de su importancia para la iniciación de la traducción del ORF, esta región es un locus frecuentemente utilizado para estudios epidemiológicos y taxonómicos (Esmaelizad & Kargar-Moakhar, 2014; Kim & Dubovi, 2003).

El marco de lectura abierto origina una poliproteína, que luego de sufrir un procesamiento cotraduccional y postraduccional por parte de proteasas virales y celulares, da lugar a proteínas estructurales como: C, Erns, E1 y E (Soltan et al., 2015); y seis proteínas no estructurales relacionadas con la replicación viral, entre ellas principalmente la proteína Npro, la cual inhibe la respuesta inmune innata, impidiendo la producción de interferón 1 o antiviral para facilitar la replicación vírica en el hospedero (Bohórquez et al., 2013; Goens, 2002).

1.5.1.3 Clasificación

En dependencia de las diferencias antigénicas, se han clasificado a los genotipos del virus de la diarrea viral bovina como tipo 1 (VDVB-1) y tipo 2 (VDVB-2), los cuales pueden ser diferenciados mediante anticuerpos monoclonales o suero policlonal dirigidos principalmente contra las proteínas estructurales E2 o mediante análisis genético. Ambos genotipos cuentan con subdivisiones en función de sus diferencias genéticas (Vilcek et al., 2001 citado por OIE, 2015). Recientemente se ha descubierto un nuevo tipo de pestivirus, relacionado tanto genética como antigénicamente al VDVB, el cual ha sido bautizado como VDVB de tipo tres (VDVB-3) o Hoobi like-virus (Ridalph 2013).

El genotipo 1 incluye a las cepas: NADL, SINGER, NY-1, C virus, TGAN y Osloss, mientras que el genotipo 2 comprende a las cepas NY-93, 890, AZSPLN, MS-1, SY-89 y V/FLL (Ridpath et al., 2000 citado por Morales, 2002).

Basado en los efectos causados en cultivos celulares, ambos genotipos se dividen en dos biotipos: no citopatogénico (ncp) y citopatogénico (cp). Los biotipos cp se caracterizan por inducir a la apoptosis en cultivos celulares, lo que no sucede con los biotipos ncp. Sin embargo, el biotipo ncp es el de más circulación en las poblaciones de bovinos, causando mayores problemas en la salud del animal (Lanyon et al., 2013).

Tanto los genotipos como biotipos se originan por mutaciones genéticas. Los genotipos y subgenotipos del VDVB surgen debido a que la alta tasa de mutaciones de

las RNA polimerasas virales provoca incorporaciones erróneas de nucleótidos durante la replicación. Por otra parte las diferencias en los biotipos mayoritariamente surgen por mutaciones originadas por recombinación, en donde segmentos de secuencias genéticas codificantes se insertan dentro del genoma viral, dichas secuencias pueden surgir de otros VDVB o del mismo hospedero, es por esta razón que se considera que el tipo cp se origina a partir del tipo ncp (Jara, 2008; Ridpath, 2003).

1.5.2 Patogenia

Los bovinos son el hospedero principal del virus de la DBV; sin embargo, puede llegar a infectar otro tipo de animales como ovejas, cabras y cerdos. (APHIS, 2007). El virus posee una gran afinidad por el sistema inmunológico y reproductor; y particularmente por células mitóticamente activas como son linfocitos, fagocitos mononucleares y células epiteliales; los virus del tipo ncp presentan tropismo por las células linfocitarias, mientras que las cepas cp son más afines a células epiteliales (Rondón, 2006) .

Posterior a la infección, la diseminación ocurrirá cuando el virus se encuentra libre en el suero o los leucocitos infectados con el mismo (Rondón, 2006) . El virus de la diarrea viral bovina presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde elevada temperatura, leucopenia, reducción de la producción láctea y tasas de natalidad, hasta la muerte del animal (Fairbanks, Schnackel, & Chase, 2003).

a) Infecciones agudas.

Las infecciones agudas son causadas por virus ncp durante la etapa post natal en bovinos inmunocompetentes y seronegativos, siendo más frecuente en animales jóvenes (Brownlie, 1990; OIE, 2015). Muchas infecciones originadas por cualquiera de los genotipos del VDVB resultan en una infección con signos clínicos leves o manifestaciones subclínicas, no obstante en algunos casos, virus de tipo 2 puede provocar una infección aguda severa (Ridpath, 2003).

En una infección aguda se produce una viremia de 7 a 10 días, los signos clínicos pueden variar de animal en animal y van desde fiebre, leucopenia, trombocitopenia,

descarga nasal, inmunosupresión (asociada a la disminución en la población de linfocitos), diarrea, apoptosis en el timo y signos respiratorios; la gravedad de estos signos está en función de la cepa viral y la presencia de otros patógenos que provocan infecciones secundarias o el agravamiento de infecciones preexistentes como consecuencia de la inmunosupresión causada por el virus (Burgasí, 2014; Lanyon et al., 2013; OIE, 2015; Raya, Gomez-Villamandos, Sánchez-Cordón, & Bautista, 2012). En este periodo, el virus puede detectarse en secreciones nasales y oculares, sangre (Brownlie, 1990), y en el espermatozoides en un periodo de tiempo corto después y durante de la infección (OIE, 2015).

Los efectos de las infecciones agudas en la reproducción incluyen tasas de reproducción reducidas, de muerte embrionaria temprana, abortos, efectos teratogénicos, y disminución de la densidad y motilidad de la espermatozoides e incrementos en anomalías de la misma (OIE, 2015).

b) Infección fetal.

Los efectos de la infección durante la etapa prenatal son variados, complejos y dependerán de la edad gestacional en la que se haya producido la infección (Lanyon et al., 2013). Si la infección se da durante los primeros 18 días de gestación, mientras el embrión aún no se ha implantado, no se desarrollará una infección fetal; antes de los 25 días, en la mayoría de los casos conducirá a la muerte embrio-fetal. La infección de la hembra a partir del día 30 y durante el primer trimestre de gestación puede ocasionar el nacimiento de individuos inmunotolerantes y con una infección del VDVB persistente de por vida. Una infección entre los 80 a 150 días ocasiona efectos teratogénicos en el feto, entre ellos la atrofia cerebelar, hidrocefalia, degeneración ocular, defectos esqueléticos y un posible retraso en el crecimiento, probablemente a consecuencia de una disfunción hipofisaria. El nacimiento de terneros normales seropositivos puede darse cuando la infección se da después de los 180 días de gestación (Lanyon et al., 2013; OIE, 2015).

c) Infecciones persistentes y enfermedad de las mucosas

Las infecciones persistentes son provocadas por el contagio del feto con virus ncp durante el primer trimestre de gestación. Durante el desarrollo fetal el VDVB inhibe la inducción del interferón tipo I, permitiendo al virus sobrevivir en el hospedero. Estos

animales son seronegativos al VDVB, no eliminarán al virus del cuerpo y albergan grandes cantidades de virus en sus excreciones y secreciones como leche, semen, saliva, secreciones nasales, orina sangre, por lo tanto estos individuos son el mayor reservorio del virus y una de las fuentes de mayor importancia de infección entre las poblaciones de ganado (Lanyon et al., 2013; OIE, 2015).

En animales PI el VDVB se localiza en nodos linfáticos, en células linfoides y del tracto gastrointestinal, pulmones, piel y cerebro; en el caso de cepas ncp se encuentran de manera significativa en sangre (OIE, 2015).

Los animales persistentemente infectados pueden desarrollar una enfermedad severa llamada enfermedad de las mucosas (MD), que resulta cuando un animal persistentemente infectado con un virus ncp es posteriormente infectado con una cepa cp cercanamente relacionada u homóloga del virus ncp; la MD provoca lesiones de las superficies de la mucosa del tracto alimenticio y de los tejidos linfoides, diarreas sanguinolentas y muerte del animal (Brodersen, 2014; Lanyon et al., 2013).

1.5.3 Diagnóstico de la DVB

Técnicas de laboratorio

La adecuada implementación de pruebas de diagnóstico es la clave para los programas de control y erradicación de la DVB, siendo de vital importancia la identificación y eliminación de animales PI (Labanda, 2015). El diagnóstico para DVB está basado en métodos de laboratorio como aislamiento viral, métodos serológicos para la detección de antígenos virales o anticuerpos contra el virus y detección de ácido nucleico (Morales, 2002).

a) **Aislamiento viral cultivos celulares:** Este método ha sido considerado por Saliki & Dubovi (2004) como un Gold estándar para DVB. El virus puede aislarse en cultivos monocapa de células bovinas tanto renales, pulmonares, testiculares y de los cornetes nasales, siendo el único método para determinar el biotipo del virus. Sin embargo es un método laborioso, que demanda altos costos, tiempo, y requerimientos específicos para evitar que el diagnóstico se vea afectado por concentraciones muy

bajas del virus y anticuerpos contra el mismo. Por estas razones se imposibilita el procesamiento simultáneo de numerosas muestras dentro de los laboratorios (Lanyon et al., 2013; OIE, 2015)

b) **ELISA:** (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) es una técnica que usa antígenos o anticuerpos enlazados con una enzima, la misma que al interactuar con un sustrato determinado generara un producto detectable ya sea por cambios de color a simple vista o por espectrofotómetro (Labanda, 2015).

Esta técnica permite evaluar el estado inmunológico e identificar infecciones agudas en el rebaño. La detección de antígenos mediante la técnica de ELISA es un método simple y rápido para la identificación de animales PI, y en comparación con otros métodos como aislamiento viral, se ha reportado una sensibilidad entre 67 a 100% y una especificidad de 98,8% al 100% (Lanyon et al., 2013). Se debe tener en consideración que los ELISA desarrollados con el antígeno de un genotipo del VDVB podrían no ser eficientes detectando antígenos inducidos por otro genotipo, por tanto las pruebas realizadas con este método deben escogerse en función de las cepas circulantes en cada país (OIE, 2015).

c) **Inmunohistoquímica:** La inmunohistoquímica permite identificar antígenos del VDVB en cortes de tejido, permitiendo relacionar de manera exacta el antígeno viral, el tipo de células y las lesiones histológicas. En el caso de animales PI se puede partir de casi cualquier tejido fijado en formalina y embebido en parafina. Sin embargo, se han observado mejores resultados en tejidos de ganglios linfáticos, piel, glándulas, tiroides, abomaso, encéfalo y placenta (Labanda, 2015; Lanyon et al., 2013; OIE, 2015). Esta técnica a pesar de presentar buenos resultados, está sujeta a ciertas desventajas, entre ellas su laboriosidad, y la necesidad de personal con gran experiencia dado que está sujeta a errores técnicos y su sistema de evaluación es subjetivo (Lanyon et al., 2013).

d) **RT-PCR:** Es uno de los métodos más sensibles para el diagnóstico y detección de virus de ARN (O'Connell, 2002)

La amplificación de la región 5' no traducida, se ha utilizado para garantizar una mayor detección e identificar ambos genotipos virales. Pueden utilizarse muestras como homogenizados de órganos para detectar una infección aguda, o sueros

sanguíneos para identificar infecciones persistentes. Puede utilizarse la RT-PCR en tiempo real, la cual presenta ventajas frente a otros métodos por su alta sensibilidad y el menor tiempo requerido para su realización, presentando límites de detección tan bajos como 1000 y 100 copias para VDVB tipo 1 y 2 respectivamente. Sin embargo, su elevada sensibilidad puede originar resultados falsos positivos (Labanda, 2015; Lanyon et al., 2013; Morales, 2002; OIE, 2015).

