



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

MODALIDAD DEL PROYECTO DE INVESTIGACION

TEMA:

**“PRESENCIA DE INFECCIONES POR EL VIRUS DE LA LENGUA AZUL EN PREDIOS
CON ELEVADA MORTALIDAD EN BOVINOS DEL CANTÓN CHONE DE LA
PROVINCIA MANABÍ”**

AUTORES:

DELGADO PINARGOTE DIANA ESTEFANÍA

MACÍAS MOREIRA RICHARD EDWARD

TUTOR DE TESIS:

Dra. MARITZA BARRERA VALLE PhD.

LODANA- SANTA ANA- MANABÍ- ECUADOR

2020

TEMA:

**“PRESENCIA DE INFECCIONES POR EL VIRUS DE LA LENGUA AZUL EN
PREDIOS CON ELEVADA MORTALIDAD EN BOVINOS DEL CANTÓN CHONE DE
LA PROVINCIA MANABÍ”**

DEDICATORIA I

Dedico este trabajo principalmente a Dios, quien como guía estuvo presente en el caminar de mi vida, bendiciéndome y dándome fuerzas para continuar con mis metas trazadas sin desfallecer.

A mi padre el Dr. Stalin Delgado Santana por ser mi inspiración para seguir adelante con mis estudios compartiéndome conocimientos de su parte, a mi madre Vanessa Pinargote Acuña por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional.

A mis hermanas Dra. Mercedes, Mabelyn y Sandy por sus palabras de aliento para seguir constante en este camino, a mis sobrinitas Paulette y Fiorella y a mis demás familiares por confiar y creer en mí.

A mi compañero de tesis Richard Macías Moreira por aceptar mis opiniones, y por brindarme ser parte de este trabajo junto a él. A todos mis amigos que me brindaron su apoyo emocionalmente.

A mi esposo Darwin Córdova, en el camino encuentras personas que iluminan tu vida, que con su apoyo alcanzas de mejor manera tus metas, a través de sus consejos, de su amor, y paciencia me ayudo a concluir esta meta.

A mi querida hija Amy Lucía que fue mi mayor motivo y motor en todo este proceso de mi vida estudiantil, tu afecto y tu cariño son los detonantes de mi felicidad, de mi esfuerzo y de mis ganas de buscar siempre lo mejor para ti. Aún en tu corta edad, me has enseñado y me sigues enseñando lo hermoso de la vida.

A todos, Dios los bendiga, ¡Muchas Gracias!

DELGADO PINARGOTE DIANA ESTEFANÍA

DEDICATORIA II

A Dios por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida, por los triunfos y momentos difíciles. A mis padres Richard Macías y Marizelda Moreira por haberme formado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que incluye este, me formaron con reglas y algunas libertades, pero al fin de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

Agradezco a mis abuelas Gloria y Cleopatra, a mis hermanas Denisse, María y Diana, a mi tío Franklin, a mi compañera de ruta Allison, quienes con su ayuda, cariño y comprensión han sido parte fundamental de mi vida.

A los amigos que la vida me dio, Diego, Pedro, Simón, Reynaldo, Vanessa, Orlandito, Claudia, Thalya, Diana, Daniela, Evelin, Iván.

Gracias por esa amistad que tenemos, entre risas, bromas y enojos me han regalado mis mejores momentos dentro y fuera de esas aulas que jamás olvidaré.

MACÍAS MOREIRA RICHARD EDWARD

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a todas las personas que, de una u otra manera, fueron partícipes en este proyecto de titulación.

A la Dra. Maritza Barrera por su orientación y seguimiento en el trabajo de investigación.

A los Dres. Nixon Moreira Arteaga y Emilio Andrade Dávila por sus asesorías, ayuda y dirección en nuestro trabajo de grado, ya que fue fundamental para culminarlo.

A nuestros familiares y amigos por el apoyo incondicional durante nuestra formación profesional.

A la Universidad Técnica de Manabí y a la Facultad de Ciencias Veterinarias, por la formación académica recibida, por abrir sus puertas para estudiar la Carrera de Medicina Veterinaria y por permitirnos cumplir nuestros objetivos propuestos.