En la PCR no existe interferencia con anticuerpos, por tanto su especificidad no es afectada, lo que le confiere una ventaja frente a otros métodos como aislamiento viral, permitiendo obtener resultados robustos en poco tiempo (Burbano, Vera, & Ramírez, 2006).

1.5.4 Reacción en cadena de polimerasa: principios.

En la reacción en cadena de polimerasa o PCR, se parte de una secuencia de ADN molde para generar de forma quasi-exponencial millones de copias de la misma; mediante una amplificación enzimática y repetidos ciclos de síntesis (Green & Sambrook, 2012; Pérez, 2008).

Cada ciclo de síntesis se compone de tres fases que son:

- **Desnaturalización:** Consiste en la separación de la doble hélice de ADN para que la polimerasa inicie la síntesis de las copias de la cadena molde.
- **Alineamiento:** una vez separada la doble cadena de ADN, los cebadores, que son complementarios a la secuencia blanco formarán uniones o quedarán alineados con esta en la zona 3' complementaria, formando regiones pequeñas de cadena doble.
- **Extensión:** Se inicia la síntesis del ADN en el extremo 3' de los cebadores alineados con la cadena molde, a la temperatura en la cual la polimerasa es más activa, la elongación se realiza en sentido 5' a 3', en donde la polimerasa incorpora los dNTP's que se encuentran en el medio (Green & Sambrook, 2012).

Este proceso se repite entre 25 a 35 veces dentro de un termociclador, el cual controla el tiempo y la temperatura de cada ciclo (Green & Sambrook, 2012).

1.5.4.1 RT-PCR

Una de las variantes de la PCR es la RT-PCR, donde el ADN complementario(cADN) es sintetizado a partir de mRNA mediante una transcripción reversa, seguido de una cADN PCR para la detección de una región del genoma viral mediante cebadores específicos(McPherson & Møller, 2006).

Ya sea que se parta de un ARN total o ARN mensajero, la retrotranscripción emplea una enzima transcriptasa reversa para la elaboración de una cadena de cADN a la molécula molde de ARN, empleando trifosfatos de desoxirribonucleicos o dNTP's, buffer y un cebador como los *random hexamer*, los cuales contienen con todas las probables combinaciones de bases. Entre las enzimas más utilizadas se encuentra a la MMLV (virus Moloney de la leucemia murina) y AMV (virus de la mieloblastosis aviaria) (Ceccotti, Sforza, Cazoglio, Luberti, & Flichaman, 2007).

Los componentes necesarios para llevar a cabo la amplificación del cADN mediante la RT-PCR son:

ADN polimerasa termoestable para catalizar la síntesis de ADN dependiente de molde. Oligonucleótidos sintéticos o cebadores, de 20 a 25 bases de longitud que flanquean la zona que será amplificada, son uno de los componentes cruciales que determina la especificidad de la PCR; el diseño cuidadoso de los cebadores garantiza la obtención de los productos deseados con un alto rendimiento(Green & Sambrook, 2012).

ADN molde: Contiene la secuencia que será amplificada.

Desoxirribonucleótidos: son el sustrato de la enzima, deben ser usados en iguales concentraciones. Un exceso de dNTPs puede provocar el apareamiento de productos inespecíficos.

Cloruro de Magnesio: es el cofactor de la enzima, tiene incidencia en la hibridación de cebadores, especificidad de la reacción y la formación de primer-dimers (Pérez, 2008)

Buffer: provisto con cada enzima establece las condiciones de cada reacción (Ceccotti et al., 2007).

Aditivos: dependiendo de los requerimientos de cada reacción se pueden agregar ciertos aditivos como DMSO (dimetilsulfoxido), formamida, detergentes no iónicos, entre otros (Lorenz, 2012).

1.5.4.2 Parámetros para estandarizar una PCR

Los diferentes parámetros de reactivos y las condiciones de ciclado de cada PCR se pueden modificar en dependencia de las necesidades del investigador, en la Tabla 1 se enumera los principales reactivos y las concentraciones recomendadas de los mismos para una PCR.

Tabla 1 Concentraciones recomendadas de reactivos para estandarizar una PCR

Reactivo	Concentración recomendada
dNTP'S	0,2 mM de cada dNTP
Mgcl₂	1-4 mM
Cebador delantero	0,1-1 uM
Cebador reverso	0,1-1 uM
Enzima	0,5-2,5 unidades por cada 50 µl de reacción, de acuerdo a las instrucciones del fabricante
ADN molde	<0,5 µg/50 µl
Agua estéril	La requerida para completar el volumen final de reacción necesitado.

Las temperaturas de la reacción dependerán de la enzima utilizada, la secuencia del ADN blanco y los cebadores a emplear, en la tabla 2 se puede observar las temperatura y tiempos recomendados para una PCR estándar de tres etapas (Lorenz, 2012).

Tabla 2.
de ciclado recomendadas para una PCR estándar de tres etapas

Condiciones

Ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C a 98°C	1 minuto	1
Desnaturalización	94°C	10 a 60 segundos	
Alineamiento	5°C por debajo de la temperatura de fusión	30 segundos	
Extensión	70°C a 80°C	Dependiente del amplicón y la enzima polimerasa dependiente de ADN	25-35
Extensión final	70°C a 80°C	5 minutos	1
Mantención	4°C	∞	1

Nota: Tomado de Lorenz, 2012.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Descripción de las muestras

Como control positivo se trabajó con un cultivo de la cepa de DVB Singer, procedente de los laboratorios del Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), que fue reconstituida acorde a las instrucciones del fabricante, posteriormente se cultivó en una monocapa de células testiculares bovinas, y se almacenó a -80°C para su posterior utilización. Se recolectaron 8 muestras sanguíneas de ganado con historial de aborto, problemas reproductivos, o con sospecha de la enfermedad por parte del veterinario, procedentes de fincas del cantón Mejía, las muestras fueron colectadas en tubos con anticoagulante EDTA, y transportadas manteniendo la cadena de frío, una vez en el laboratorio se mantuvieron a cuatro grados antes de realizarse la extracción de ARN.

2.2 Selección de los cebadores

Se utilizó un par de cebadores diseñados por 6 para la amplificación de la región altamente conservada 5'UTR. La posición genómica que amplifican los cebadores se muestra en pares de bases (pb) y las secuencias de nucleótidos se detallan a en la Tabla 3.

Tabla 3. Descripción de las secuencias de los cebadores y la posición genómica que amplifican del VDVB, descritos por Weinstock et al. en 2001.

Nombre del cebador	Posiciones genómicas (pb) 5'-3'	Secuencia 5'-3'
Cebador delantero P103	103 a 124	TAGCCATGCCCTTAGTAGGAC'
Cebador reverso P372	372 a 39	ACTCCATGTGCCATGTACAGC

2.3 Evaluación de los cebadores *in silico*

Mediante el programa bioinformático “Primer-BLAST - NCBI - NIH” se probó *in silico* la secuencia de cebadores, comparando todas las secuencias del NCBI para verificar la amplificación de la secuencia deseada.

2.4 Extracción de ARN.

Se realizó la extracción de ARN de las muestras y los controles empleando el kit High Pure Viral Nucleic Acid de Roche, acorde con las instrucciones del fabricante, posteriormente se cuantificaron las concentraciones de ácidos nucleicos de cada muestra mediante espectrofotometría, utilizando el equipo NANODROP 8000. El ARN extraído fue almacenado a -80°C .

2.5 Retrotranscripción

Una vez obtenido el ARN se realizó la retrotranscripción con el kit de la enzima M-MLV de Invitrogen. La reacción se llevó a cabo con 200 unidades de transcriptasa reversa en un volumen de reacción de 20 μl , que contenían 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl_2 , 0.1 M DTT, 40 U/ μl de RNaseOUT, 50 ng de random heámeros y 10 mM de dNTP Mix (Tabla 4 y 5).

Tabla 4. Concentraciones y volúmenes para la elaboración del Mix I para Reverso transcripción con rondon hexámeros y la enzima RT-M-MLV

Reactivo	Co	Vol rx (μl)
H ₂ O		3
Random hexámeros	50 ng/ μl	1
dNTP's	10 mM	1
ARN	1 a 5 ng	5
Volumen final de reacción		10

Co = Concentración inicial del reactivo.

Vol rx (μ l)= Volumen requerido de reactivo en micro litros (μ l), para un volumen de reacción de 20 μ l.

Tabla 5. Concentraciones y volúmenes de los reactivos necesarios para la elaboración del Mix II para Reverso transcripción con rando hexámeros y la enzima RT-M-MLV

Reactivo	Co		Vol rx (μ l)
H ₂ O			2
Buffer RT	5	X	4
0,1 MDTT	0,1	M	2
RNAaseOUT	40	U/ μ l	1
M-MLV	200	U/ μ l	1
Volumen final de reacción			10

Co = Concentración inicial del reactivo.

Vol rx (μ l)= Volumen requerido de reactivo en micro litros (μ l), para un volumen de reacción de 20 μ l.

2.6 Estandarización de la PCR convencional.

Se reconstituyeron los cebadores P103 y P372 en agua DEPC, obteniendo una solución STOCK en una concentración final de 100 μ M, y se almacenaron a -20 °C.

Se calculó la temperatura de disociación de los cebadores mediante los programas Tm Calculator de BioMath de Promega. A partir de ello se restó cinco grados a la temperatura obtenida para cada cebador; obteniéndose una temperatura de alineamiento teórica, la temperatura más baja de los dos fue elegida como punto de partida para la realización de una gradiente de temperaturas (61°C; 59.8°C; 58.7°C; 57,3°C; 56.2°C; 55°C) para determinar la temperatura de alineamiento óptima en la reacción.

Se elaboró el cADN del control positivo y se realizó una PCR con gradiente de temperaturas, utilizando el termociclador T100 Thermal Cycler de Bio-Rad, las concentraciones de los reactivos con las que se partió se basan en el instructivo PEE/BM/021 de AGROCALIDAD (Tabla 6). El perfil térmico empleando se realizó como detalla Pilz *et al.* (2007), con algunas modificaciones (Tabla 7).

Tabla 6. Concentraciones y volúmenes de los reactivos necesarios para la amplificación de la región 5' UTR del VDVB.

Reactivo	Co		Cf		Vol rx (μ l)	Rx
H ₂ O					11.88	
Buffer PCR green flexi	5	X	1	X	5.0	
MgCl ₂	25	mM	1,5	mM	1.5	
dNTP's	10	mM	0,2	mM	0.50	
Primer P 103	25	μ M	0,5	μ M	0.50	
Primer P 372	25	μ M	0,5	μ M	0.50	
Enzima go Taq hot start	5	U/ μ l	0.025	U/ μ l	0.13	
cADN					5	
Volumen final de reacción					25	

Co = Concentración inicial de reactivo. Cf = Concentración final de reactivo.

Vol rx (μ l)= Volumen requerido de reactivo en micro litros (μ l), para un volumen de reacción de 20 μ l.

Rx. = Número de reacciones.

Tabla 7. Perfil térmico para la amplificación de la región 5' UTR del VDVB con gradiente de temperaturas

Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo minutos:segundos
1	94	4 :00
	94	1 :00
35 veces	61 a 55	0:30
	72	1 :00
1	72	7 :00
1	4	∞

Después de encontrarse la temperatura de alineamiento en la que se observó el fragmento de 290 pb (aprox.) de mayor intensidad se realizó una gradiente de concentración de cebadores. Se variaron las concentraciones de cebadores desde 0.1 μ M hasta 0.6 μ M, en incrementos de 0.1 μ M, mientras se mantuvieron constantes las concentraciones finales de los demás reactivos de la reacción (Tabla 7).

La concentración óptima de los cloruro de magnesio fue definida por medio de un ensayo de variación de concentraciones, donde se evaluó 1 mM, 1.5 mM; 2 mM,

2.5 mM y 3 mM. Tanto para los ensayos de variación de concentraciones de cebadores y cloruro de magnesio, las muestras fueron llevadas al termociclador y se utilizó el perfil térmico de la Tabla 8.

En todos los ensayos se utilizaron 5 µl de agua DEPC, como control negativo para garantizar que no haya contaminación en el ensayo.

Tabla 8.
térmico para la amplificación de la región 5' UTR del VDVB.

Perfil

Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo Minutos:segundos
1	94	4 :00
	94	1 :00
35 veces	55	0:30
	72	1 :00
1	72	7 :00
1	4	∞

Después de optimizar las concentraciones de reactivos para la reacción se evaluó el tiempo de alineamiento en 30, 45 y 60 segundos despectivamente.

La detección de los fragmentos amplificados (290 pb) se realizó mediante geles de agarosa de concentración 1,5 %.

2.7 Ensayo de sensibilidad analítica

Para determinar la sensibilidad del ensayo, se tomó un producto de PCR del control positivo, el cual fue purificado mediante el kit PureLink™ Quick Gel Extraction Kit de Invitrogen acorde con las instrucciones del fabricante, donde se obtuvieron 50 µl de producto purificado, el cual se cuantificó en un gel del 1.5% con el marcador molecular Low DNA Mass Ladder de Invirogen .

Después se realizaron diluciones seriadas (factor 1:10) del control purificado, tanto en agua DEPC como en cADN de una muestra de sangre de un animal sano para verificar que no existieran inhibidores en la matriz (Figura 1). Para el caso de las

diluciones en cADN se tomó una muestra de sangre total en tubos con EDTA de una animal sano a la cual se extrajo el ARN, y se sintetizó cADN (Figura 1B).

Se partió de una concentración total de producto de PCR de 10 ng. En microtubos estériles se colocaron 9 μ l de agua DEPC para el primer ensayo, y cADN en el segundo ensayo, y se añadió 1 μ l de la dilución precedente en cada tubo, se agitó por vortex y se dio un toque de centrifuga a cada microtubo antes de realizar la siguiente dilución. Se realizaron tres repeticiones de cada ensayo de sensibilidad.

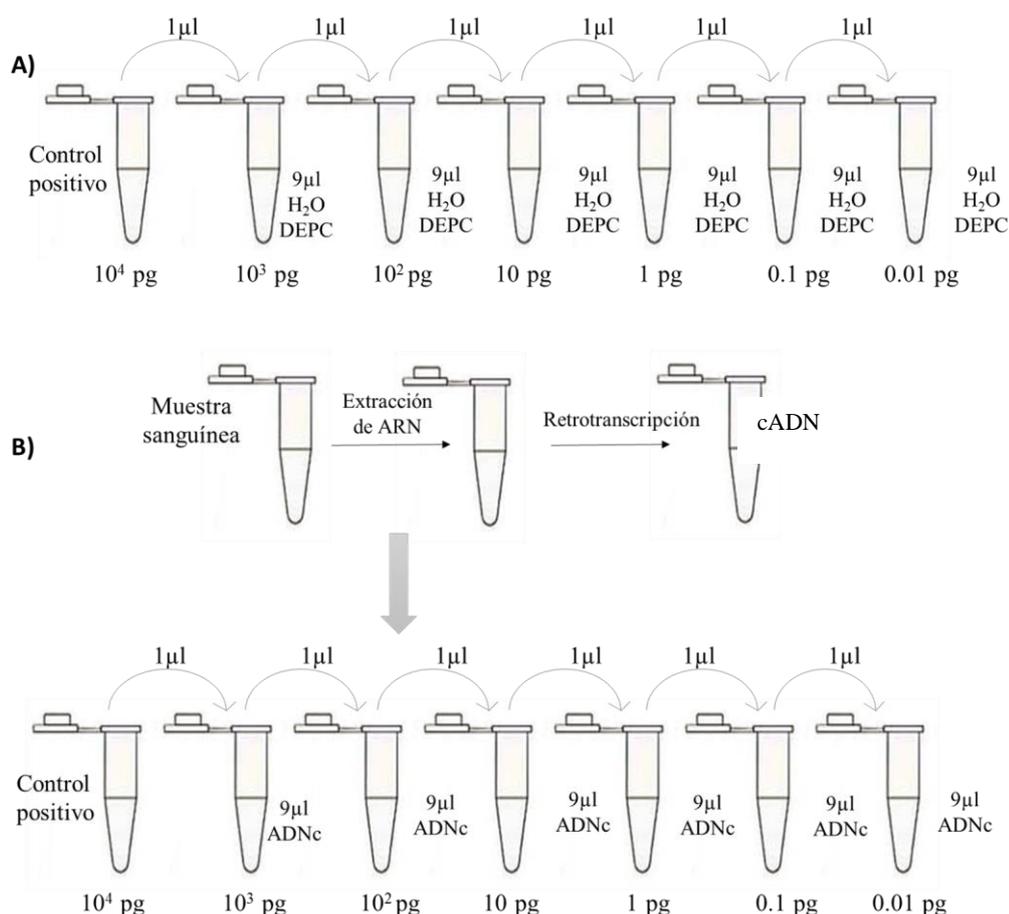


Figura 1. Procedimiento para la realización de diluciones seriadas del producto purificado del control positivo de la cepa Singer del VDVB para el ensayo de sensibilidad. (A) Procedimiento de diluciones seriadas en agua DEPC. (B) Procedimiento de diluciones en cADN

2.8 Ensayo de especificidad

Se determinó la especificidad de la PCR estandarizada evaluando los cebadores para DVB con un control positivo para PPC, para ello se extrajo ARN de un control certificado de PPC del laboratorio de AGROCALIDAD, junto con un el control positivo de DVB, después se realizó la retrotranscripción de las muestras y una posterior PCR junto con un control negativo (agua DEPC). Para visualizar los resultados se realizó una corrida electroforética de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.5% a 95 voltios por 35 minutos.

De manera adicional se evaluó la especificidad de los cebadores *in silico* con las secuencias de los siguientes virus: virus respiratorio sincital bovino, virus de rinotraqueitis infecciosa bovina, virus de lengua azul y citomegalovirus bovino.

2.9 RT-PCR como método de diagnóstico

Se trabajó con dos tipos de muestras, el primer grupo consistió en 8 muestras de lavado prepucial bovino procedentes del laboratorio de virología de AGROCALIDAD, las cuales fueron inoculadas en cultivo primario de células testiculares bovinas, y se contó con un control negativo que consistió en una muestra de las células testiculares bovinas sin inocular. El otro grupo consistió en muestras de sangre venosa colectada en tubos con EDTA de la cola de vacas procedentes de dos haciendas lecheras del cantón Mejía, de las cuales se tenía sospecha de DVB.

Se realizó la extracción de ARN de las muestras, se cuantificó la concentración de ARN y la calidad del mismo utilizando NANODROP 8000. Posteriormente se efectuó la retrotranscripción de las muestras y se corrió la PCR estandarizada, junto con un control positivo de VDVB y un control negativo que fue agua DEPC.

Para corroborar los resultados obtenidos en la PCR, y verificar la presencia de cADN se evaluó un control interno, en este caso el gen de la beta actina. En el caso de las muestras de lavado prepucial, se corrieron las muestras, el control negativo de cultivo celular, una muestra de tejido bovino y un control positivo para DVB, y para

las muestras sanguíneas de evaluaron las 8 muestras y el control positivo. La reacción se preparó como se indica en la Tabla 9 y se utilizó el programa del termociclador detallado en la Tabla 10. Los resultados se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% para verificar la presencia de un fragmento de 289 pb.

Tabla 9.*Tabla**de concentraciones para la amplificación del control interno Beta-actina*

Reactivo	Co		Cf		Vol rx (µl)	Rx	
H ₂ O						28.75	
Buffer green flexi	5	X	1	X	10		
MgCl ₂	25	mM	1,5	Mm	3		
dNTP's	10	mM	0,2	Mm	1		
Primer actina F	25	µM	0,5	µM	1		
Primer actina R	25	µM	0,5	µM	1		
Enzima go Taq hot start	5	U/µl	1.25	U/50µl	0.25		
cADN						5	
Volumen final de reacción						50	

Co = Concentración inicial de reactivo. Cf = Concentración final de reactivo.

Vol rx (µl)= Volumen requerido de reactivo en micro litros (µl), para un volumen de reacción de 20 µl.

Rx. = Número de reacciones.

Tabla 10.*Perfil**térmico para la amplificación del gen Beta actina*

Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo minutos:segundos
1	94	4 :00
35 veces	94	1 :00
	54	0:45
	72	1:30
1	72	5 :00
1	4	∞

Para comparar los resultados de la PCR con las muestras sanguíneas, se realizó una PCR de las mismas muestras empleando cebadores para Panpestivirus, que amplifican un fragmento de 220 pb para todos los virus del género *Pestivirus*.

Se corrió una PCR utilizando el par de cebadores Panpest 1 y Panpest 2 (Tabla 11), que amplifican una región de 119 pb de varios géneros y subgéneros de Pestivirus, como VDVB 1(VDVB-1a y BVDV-1b), VDVB -2, VPPC, así como para el virus de la hepatitis C, con el fin de poder confirmar los resultados obtenidos mediante la PCR estandarizada con las muestras sanguíneas, la secuencia de cebadores se detalla a continuación.

Tabla 11. Descripción de los cebadores para Panpestivirus descritos por Arce et al. en 2009

Nombre del cebador	Posiciones genómicas (pb) 5'-3'	Secuencia 5'-3'
Cebador Panpest 1	226-245	CGAGATGCCACGTGGACGAG
Cebador Panpest 1	344-324	CCTCTGCAGCACCTATCAGG

Nota: Posición genómica acorde con la cepa de VDVB NADL número de accesoión: AF039181.1.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Evaluación *in silico* de los cebadores

Se evaluó la secuencia del par de cebadores para todas las secuencias de DVB disponibles en la base de datos del NCBI, se obtuvo como resultado que los cebadores amplifican tanto los virus del tipo 1 y 2, con un fragmento de aproximadamente 290 pb con una identidad del 100%, sin embargo se obtuvieron resultados con una identidad de 100% para 11 secuencias de PPC del genotipo 1.1, del estudio publicado por Patil et al en 2010 en la India.