A los docentes y técnicos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, personas de gran sabiduría quienes se han esforzado por ayudarnos a llegar al punto en el que nos encontramos y a nuestros compañeros de clases, con quienes compartimos grandes momentos.

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Yo, Dra. Maritza Barrera Valle PhD, Como Tutor del presente trabajo de tesis certifico:

Que el proyecto de tesis titulada: **“PRESENCIA DE INFECCIONES POR EL VIRUS DE LA LENGUA AZUL EN PREDIOS CON ELEVADA MORTALIDAD EN BOVINOS DEL CANTÓN CHONE DE LA PROVINCIA MANABÍ”**

Realizada por los egresados:

- **DELGADO PINARGOTE DIANA ESTEFANIA**
- **MACÍAS MOREIRA RICHARD EDWARD**

Culmino bajo mi tutoría, revisando que se haya cumplido, con todas las sugerencias y correcciones enunciadas y escritas mediante informe, emitido por el revisor. Es así que considero que el proyecto está listo para ser presentado al H. Consejo Directivo.

Cumpliendo a cabalidad con los requisitos que para este efecto se requiere.

Dra. Maritza Barrera Valle PhD.
TUTOR DE TESIS

APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

TEMA:

**“PRESENCIA DE INFECCIONES POR EL VIRUS DE LA LENGUA AZUL EN
PREDIOS CON ELEVADA MORTALIDAD EN BOVINOS DEL CANTÓN CHONE DE
LA PROVINCIA MANABÍ”**

Sometida a consideración del Tribunal de revisión y Sustentación y legalizada por el Honorable
Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del Título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR EL TRIBUNAL

.....
Dr. Edis Macías Rodríguez
DECANO FCV.

.....
Dra. Maritza Barrera Valle PhD.
TUTOR DE TESIS

.....
Dr. Daniel Burgos Macías
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

.....
Dra. Marina Zambrano Aguayo
MIEMBRO DE TRIBUNAL

.....
Dra. Laura De la Cruz
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN SOBRE LOS DERECHOS DE AUTOR

Por el presente autorizamos a la **UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ**, hacer uso de todos los contenidos que contiene este proyecto, con fines estrictamente académicos o de investigación. En calidad de autores del presente proyecto de tesis, Diana Estefanía Delgado Pinargote y Richard Edward Macías Moreira nos declaramos responsables de las ideas, resultados, conclusiones y recomendaciones obtenidos en el presente trabajo y son propiedad exclusiva de los autores, con excepción de la anterior autorización. Por lo tanto, queda prohibida la reproducción total o parcial de este trabajo.

AUTORES:

.....

Egda. Delgado Pinargote Diana Estefanía

.....

Egdo. Macías Moreira Richard Edward

ÍNDICE

TEMA.....	2
DEDICATORIA I.....	3
DEDICATORIA II.....	4
AGRADECIMIENTO.....	5
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR.....	6
APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL	7
DECLARACIÓN SOBRE LOS DERECHOS DE AUTOR.....	8
ÍNDICE	9
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN.	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
ANTECEDENTES.....	17
JUSTIFICACIÓN	20
OBJETIVOS	22
1. Objetivo General.....	22
2. Objetivos Específicos.....	22
CAPITULO 1.....	23
1.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	23

1.1.1.	Lengua Azul – Definición.	23
1.1.2.	Etiología.	23
1.1.3.	Epidemiología.	25
1.1.4.	Transmisión.	26
1.1.5.	Patogénesis.	27
1.1.6.	Signos Clínicos.	28
1.1.7.	Lesiones Macroscópicas.....	28
1.1.8.	Diagnóstico.....	28
1.1.9.	Diagnóstico serológico.....	29
1.1.10.	Identificación del agente	29
1.1.11.	Diagnóstico de rebaño mediante la tecnología de centinelización.	30
1.1.12.	Diagnóstico Diferencial.....	31
1.1.13.	Prevención y Control.	31
CAPITULO 2.....		32
2.1. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN		32
2.1.1.	Selección de Predios	34
2.1.2.	Extracción de sangre en los bovinos	35
2.1.3.	Obtención del suero	35
2.1.4.	Determinación de anticuerpos a VLA.....	35