Primer-BLAST : results: Job Id=CgTRZE s8tJucF8Nim7PynZagHfZXEGBA [more...](#)

Input PCR template none
 Specificity of primers Target templates were found in selected database: Nucleotide collection (nt)
 Other reports [Search Summary](#)

Detailed primer reports

Primer pair 1	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TAGCCATGCCCTTAGTAGGAC	21	60.67	62.38	4.00	3.00
Reverse primer	ACTCCATGTGCCATGTACAGC	21	60.68	62.38	6.00	2.00

Products on target templates

>HX171380.1 Bovine viral diarrhoea virus 1 isolate Cav4-4 5' UTR, and polyprotein gene, partial cds

product length = 291
 Forward primer 1 TAGCCATGCCCTTAGTAGGAC 21
 Template 3 23
 Reverse primer 1 ACTCCATGTGCCATGTACAGC 21
 Template 293 275

>HX171378.1 Bovine viral diarrhoea virus 1 isolate Cav4-3 5' UTR, and polyprotein gene, partial cds

product length = 291
 Forward primer 1 TAGCCATGCCCTTAGTAGGAC 21
 Template 4 24
 Reverse primer 1 ACTCCATGTGCCATGTACAGC 21
 Template 294 274

>HX171378.1 Bovine viral diarrhoea virus 1 isolate Cav4-2 5' UTR, and polyprotein gene, partial cds

product length = 291
 Forward primer 1 TAGCCATGCCCTTAGTAGGAC 21
 Template 4 24
 Reverse primer 1 ACTCCATGTGCCATGTACAGC 21
 Template 294 274

>HX171377.1 Bovine viral diarrhoea virus 1 isolate Cav2-4 5' UTR, and polyprotein gene, partial cds

product length = 291
 Forward primer 1 TAGCCATGCCCTTAGTAGGAC 21
 Template 3 23
 Reverse primer 1 ACTCCATGTGCCATGTACAGC 21
 Template 293 275

>HX171378.1 Bovine viral diarrhoea virus 1 isolate Mv25 5' UTR, and polyprotein gene, partial cds

Figura 2. Resultados de Primer Blast para la evaluación *in silico* de los cebadores para DVB con todas las secuencias del NCBI

3.2 Extracción de ARN

En promedio la concentración de los controles utilizados y las muestras extraídas fue de 200 ng/ μ l con radio de absorbancia 260/280 de 3.4

3.3 Estandarización de la PCR convencional

3.3.1 Evaluación de temperaturas de fusión

Mediante el programa BioMath se calculó la temperatura de fusión de los cebadores, se obtuvo que para el cebador delantero P103 una temperatura de 66°C, con un porcentaje de GC 52,4%; para el cebador reverso P372 se tuvo una temperatura de 68°C con un contenido de GC 52%, al restar 5 grados a cada temperatura se obtuvo la temperatura teórica de alineamiento siendo 61 y 63 respectivamente, se escogió la de 61°C para iniciar la PCR con gradiente de temperatura.

3.3.2 PCR con gradiente de temperaturas

En el ensayo de PCR con gradiente de temperaturas de alineamiento observó una banda tenue en 61°C, mientras la intensidad de las bandas se intensifica a medida que disminuye la temperatura, la banda con mayor intensidad se observa en 55°C, en el peso correspondiente a 290 pb, por lo que se seleccionó esta temperatura como la temperatura de alineamiento del ensayo. No hubo la presencia de fragmentos inespecíficos y no existió amplificación en el carril correspondiente al control negativo indicando que no hubo contaminación en el ensayo (Figura 3).

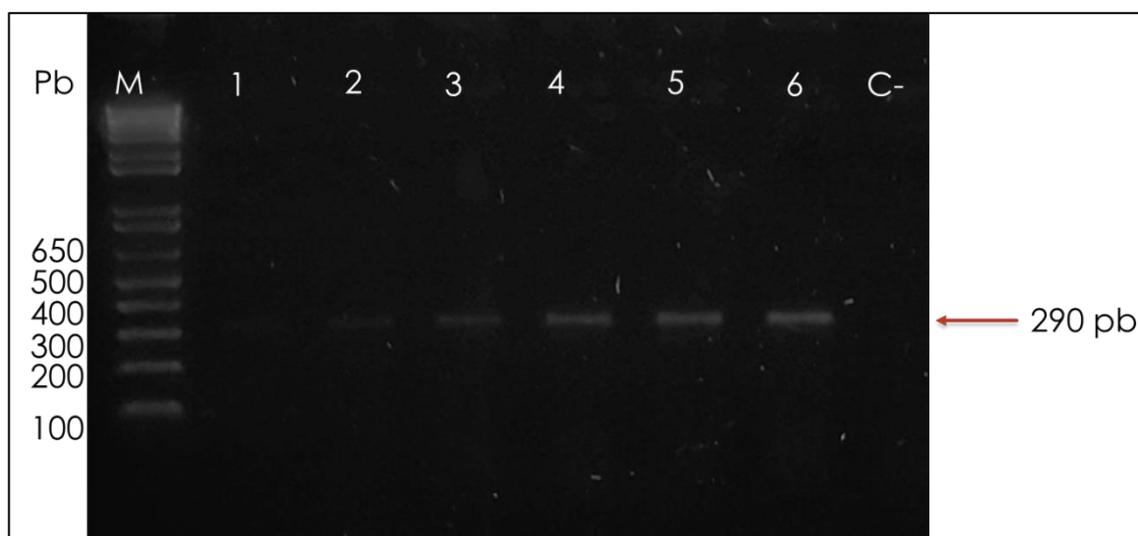


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se visualizan las bandas correspondientes a 290 pb de los productos de PCR con gradiente de temperaturas del control positivo. 1: 61°C, 2: 59.8°C, 3:58.7°C, 4:57.3°C, 5:56.3%, 6:55°C, C-: control negativo.

3.3.3 Ensayo de variación de concentraciones de cebadores

En el ensayo de variación de concentraciones de cebadores, no se observó amplificación del fragmento en las concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.3 μM , mientras la banda de mayor intensidad se observa en la concentración de 0.5 μM , por lo tanto esta fue la concentración elegida para los ensayos posteriores. No se observa amplificación en el carril correspondiente al control negativo ni la presencia de fragmentos inespecíficos (Figura 4).

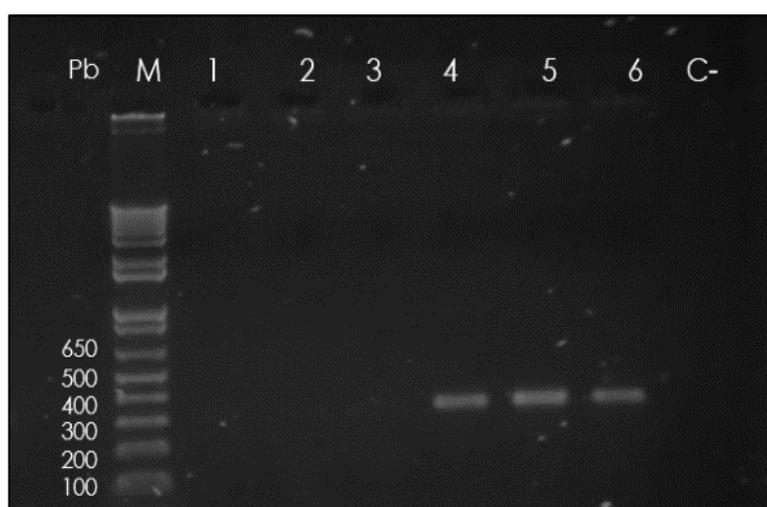


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se visualizan las bandas de 290 pb de los productos de PCR con gradiente de concentraciones de cebadores. .

1:0.1 μ M, 2: 0.2 μ M, 3:0.3 μ M, 4:0.4 μ M, 5:0.5 μ M, 6:0.6 μ M, C-: control negativo. M: marcador molecular Trackit™ Plus DNA Ladder

3.3.4 Ensayo de variación de concentraciones de Cloruro de magnesio

En la figura 5 se muestran los resultados del ensayo de variación de cloruro de magnesio, la concentración seleccionada para la PCR es de 3 μ M, dado que la banda de mayor intensidad se observa en esta concentración.

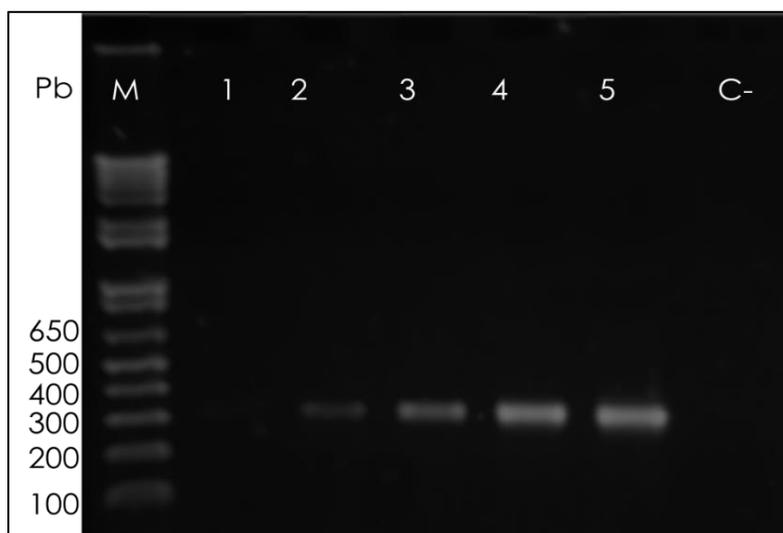


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se muestran las bandas de 290 pb de los productos de PCR con variación de concentraciones de cloruro de magnesio. 1:1mM, 2: 1.5 mM, 3: 2mM, 2.5 mM, 5:3 mM. C-: control negativo. M: marcador molecular Trackit™ Plus DNA ladder

3.3.5 Ensayo de tiempo de alineamiento

Los resultados visualizados en un gel de agarosa al 1.5% se muestran en la Figura 6. Se observó una mayor intensidad de la banda de 290 pb a los 45 segundos en comparación con la banda correspondiente a 30 segundos, no se observó una diferencia en la intensidad de las bandas entre los tiempos de 45 y 60 segundos, por lo que se eligió un tiempo de amplificación de 45 segundos

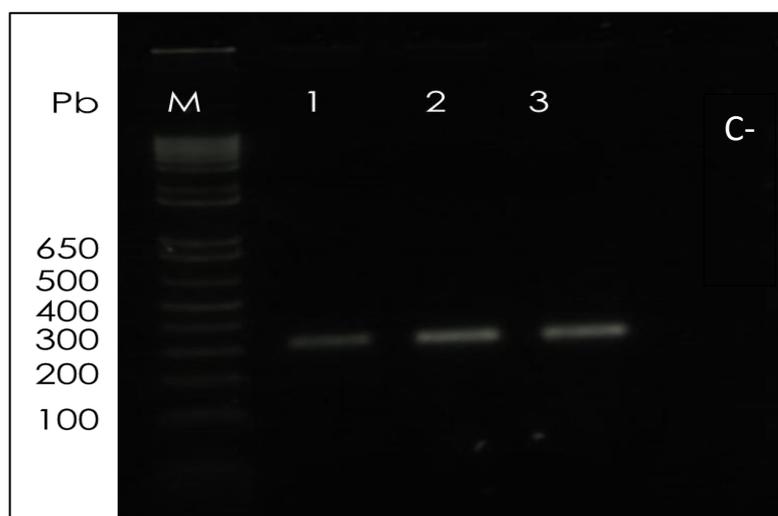


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se visualizan las bandas de 290 pb de los productos de PCR variando el tiempo de alineamiento. 1: 30 segundos, 2: 45 segundos, 3: 60 segundos. C-: control negativo. M: marcador molecular 100 pb (Invitrogen)

3.3.6 Condiciones de la PCR estandarizada

Se muestran las concentraciones de reactivos optimizadas para la reacción (Tabla 11), así como las condiciones de ciclado (Tabla 12).