2.1.5. Análisis de los datos del estudio epidemiológico de corte transversal realizado por AGROCALIDAD	35
2.1.6. Estudio serológico de corte transversal en los predios seleccionados	36
2.1.7. Diseño del estudio longitudinal con terneros centinelas	36
2.1.8. Terneros centinelas	37
2.1.9. Muestreo pre-inicial	38
2.1.10. Muestreos de sangre.....	38
2.1.11. Determinación de la presencia de VLA en la sangre con anticoagulante mediante RT PCR. 38	
RESULTADOS	39
3.1. Evaluación de la presencia de factores de riesgo a lengua azul mediante el Análisis de las encuestas	39
3.2. Resultado del estudio serológico de corte transversal	50
3.3. Estudio longitudinal en terneros centinela	51
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	60
ANEXOS	61
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	74

RESUMEN

El trabajo investigativo tuvo como objetivo demostrar la presencia del Virus de la lengua azul (VLA) en bovinos de predios con elevada mortalidad del cantón Chone de la provincia de Manabí. En primer lugar, se evaluó si existían factores de riesgo para la presentación de infecciones por del virus en 364 predios de cuatro de las parroquias ganaderas de Chone, mediante el análisis de los datos de una encuesta epidemiológica realizada por AGROCALIDAD en 364 predios de las parroquias San Antonio, Boyacá, Canuto y Ricaurte del cantón Chone. De este análisis se obtuvo que había una alta proporción de predios, donde existían factores de riesgo a lengua azul como son: un clima húmedo con temperaturas subtropicales y abundancia de humedales, que favorecen la presencia del vector culicoide en los dos primeros trimestres del año. Además, que en todas las fincas se habían presentado aumento de la mortalidad en bovinos, sin diagnóstico comprobado y que existe un desconocimiento total de la lengua azul. Posteriormente se seleccionaron seis de los predios encuestados para investigar la circulación del Virus de la lengua azul (VLA). En estos predios estudiados se encontró una amplia circulación del virus, ya que el 98.2% de bovinos muestreados, resultaron seroreactores a VLA por ELISA. Para determinar la presencia de infecciones activas de este virus se realizó un estudio longitudinal utilizando terneros centinelas serológicamente negativos a VLA, en los cuales se diagnosticó la presencia de VLA en sangre mediante RT-PCR en la 2da y 5ta semanas después de llegados al predio y la seroconversión por ELISA, entre la 3era y 8tva semanas de su introducción. Luego de haber demostrado la presencia de infecciones activas de VLA en estos predios se recomienda que se realicen investigaciones encaminadas a determinar los serotipos de VLA circulantes, cuyo conocimiento es relevante para un programa de control por vacunación.

INTRODUCCIÓN.

La lengua azul (LA) es una enfermedad vírica no contagiosa que afecta a los rumiantes domésticos y salvajes (principalmente ovinos, pero también bovinos, caprinos, bufálidos, antílopes, cérvidos, wapitíes y camélidos), y es transmitida por los insectos, en particular, por la picadura de ciertas especies de mosquitos del grupo Culicoides (OIE, 2020).

La infección por lengua azul está incluida en la lista de la OIE de las enfermedades cuya declaración es obligatoria y restringe la comercialización de animales vivos, semen y óvulos desde los países afectados (OIE, 2020)

Entre los factores de riesgo de infección con VLA se encuentran las condiciones climáticas, la presencia de humedales y la alta cantidad de bovinos o carneros, todas que favorecen el ciclo de vida de los culicoides, además, la entrada de nuevos animales (Da Silva *et al*, 2018).

Los signos clínicos de la lengua azul en bovinos son muy variables y pueden ser leves o tener cierta gravedad que conduce a la muerte en un bajo proporción de animales, y esto depende de factores como la raza, la edad y la virulencia de la cepa. En los países de clima húmedo tropical y subtropical con una amplia población del vector, la enfermedad se hace enzoótica y los terneros están protegidos por los anticuerpos maternos, cuando éstos descienden, ya han adquirido inmunidad por las continuas picadas de las hembras culicoides cargadas de virus (Arenas J. , 2013).

En Ecuador se divide en 4 regiones: Litoral o Costa, Sierra, Oriente, un archipiélago ubicado a ~1000 km de la costa, llamado Colón o Islas Galápagos, regiones que tienen diferencias considerables de topografía y climas (Varela *et. al*, 2020).

Desde 1986, había evidencias serológicas de circulación del virus LA en Ecuador (López *et al*, 1986), pero como en bovinos la enfermedad transcurre con signos clínicos leves, no se ha reportado

la presencia de esta enfermedad viral en el país. Sin embargo, recientemente Verdesoto *et al* (2016) encontraron bovinos con diagnóstico positivo de lengua azul por PCR y por ELISA.

Con el desarrollo de la ganadería en la provincia se ha buscado la mejora del potencial genético y los ganaderos han adquirido hembras y también terneros que pueden ser susceptibles al virus de la lengua azul (VLA), pues provienen de otras zonas como Paraguay y de haciendas de la sierra, donde el clima y la altura asegura que no haya presencia del vector.

Manabí es la provincia con mayor uso del suelo en producción ganadera. Es la mayor productora de ganado bovino (por extensión) el mal uso de los suelos ha llevado a esta provincia a expandir su frontera agropecuaria y hoy en día se tiene una densidad bovina de 0,8 UBA / Ha. La Zona Norte de Manabí posee el 72% de la producción ganadera en la provincia, en donde Chone es el Cantón con mayor producción de ganado bovino. El país en el 2013 tuvo una producción de 5134.117 UBA y Manabí representa el 15% de toda la producción ganadera 916.710 UB (Alava,2017).

El clima de la provincia de Manabí oscila entre subtropical seco a tropical húmedo y tropical extremadamente húmedo y está determinado por las corrientes marinas; durante el invierno que se inicia a principios de diciembre y concluye en mayo el clima es caluroso. Es por eso que la provincia de Manabí reúne las condiciones ambientales necesarias para que se desarrollen los culicoides.

Entre los años 2018 y 2019 ha aumentado la mortalidad en bovinos adultos en la provincia de Manabí como ha sido informado por la Corporación de ganaderos de Manabí en una nota de prensa, esta mortalidad se ha asociado con la presencia de parásitos hemotrópicos, los cuales han sido diagnosticados en algunos de estos eventos, pero no se corresponde con las mortalidades informadas para estos parásitos en los países donde son enzoóticos (Calderón *et al*, 2016).

Sin embargo, puede ser que hayan ocurrido infecciones debidas al Virus de la lengua azul que no se hayan diagnosticado, porque ni siquiera se investigaron, y que podrían estar asociadas a los incrementos de mortalidad de bovinos en la provincia, unidos a factores ecológicos del vector y/u otras infecciones concurrentes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existen infecciones por el virus lengua azul en los predios ganaderos de Chone donde se han registrado muertes de bovinos adultos durante 2018 y 2019?

Formulación de la hipótesis

El virus de la lengua azul se encuentra produciendo infecciones subclínicas o no diagnosticadas en bovinos de los predios de Chone que han registrado elevada mortalidad.

ANTECEDENTES

La lengua azul (LA) es una enfermedad infecciosa, no contagiosa producida por el virus de la lengua azul (VLA) el cual es transmitido a los rumiantes domésticos y salvajes por ciertas especies de género *Culicoides* Latreille, 1809 (Orden *Diptera*, Familia *Ceratopogonidae*) (Rojas *et al*, 2019).

Según Montes (2013) en los últimos años, la circulación del virus de la LA (VLA) ha sido muy intensa en Europa, especialmente en España, donde se ha detectado circulación de tres serotipos diferentes (1, 4 y 8).

Debido a que la LA cursa de forma subclínica o leve en bovinos y que es transmitida solamente por vectores, en otros países para los estudios epidemiológicos activos se ha utilizado la tecnología de la centinelización, con el fin de detectar los rebaños afectados por VLA y coleccionar virus para su caracterización molecular y patogenicidad (Daniels *et. al.*, 2004).