Tabla 12.

de reactivos estandarizadas para la detección del VDVB

Condiciones

Reactivo	Co	Cf	Vol rx	Rx
			(μ l)	
H ₂ O			10.38	
Buffer PCR green flexi	5	X	1	X
MgCl ₂	25	mM	3	mM
dNTP's	10	mM	0,2	mM
Primer P 103	25	μ M	0,5	μ M
Primer P 372	25	μ M	0,5	μ M
Enzima go Taq hot start	5	U/ μ l	0.025	U/ μ l
cADN				5
Volumen final de reacción				25

Tabla 13. *Condiciones de ciclado para la PCR estandarizada para la detección del virus de DVB*

N° ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo minutos:segundos
1	94	4 :00
	94	1 :00
35 veces	55	0:45
	72	1 :00
1	72	7 :00
1	4	∞

3.3.7 Especificidad de reacción

Se determinó la especificidad de la reacción al correr la PCR con las condiciones estandarizadas, y se evaluó con un control positivo de PPC, se corrieron dos controles positivos de DVB, el control de PPC y un control negativo, no se observó amplificación para el control de PPC ni para el control negativo.

Al evaluar *in silico* los cebadores con los virus bovinos, no se obtuvieron amplicones para el virus respiratorio sincital bovino, virus de rinotraqueitis infecciosa bovina, virus de lengua azul y citomegalovirus bovino.

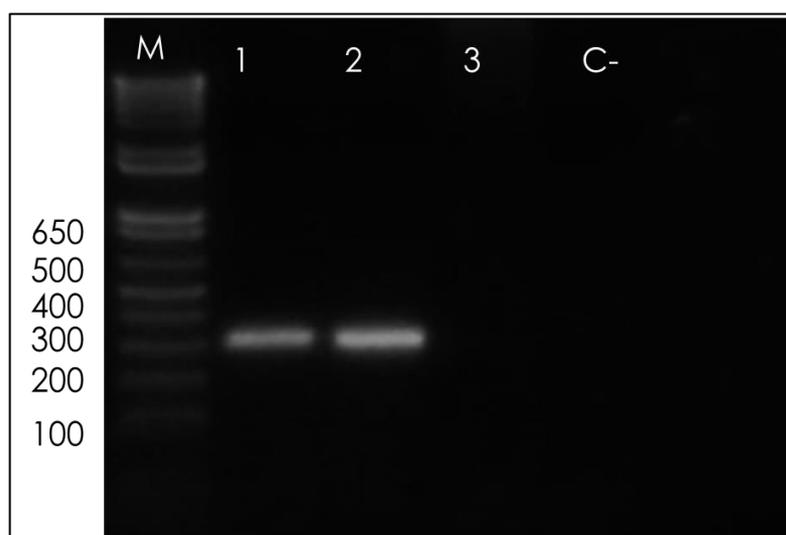


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se visualizan las bandas de 290 pb de los productos de PCR para en ensayo de especificidad. 1y 2: Control

positivo, 3: Control positivo para PPC, C- control negativo. M: marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.3.8 Sensibilidad analítica

Previo a la realización de las diluciones seriadas para la evaluar la sensibilidad analítica se cuantificó la concentración del producto de PCR del control amplificado con la PCR estandarizada, al comparar con el marcador, el producto con el cual se trabajó (Carril 1, Fig. 8), correspondió a una concentración de 10 ng de producto. En el ensayo de la PCR con las diluciones seriadas, tanto en agua como en cADN, la última banda en la que se observa amplificación correspondió a una concentración inicial de 0.1 pg del producto diluido, no se observó productos en la dilución correspondiente a 0,01 pg, como se muestra en la figura 9. Los mismos resultados se obtuvieron para las repeticiones de cada ensayo.

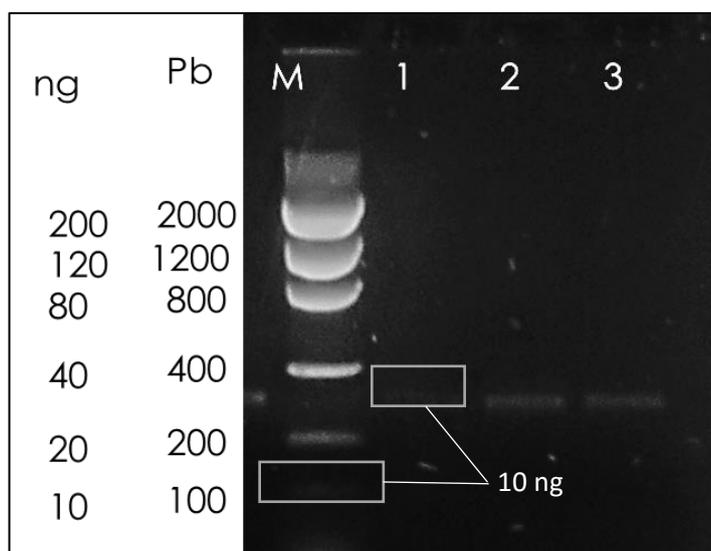


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se visualizan las bandas de 290 pb de los productos de PCR purificados. 1, 2 y 3 productos purificados del control positivo Singer. M: Marcador molecular Low Mass Ladder.

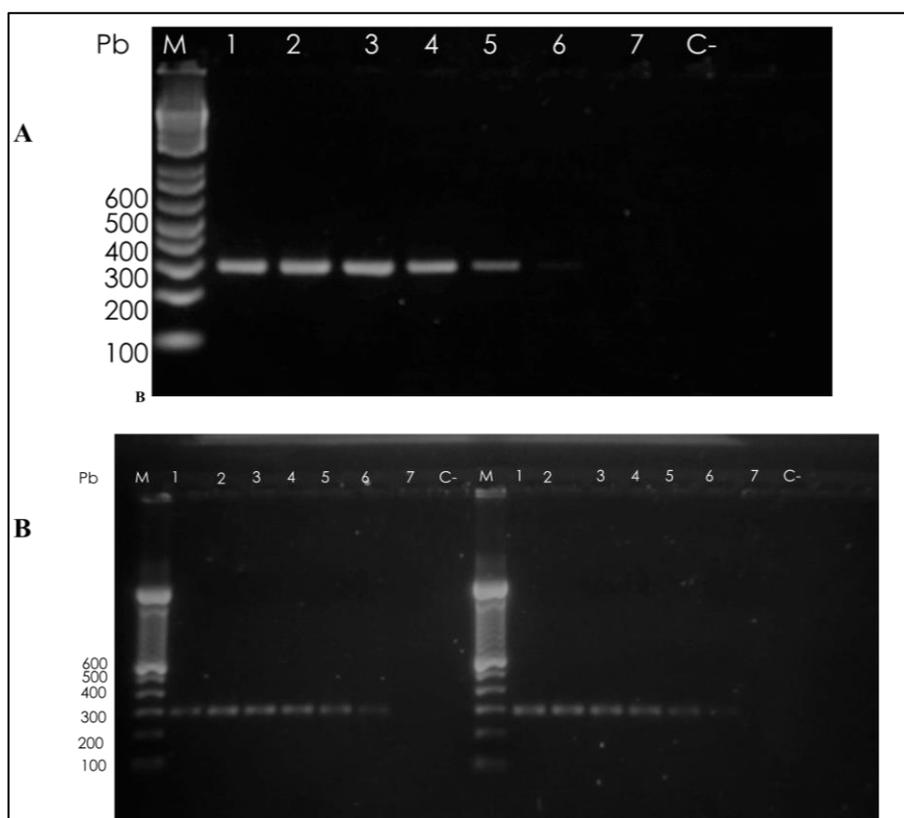


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se visualizan las bandas de 290 pb de los productos de PCR del ensayo de sensibilidad en agua DEPC. 1:10⁴ pg, 2: 10³ pg, 3:10² pg, 4: 10 pg, 5: 1pg, 6: 0,1 pg, 7: 0,01 pg. M: marcador molecular 100 pb (Invitrogen). A: ensayo de sensibilidad inicial. B: repeticiones en días diferentes del ensayo de sensibilidad.

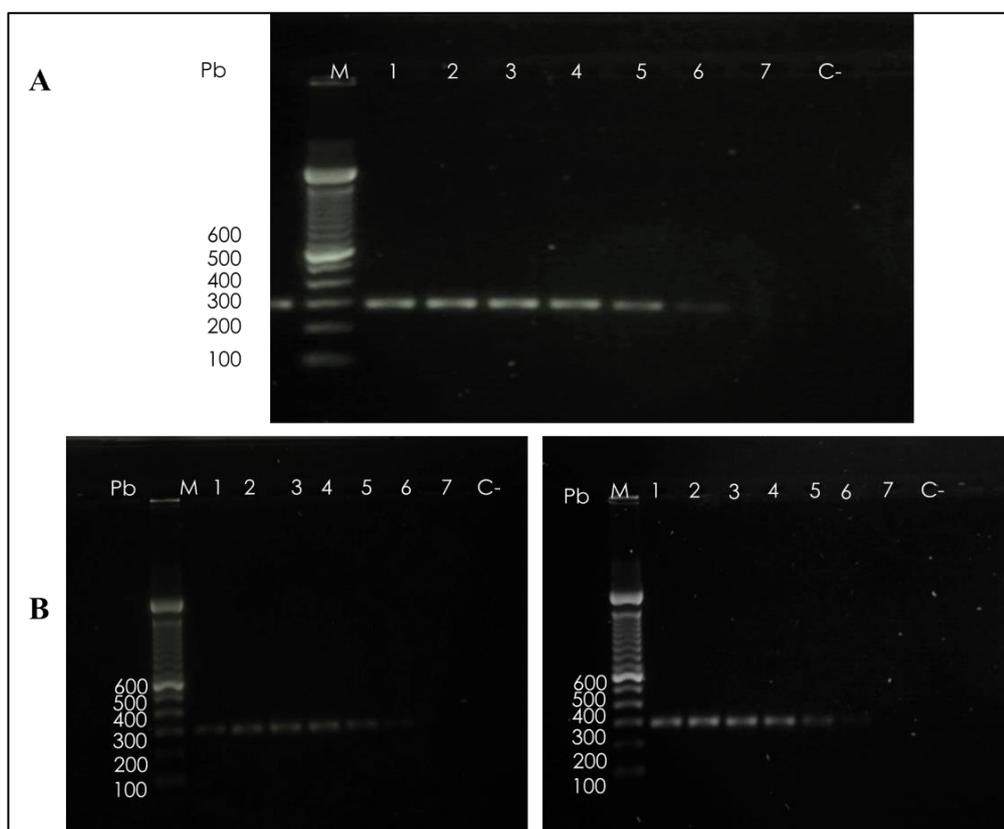


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se visualizan las bandas de 290 pb de los productos de PCR del ensayo de sensibilidad en cADN. 1:10⁴ pg, 2: 10³ pg, 3:10² pg, 4: 10 pg, 5: 1pg, 6: 0,1 pg, 7: 0,01 pg. M: marcador molecular 100 pb (Invitrogen). A: primer ensayo de sensibilidad en cADN, B repeticiones del ensayo A en días diferentes.