Debido a la variabilidad antigénica de la proteína VP 2 se presentan 27 serotipos y variantes topográficas, por lo que para un control efectivo de LA es imprescindible conocer los serotipos circulantes, para que sean incluidos en la formulación vacunal (Rao *et al*, 2014).

En la década de 1980, un importante programa de rebaños centinela demostró que BTV-1, 3, 4, 6, 8, 12, 17 circulaban en América Central y la región del Caribe, presumiblemente sin expresión clínica (Mo *et al.*, 1994). En América del Sur, los únicos serotipos detectados por métodos virológicos (aislamiento de virus o detección del genoma por reacción en cadena de la polimerasa) fueron el serotipo 4 en Brasil en 1979 y más recientemente en Argentina (Lager *et al.*, 2004; Legisa *et al.*, 2013) y serotipo 12 en las provincias del sur de Brasil en dos episodios clínicos en 2001 (Clavijo *et al.*, 2002). En las islas caribeñas de Martinica y Guadalupe, BTV-1, 2, 3, 5, 9, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 22 y 24 fueron detectados por RT-PCR entre 2006 y 2011, en ovinos con signos

clínicos, así como en ganado recién importado de Francia continental utilizado como animales centinela (Virrouge, *et al*, 2014).

En Centroamérica y el Caribe, e incluso en las Antillas Menores, el virus de la lengua azul está muy extendido (Greiner *et al.*, 1993; Martínez *et al.*, 2011; MacLachlan *et al.*, 2007). Desde principios de la década de 1980 hasta principios de la de 1990, se detectó BTV en Guatemala, El Salvador, Honduras, Costa Rica, Nicaragua, Panamá, Trinidad y Tobago, Barbados, Puerto Rico, Jamaica, la isla francesa de Martinique, la isla francesa de Guadalupe y la República Dominicana. (Legisa *et al.* 2014. En 1981, Metcalf *et al.* (1981) detectaron casi el 80% de la prevalencia en Puerto Rico e Islas Vírgenes. En la década de 1980, Gibbs *et al.* (1983) describieron una seroprevalencia general del 70% en ganado, 67% en ovejas y 76% en cabras, detectado por inmunodifusión en gel de agar (AGID). Estos autores también describieron altos porcentajes de prevalencia en Jamaica (77%), Antigua (76%), Santa Lucía (82%), Barbados (61 %), Granada (88%) y Trinidad y Tobago (79%). (Citado por Legisa *et al* (2014). En Cuba, se encontró una prevalencia de 99.7% (Martínez *et al*, 2011).

Legisa (2014) reporta que, en Sudamérica, el VLA ha sido detectado por técnicas serológicas en todos los países, salvo Bolivia y Uruguay. Argentina y Brasil son los únicos países donde ha sido aislado el virus. En Argentina han sido obtenidos 5 aislamientos de VLA serotipo 4 en ganado bovino. Tres de estos aislamientos fueron logrados entre los años 1999-2001, mientras los dos restantes fueron obtenidos en los años 2009 y 2010.

En Ecuador hay pocos reportes de estudios serológicos de lengua azul, el primero fue realizado por López *et al* en 1985, los que detectaron anticuerpos específicos a VLA por inmunodifusión doble en agar, en 9 de 87 bovinos (10,3% de seroprevalencia) en la provincia de El Oro, en la zona de clima amazónico del país que tiene un clima tropical húmedo selvático. En caprinos de Manabí