3.4 PCR como método de diagnóstico

Muestras de lavado prepuccial

No se observó la presencia del fragmento correspondiente a 290 pb para ninguna muestra, lo que indica la ausencia de virus, existe la presencia del fragmento de interés en el control positivo, al cual se le realizó la RT y PCR junto con las muestras, hay amplificación del producto de PCR y ausencia de bandas en el control negativo de PCR que consistía en agua DEPC lo que indica que no hay contaminación en los reactivos utilizados (Figura 11).

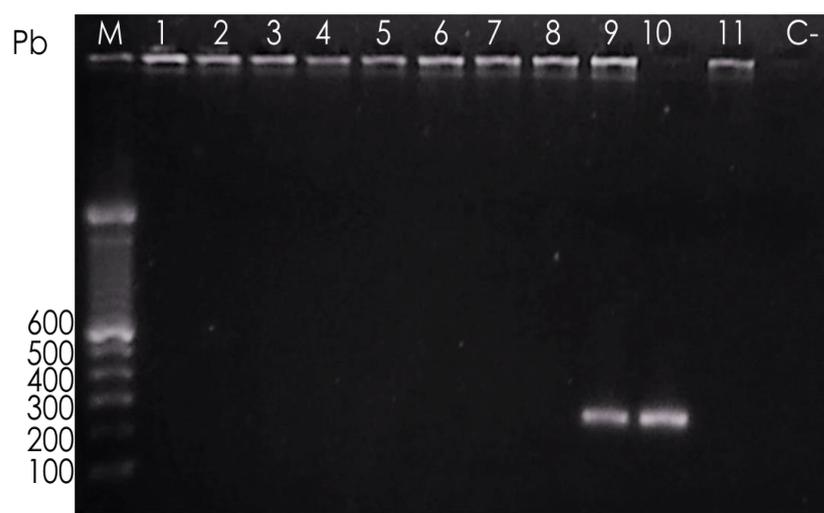


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR. Carriles del 1 al 8: muestras de lavado prepucial. 9: Control positivo de cultivo de Singer DVB, 10: Producto de PCR diluido del control positivo Singer, 11: Control negativo de cultivo celular, C-: control negativo de PCR, M: marcador molecular 100 pb DNA Ladder.

Muestras de vacas con sospecha de DVB

Se recolectó sangre completa en tubos EDTA de 8 animales con sospecha de DVB de dos haciendas ubicadas en el cantón Mejía, en la Tabla 14 se muestran los datos correspondientes a cada animal muestreado, la hacienda de la cual proceden, a las cuales se las denominó como A y B respectivamente, fecha de nacimiento, signos clínicos fecha de vacunación y la vacuna empleada.

Tabla 14.

Datos

de los animales muestreados con sospecha de DVB

Hacienda	Número de arete	Fecha de nacimiento	Signos clínicos	Fecha de vacunación	Vacuna
A	121	3/2/2011	Neumonía	21/4/2017	Cattle Master®Gold FP 5
	577	10/5/2017	Problemas respiratorios: toz, secreción nasal y ocular, diarrea sanguinolenta, anemia	S.V	
	727	22/6/2017	Problemas respiratorios	S.V	
	1096	4/10/2016	Pérdida de peso	21/4/2017	
B	522	28/1/2016	Problemas reproductivos	1/6/2017	
	542	21/6/2016	Problemas reproductivos	1/6/2017	
	2055	2/8/2004	Problemas reproductivos	1/6/2017	
S.A	12/6/2017	Malformación en las extremidades, bajo peso, hidrocefalia	S.V		

S.V= Sin vacuna

S.A: Sin arete

Después de la extracción de ARN de las muestras se realizó la retrotranscripción y PCR, los resultados se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5 (gr/v) %, no hubo la presencia del fragmento de 290 pb, existió la amplificación del control positivo y no se detectaron amplicones en el control negativo

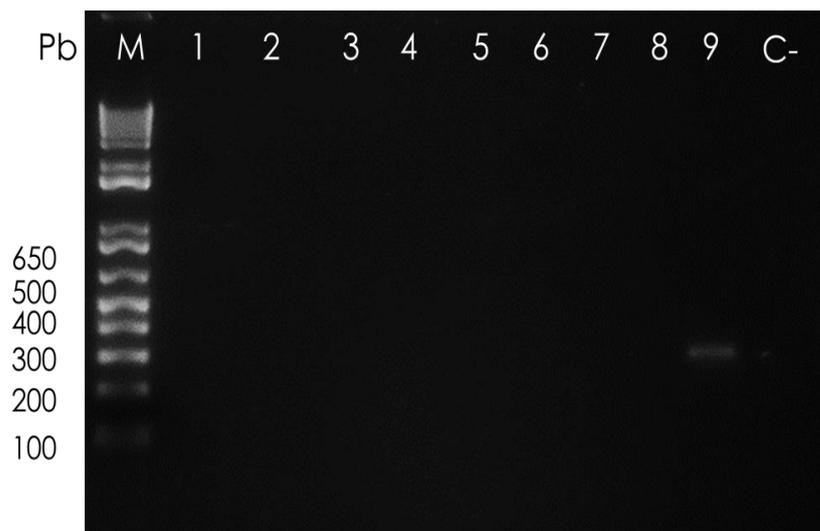


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR correspondientes a las muestras: 1:121, 2:577, 3:727, 4:1096, 5:522, 6: 542, 7: 2055, 8: S.A, 9: Control positivo, C-: Control negativo. M: Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder

3.4.1 Ensayo con Beta actina

El ensayo para la amplificación del gen de la proteína Beta actina presente en el hospedero sirve como control interno para garantizar la presencia de ARN, dado que las muestras evaluadas fueron negativas para DVB se realizó una PCR de las mismas amplificando el gen de beta actina como control interno. Tanto en las muestras de lavado preucial y sanguíneas hubo amplificación en todas las muestras y los controles a excepción del control negativo de PCR lo que confirma la presencia de ARN en las muestras (Figura 12).

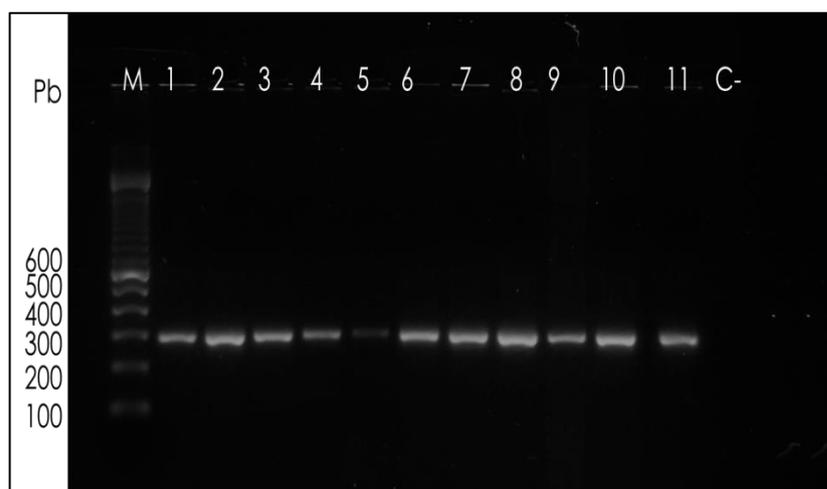


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se observan los productos de PCR del control interno en muestras de lavado prepucial. Carriles del 1 al 8: muestras de lavado prepucial. 9: Control negativo de cultivo celular, 10: Muestra de tejido bovino, 11: Control positivo de cultivo de Singer DVB. C-: control negativo. M: marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder

En la Figura 14 se muestran los resultados de la PCR con el control interno beta actina para las muestras sanguíneas, se observa la presencia de un fragmento de 289 pb, en todas las muestras y el control interno, lo que indica la presencia de ARN en las muestras, no se detecta el fragmento en el control negativo por lo que no existió contaminación en el mix de reacción, tampoco se observa la presencia de fragmentos inespecíficos o dímeros.

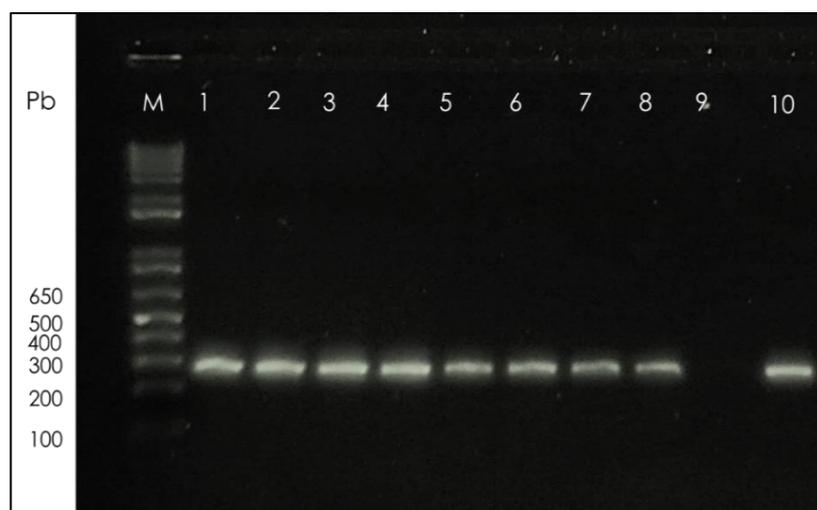


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se observan los productos de PCR del control interno en muestras sanguíneas. 1: 121, 2:577, 3: 727, 4: 1096,

5:522, 6:542, 7:2055, 8:S.A, 9: Control negativo, 10: control positivo M: Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder

3.4.2 Ensayo con los cebadores para Panpestivirus de las muestras de animales con sospecha de DVB

Los cebadores Panpest1 y Panpest2 fueron utilizados para detectar diferentes genotipos y subgenotipos de *Pestivirus*, un resultado positivo se visualiza con una banda de 119 pb, La PCR de las muestras para la detección de *Pestivirus* mostró que para la muestra 577 existe la presencia de dos fragmentos inespecíficos en los pesos aproximados de 650 y 1000 pb , se observan también fragmentos inespecíficos de 650 pb para las muestras 522 y 542, se detectó el fragmento de interés de 119 pb en el control positivo de DVB Singer y no hubo amplificación para el control negativo (Figura 15)



Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% donde se observan los productos de PCR con los cebadores para Panpestivirus de las muestras sanguíneas. 1: 121, 2:577, 3: 727, 4: 1096, 5:522, 6:542, 7:2055, 8:S.A, 9: Control positivo, C-: control negativo M: Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

En el presente estudio se utilizó el kit de Roche High Pure Viral Nucleic Acid, debido a que la extracción de ácidos nucleicos de buena calidad es primordial para pasos subsecuentes como la PCR para la identificación del agente causal de la VB (Green & Sambrook, 2012). El uso de kits comerciales para el aislamiento de ácidos nucleicos frente a la utilización de agentes monofásicas para la lisis supone grandes ventajas, entre ellas su eficacia y ahorro de tiempo; además el hecho que la extracción por agentes orgánicos podría conllevar a la pérdida o fragmentación del RNA, lo que se soluciona mediante métodos alternativos de lisis que ofrecen los kits comerciales como la adsorción a matrices de sílica o fibra de vidrio (Green & Sambrook, 2012).

Posterior a la extracción de ácidos nucleicos, la cuantificación es un paso necesario y de gran importancia para la realización de la PCR, se obtuvo una concentración aproximada de 200 ng / μ l en todas las muestras, 260/280 y 260/230 superiores a 2 y 2.2, respectivamente lo que indica la pureza de la muestra y la ausencia de inhibidores como proteínas o componentes orgánicos, sin embargo se debe tener en cuenta que ratios con rangos superiores a dos pueden indicar la presencia de ADN degradado y nucleótidos libres (Rothman, n.d.; Thermo Fisher Scientific, 2010)

La evaluación *in silico* de los cebadores utilizados reveló la amplificación de un fragmento de 290 pb, correspondiendo con la región 5'UTR del VDVB (Pilz et al., 2007), además se pudo obtener información sobre la especificidad de los mismos previo a la realización *in vitro* de la PCR, ya que al compararlos con otras secuencias de la base de datos del NCBI no se obtuvieron resultados para una posible amplificación. La evaluación *in silico* de una PCR y sus respectivos cebadores ayuda a mejorar un estudio y dar indicios sobre dónde empezar la estandarización, permitiendo la comparación previa de las regiones genómicas que queremos identificar ,ya que existe correspondencia entre los análisis *in silico* e *in vitro* (Verma et al., 2002)

Se optimizó la temperatura de alineamiento para los cebadores en 55 grados, pese a que la temperatura de alineamiento teórica fue de 61 grados, se observaron bandas muy tenues a esa temperatura, dado que aun después de calcular una temperatura de alineamiento teórica, es necesario llevar a cabo pruebas empíricas que

definan la temperatura óptima de alineamiento, en la cual se observe una mayor rendimiento de productos de PCR sin la aparición de productos inespecíficos (Bio-Rad Laboratories, 2017) .La temperatura escogida, por lo tanto no ocasionó productos inespecíficos, además se debe notar que una temperatura de alineamiento óptima se encuentra entre los 55 y 70 grados, una temperatura muy alta incrementa la especificidad pero existe el riesgo de comprometer la sensibilidad de la reacción. Sin embargo el rendimiento de la PCR no se ve afectado únicamente por esta temperatura sino también por condiciones como el $MgCl_2$, la cantidad de cebadores y enzima, entre otros (Bartlett, Ravassard, Icard-liepkalns, & Mallet, 2003) .

Las concentraciones de magnesio son críticas para el éxito de una reacción de PCR, ya que la ADN polimerasa requiere la presencia de Mg^{++} como cofactor durante el proceso de síntesis; por lo tanto la manipulación de las concentraciones de magnesio tiene un impacto directo en factores como la actividad y fidelidad de la ADN polimerasa, la desnaturalización de la hebra de ADN, alineamiento de los cebadores, entre otros. En la reacción de PCR se estableció una concentración de 3 μM para incrementar la sensibilidad, ya que el rendimiento del producto incrementa mientras mayores son las concentraciones de magnesio (Bartlett et al., 2003; Lorenz, 2012) .

Para el diagnóstico es importante utilizar cebadores que puedan detectar ambos tipos virales, con el fin de evitar falsos negativos: la utilización de cebadores que amplifiquen la región 5' UTR , ha mostrado ser eficiente para detectar VDVB de tipo 1 y 2 (Lanyon et al., 2013). Weinstock, Bhudevi, & Castro (2001) muestran que el par de cebadores utilizados en este ensayo (P108 y P 372) pueden utilizarse para detectar los dos tipos virales debido a que la región 5' UTR se encuentra altamente conservada.

En las pruebas de especificidad se demostró que los cebadores son específicos para la región 5 UTR del virus de DVB puesto que no se observó amplificación con el control positivo para PPC, el cual pertenece al mismo género *Pestivirus*, y se encuentra estrechamente relacionado a los *Pestivirus* encontrados en rumiantes (Arce et al., 2009). Sin embargo en una evaluación *in silico*, comparando el par de cebadores con todas las secuencias de NCBI se obtuvo la posible amplificación con una identidad del 100% para once secuencias de PPC , del estudio de Patil et al.en 2010, los resultados negativos observados *in vitro*, pueden deberse a que el control utilizado pertenece a la

Cepa Alfort, con la cual el grado de identidad fue menor y no se produjo amplificaciones fragmento. Cabe recalcar que en muestras de campo de bovinos, un resultado positivo debido a la infección del ganado con el virus de PPC no es posible, siendo el caso contrario a la infección de cerdos con VDVB (Fernelius, Amtower, Malmquist, Lambert, & Matthews, 1973)

Al evaluar la especificidad de los cebadores *in silico* con otras secuencias de virus bovinos, los resultados negativos muestran que el par de cebadores P 103-372 no produce amplificación inespecífica de otros tipos virales.

Debido a que en el ensayo se partió de sangre total, se obtiene en la extracción ARN tanto del hospedero como del virus, por tanto en la cuantificación no se puede obtener el valor real de la cantidad de ARN presente en la muestra para el ensayo de sensibilidad, por lo que se procedió a probar la sensibilidad con un amplicón del control viral positivo ya que la PCR amplifica solo la sección específica de un fragmento de cADN; por tanto se evalúa solo la secuencia viral. El control fue purificado para remover cebadores, nucleótidos enzimas, sales, agarosa y otras impurezas presentes en un producto de PCR, con el fin de que no que exista la interferencia de productos residuales (Ausubel et al., 2003; Lo, Chiu, & Chan, 2006) . Para una PCR se recomienda como mínimo trabajar con 1 a 10 ng de ADN molde, la PCR estandarizada fue capaz de detectar una cantidad mucho más baja, siendo esta de 0,1 pg.(Lorenz, 2012). No obstante debe tomarse en cuenta que también es necesario evaluar el límite de detección utilizando dosis infectivas, en la cual se deben realizar la titulación del virus y diluciones seriadas del mismo como en el ensayo propuesto por Hamel, Wasylyshen, & Nayar, 1995.

La RT-PCR puede emplearse para el diagnóstico tanto de infecciones agudas como persistentes (Lanyon et al., 2013), se utilizaron muestras de sangre debido a que el virus puede ser detectado de 72 a 102 días posterior a la infección. Sin embargo podría evaluarse de mejor manera la infección procesando la capa leucocitaria de la fracción sanguínea dado que los linfocitos y células mononucleares son especialmente sensibles a la infección por VDVB (Brownlie, 1990).

Lastimosamente no fue posible identificar una muestra positiva, debido a la pequeña cantidad de muestras que se pudo analizar en este estudio, por limitaciones

en la cantidad e reactivo disponible. Sin embargo, se logró evaluar la eficiencia de la prueba mediante la utilización de controles positivos del virus, y un control interno que amplifica una fracción del genoma del hospedero, por lo tanto aumenta la fiabilidad el diagnóstico, eliminando la posibilidad de un resultado falso negativo ya que el control interno brinda la certeza de la presencia de ARN y que la extracción del mismo se realizó de forma correcta, otra ventaja de la utilización de un control interno es garantizar la ausencia de inhibidores en la muestra (OIE, 2015).

Como un mecanismo adicional para garantizar los resultados de las pruebas con muestras de animales con sospecha de DVB, se realizó una PCR empleando los mismos reactivos y cADN de las muestras pero con los cebadores Panpest 1 y Panpest 2, que están diseñados para amplificar varios tipos y subtipos de *pestivirus*. Los resultados igualmente fueron negativos pero se observaron bandas inespecíficas en tres muestras en los pesos de 650 pb. Las bandas inespecíficas pueden deberse a una baja astringencia en la reacción (Lorenz, 2012). Sin embargo, un análisis cuidadoso del tamaño de los amplicones, es un paso importante para determinar la presencia o no de contaminantes, los cuales deben confirmarse mediante secuenciación (Zanotto et al., 2002).

La ventaja de utilizar el par de cebadores P103 - 372 en el estudio en lugar de los cebadores para Panpestivirus radica en que pese a que existe una alta identidad en la región 5' UTR entre *Pestivirus*, existen dos regiones cortas notablemente variables localizadas entre los nucleótidos 208-233 y 294-que permiten diferenciar a los genotipos de DVB (Goyal & Ridpath, 2005).

El presente trabajo demostró la importancia de realizar una prueba de RT-PCR para el diagnóstico de DVB, dado que esta es una técnica sensible y altamente fiable. La prueba pudo detectar el control positivo en todos los ensayos, y presentó una alta sensibilidad. Los resultados obtenidos para muestras clínicas fueron confirmados utilizando un control interno y otro par de cebadores, iniciando la posibilidad de continuar la investigación del diagnóstico molecular de DVB en el país, siendo el primer trabajo en el país que ha utilizado técnicas moleculares, futuros ensayos deben aplicarse a un mayor número de muestras clínicas.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Mediante este estudio se logró estandarizar las concentraciones de reactivos y condiciones del termociclador para la detección del VDVB

La concentración de cloruro de magnesio es un factor crítico para la estandarización de una PCR, y su incremento permite mejorar la sensibilidad de la reacción de PCR

La ausencia de bandas con el control de PPC determina que la reacción es específica para la región 5' UTR del virus de DVB.

El par de cebadores diseñados por Weinstock, Bhudevi, & Castro, 2001, permiten detectar un fragmento de 290 pb correspondiente a la región altamente conservada 5' UTR del VDVB en el control positivo.

Se determinó un límite de detección del control positivo de 0.1 pg. para la reacción de PCR estandarizada.

5.2 Recomendaciones

.Tanto para el proceso de extracción de ácidos nucleicos como de la RT-PCR se debe procurar que el espacio de trabajo se encuentre libre de nucleasas, para lo cual previo a cada ensayo se debe realizar una limpieza de todas las superficies de trabajo.

Las muestras procedentes de animales se deben procesar el menor tiempo posible para evitar su degradación

Se recomienda utilizar un número de muestras mayor en futuros estudios y utilizar la técnica de RT-PCR para confirmar casos positivos detectados con otras técnicas.

Se recomienda tener sumo cuidado y realizar una previa desinfección de las áreas de trabajo en el laboratorio, cuando se hayan procesado muestras de PPC para evitar una posible contaminación de las muestras bovinas y evitar resultados falsos positivos.

Para estandarizar la PCR se recomienda utilizar el mismo termociclador en todas las pruebas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROCALIDAD. (2013). Dirección de Vigilancia Zoonositaria - Sanidad Animal. Recuperado Enero 29, 2017, de <http://www.agrocalidad.gob.ec/direccion-de-vigilancia-zoonositaria/>
- APHIS. (2007). Bovine Viral Diarrhea Virus.
- Arce, H. D. de, Pérez, L. J., Frías, M. T., Rosell, R., Tarradas, J., Núñez, J. I., & Ganges, L. (2009). A multiplex RT-PCR assay for the rapid and differential diagnosis of classical swine fever and other pestivirus infections. *Veterinary Microbiology*, *139*(3–4), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.004>
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. a, ... Blackshaw, S. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology. Molecular Biology* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1002/mrd.1080010210>
- Baker, J. C. (1990). Clinical aspects of bovine virus diarrhoea virus infection. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, *9*(1), 25–41.
- Bartlett, J. M. S., Ravassard, P., Icard-liepkalns, C., & Mallet, J. (2003). Protocols Edited by. *Methods in Molecular Biology* (Vol. 226). New Jersey: Humana Press Inc.
- Bio-Rad Laboratories. (2017). Optimize Reactions in a Single Run. Recuperado Junio 27, 2017, from http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5633.pdf
- Bohórquez, J., Vargas, D., & Jaime, J. (2013). Los PestiviRus: generadores de enfermedades emergentes en porcinos. *Porcicultura Colombiana*, *Vol. 2 N°*(ISSN 0122-4220), 22–26. Recuperado de [http://www.porcicol.org.co/porcicultores/images/porcicultores/revistas/Porcicultores 181/files/assets/downloads/publication.pdf](http://www.porcicol.org.co/porcicultores/images/porcicultores/revistas/Porcicultores%20181/files/assets/downloads/publication.pdf)
- Brodersen, B. W. (2014). Bovine Viral Diarrhea Virus Infections: Manifestations of Infection and Recent Advances in Understanding Pathogenesis and Control. *Veterinary Pathology*, *Vol. 51*(2), 453–464. <https://doi.org/10.1177/0300985813520250>
- Brownlie, J. (1990). The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections, *9*(1), 43–59.
- Burbano, H., Vera, V., & Ramírez, G. (2006). Detección de biotipos del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) a través de RT-PCR¹. *Revista de Medicina Veterinaria*, 7–14.
- Burgasí, E. (2014). Determinación de la prevalencia de las principales enfermedades infecciosas y endoparasitarias en hatos lecheros de pequeños productores, en las comunidades de Taxojaló y Guantualó, del cantón Sigchos provincia de Cotopaxi. (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Cangahuamin, R. (2011). Diagnóstico de problemas reproductivos en hembras bovinas de la comunidad San Francisco de Toacazo. (Tesis de pregrado). Universidad de

- las Fuerzas Armadas ESPE. Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5136/1/T-ESPE-IASA-I-004586.pdf>
- Ceccotti, E., Sforza, R., Cazoglio, J., Luberti, R., & Flichaman, J. (2007). *El Diagnóstico en Clínica Estomatológica - Google Books* (1 a ed). Buenos Aires: Medica Panamericana. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=HhxqtPAgQc0C&pg=PA22&dq=retrotranscripción&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjzxbao08zSAhUIslQKHf4WAQwQ6AEIMTAF#v=onepage&q=retrotranscripción&f=false>
- EL UNIVERSO. (2011, July 23). Enfermedades bajan un 40% producción vacuna - Ecuador. Recuperado de <http://www.eluniverso.com/2011/07/23/1/1416/enfermedades-bajan-un-40-produccion-vacuna.html>
- Escudero, L., & Morales, N. (2013). Determinación de la prevalencia e incidencia de Diarrea Viral Bovina (DVB) de seis hatos ganaderos de la parroquia Canuto, cantón Chone en la provincia de Manabí. (Tesis de pregrado). Universidad de las Americas.
- Esmaelizad, M., & Kargar-Moakhar, R. (2014). Phylogenetic study on the 5'- untranslated region of bovine viral diarrhoea virus isolates from Iran. *Veterinaria Italiana*, 50(3), 213–8. <https://doi.org/10.12834/VetIt.78.249.2>
- ESPAC. (2015). ENCUESTA DE SUPERFICIE Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA CONTINUA ESPAC 2015. Recuperado de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2014-2015/2015/Presentacion_de_resultados_ESPAC_2015.pdf
- Fairbanks, K., Schnackel, J., & Chase, C. C. L. (2003). Evaluation of a Modified Live Virus Type-1a Bovine Viral Diarrhea Virus Vaccine (Singer Strain) against a Type-2 (Strain 890) Challenge *, 4(1), 24–34.
- Fernelius, A. L., Amtower, W. C., Malmquist, W. A., Lambert, G., & Matthews, P. J. (1973). Bovine Viral Diarrhea Virus in Swine: Neutralizing Antibody in Naturally and Experimentally Infected Swine. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, Vol. 37, 96–102. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1319731/pdf/compmed00049-0100.pdf>
- Goens, S. D. (2002). The evolution of bovine viral diarrhoea: A review. *Canadian Veterinary Journal*, 43(12), 946–954.
- Goyal, S. M., & Ridpath, J. F. (2005). Bovine Viral Diarrhea Virus : Diagnosis, Management, and Control. John Wiley & Sons.
- Green, M., & Sambrook, J. (2012). Molecular Cloning. A laboratory manual (4 th editi). New York: Inglis,John.
- Hamel, A. L., Wasylyshen, M. D., & Nayar, G. P. S. (1995). Rapid detection of bovine

viral diarrhea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*; 33(2) p287-291, 33(2), 287–291.

- Jara, V. (2008). Estudio de seroprevalencia de Diarrea Vírica Bovina (DVB) y Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) en la provincia de Loja (Ecuador) por medio de Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) y su distribución epidemiológica geoespacial. (Tesis de pregrado). Universidad técnica particular de Loja.
- Kim, S. G., & Dubovi, E. J. (2003). A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. *Biologicals*, 31(2), 103–106. [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00023-X)
- Labanda, J. (2015). Prevalencia de Diarrea Viral Bovina en vacas lecheras de las ganaderías del cantón Loja. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Loja.
- Lanyon, S. R., Hill, F. I., Reichel, M. P., & Brownlie, J. (2013). Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 199(2), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024>
- Lo, Y. M. D., Chiu, R. W. K., & Chan, K. C. A. (2006). *Clinical applications of PCR*. Humana Press.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, (63), e3998–e3998. <https://doi.org/10.3791/3998>
- McPherson, M. J., & Møller, S. G. (2006). *PCR*. Taylor & Francis.
- Morales, S. (2002). Detección de terneros con infección congénita con el virus de la diarrea viral bovina en dos hatos lecheros de la provincia de Arequipa. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- O’Connell, J. (2002). *RT-PCR protocols*. Humana Press.
- OIE. (2015). Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres 2012. World Organization for Animal.
- Patil, S. S., Hemadri, D., Shankar, B. P., Raghavendra, A. G., Veeresh, H., Sindhoora, B., ... Prabhudas, K. (2010). Genetic typing of recent classical swine fever isolates from India. *Veterinary Microbiology*, 141(3–4), 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.021>
- Pérez, M. (2008). Diseño y optimización de un sistema de diagnóstico rápido de dengue, a partir de cultivos virales, mediante la técnica de RT-PCR (transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa). (Tesis de pregrado). ESPE / SANGOLQUÍ / 2008. Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/793>
- Pilz, D., Alfieri, A. F., Lunardi, M., & Alfieri, A. A. (2007). RT-PCR em pools de soros sanguíneos para o diagnóstico da infecção aguda e de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarréia viral bovina. *Arquivo*

Brasileiro de Medicina Veterinaria E Zootecnia, 59(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000100001>

- Raya, A. I., Gomez-Villamandos, J. C., Sánchez-Cordón, P. J., & Bautista, M. J. (2012). Virus Distribution and Role of Thymic Macrophages During Experimental Infection With Noncytopathogenic Bovine Viral Diarrhea Virus Type 1. *Veterinary Pathology*, 49(5), 811–818.
<https://doi.org/10.1177/0300985811414031>
- Ridpath, J. F. (2003). BVDV genotypes and biotypes: Practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*, 31(2), 127–131.
[https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00028-9](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00028-9)
- Rondón, I. (2006). Revision De Literatura Diarrea Viral Bovina : Patogénesis E Inmunopatología Bovine Viral Diarrhea : Pathogenesis and Immunopathology. *MVZ Córdoba*, 11(1), 694–704.
- Rothman, R. (n.d.). Determination of DNA Concentration and Purity by Ultraviolet Spectrophotometry. In Rochester Institute of Technology (Ed.), *Genetic Engineering Laboratory Manual* (p. 206). New York. Recuperado de [https://people.rit.edu/rhrsbi/GEPages/LabManualPDF5ed/GE Lab Manual 8th ed.pdf](https://people.rit.edu/rhrsbi/GEPages/LabManualPDF5ed/GE%20Lab%20Manual%208th%20ed.pdf)
- Saliki, J. T., & Dubovi, E. J. (2004). Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20(1), 69–83. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.005>
- Soltan, M. A., Wilkes, R. P., Elsheery, M. N., Elhaig, M. M., Riley, M. C., & Kennedy, M. A. (2015). Circulation of bovine viral diarrhea virus--1 (BVDV-1) in dairy cattle and buffalo farms in Ismailia Province, Egypt. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(12), 1331–7. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26719939>
- Thermo Fisher Scientific. (2010). NanoDrop 8000 Spectrophotometer V2.2 User Manual. Recuperado June 27, 2017, from www.nanodrop.com
- Verma, S. K., Singh, L., Zundel, S., Riaz, T., Shehzad, W., Bessièrè, J., ... Fazekas, A. (2002). Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application. *Molecular Ecology Notes*, 3(1), 28–31.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00340.x>
- Weinstock, D., Bhudevi, B., & Castro, A. E. (2001a). Single-Tube Single-Enzyme Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus in Pooled Bovine Serum. *Journal of clinical microbiology*, 39(1), 343–346.
[https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.343–346.2001](https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.343-346.2001)
- Weinstock, D., Bhudevi, B., & Castro, A. E. (2001b). Single-Tube Single-Enzyme Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus in Pooled Bovine Serum, 39(1), 343–346. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.343>
- Zanotto, C., Giangaspero, M., Büttner, M., Braun, A., Morghen, C. D. G., Elli, V., ... Radaelli, A. (2002). Evaluation of poliovirus vaccines for pestivirus contamination: non-specific amplification of poliovirus sequences by pan-

pestivirus primers. *Journal of Virological Methods*, 102(1–2), 167–172.
[https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00009-5)