se encontró una seroprevalencia del 7,4% (Mantilla, 1998, citado por Legisa *et al*, 2014) Más tarde en 2011, Mantilla *et al*. encontraron una prevalencia de 8% en ovejas de Beaterio y Tandapi (Merino Mena 2011 citado por Legisa *et al*, 2014), esas parroquias se encuentran en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas que es una zona lluviosa y con temperaturas cálidas todo el año. El único reporte de diagnóstico de virus en sangre ha sido realizado recientemente por Verdesoto *et al* (2016). En este trabajo se muestrearon 295 bovinos sin signos clínicos de infección de dos granjas ubicadas en las regiones andina y amazónica y de un matadero en la región costera. Los análisis de detección de anticuerpos de grupo determinados por ELISA, mostraron una alta proporción de anticuerpos a VLA (98.9%) en los animales muestreados. Además, mediante la técnica de RT-PCR pusieron en evidencia la presencia de ARN de VLA en el 10.2% muestras de sangre de ganado. El aislamiento viral permitió identificar también VLA serotipos 9 (BTV9), 13 y 18. Estos hallazgos sugieren que VLA es una enfermedad enzoótica en Ecuador.

La autoridad de Sanidad Animal de Ecuador ha informado a la OIE sobre la primera ocurrencia de Lengua Azul en su territorio. Como parte de su programa de vigilancia serológica, en el mes de diciembre se detectó la presencia de serología positiva para Lengua Azul en 7/7 bovinos en un establecimiento de bovinos para carne en El Emabase, Provincia de Napo. No se ha caracterizado el agente (serotipo) y se desconoce el origen de la infección. No se informa sobre más investigaciones para la detección del virus y su caracterización (Prosaia, 2016).

JUSTIFICACIÓN

El tema de Lengua Azul no ha sido muy explorado en el Ecuador. La primera evidencia referencial de VLA fue desarrollada por Escandón (2011) registrando los primeros componentes relacionados, mediante un estudio bibliográfico para la Universidad de Cuenca y ya en el 2016 se evidencia un estudio técnico y científico para la Universidad de San Francisco de Quito desarrollado por Verdezoto *et al.*, 2018.

Según los datos brindado por el INEC Manabí posee 896,476 bovinos. Cevallos (2018) describe que más de 300,000 reses pertenecen a Chone lo que representaría 31% de la población ganadera de Manabí, vale acotar que estos hatos ganaderos se caracterizan en la gran mayoría por ganado de doble propósito.

El cantón Chone se considera una zona de alta incidencia debido a los factores ambientales de alta humedad que es propicia para el desarrollo de los vectores

Tras las muertes inesperadas de ganado vacuno ocurridas en el Cantón Chone de la Provincia de Manabí, solamente se han tomado muestras de sangre para el diagnóstico de hemoparásitos y se han encontrado parásitos de la sangre del bovino del género *Tripanosoma*, *Anaplasma* y *Babesia*, pero los signos clínicos y la alta mortalidad no se corresponde con los observados en infecciones producidas por estos parásitos llamados Hemotrópicos del bovino (Calderón *et al.*, 2016). No se han tomado muestras para investigar agentes virales como el virus de la lengua azul que podría, junto con los altos niveles de infestación parasitaria estar causando la enfermedad.

Desde la perspectiva comercial la Infección provocada por el virus de la lengua azul está entre las enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor para el 2019, lo que limita

la comercialización en mercados nacionales e internacionales cuando existen brotes de esta. (OMSA, 2019).

Existe la necesidad de contar con un diagnóstico certero de cuál o cuáles son los agentes etiológicos involucrados en este síndrome que produce mortalidad en bovinos del Cantón Chone, ya que solamente así se puede proponer un tratamiento y un plan de prevención de la infección y la transmisión del agente a otros predios de la provincia y el país.

Debido a esto, nuestra investigación se encaminó a la determinación de la presencia de infecciones del virus de la lengua azul en los predios del Cantón Chone, que permita posteriormente elaborar un plan de medidas para el control de esta enfermedad basadas en el conocimiento de su etiología.

OBJETIVOS

1. Objetivo General

- Demostrar la presencia de infecciones por el virus lengua azul y la existencia de factores de riesgo relacionados con la enfermedad, en bovinos de predios del cantón Chone con elevada mortalidad.

2. Objetivos Específicos

- Evaluar en qué proporción existen factores de riesgo a la lengua azul en predios de cuatro parroquias del cantón Chone donde se presentaron aumentos de mortalidad en bovinos.
- Determinar la circulación viral y la presencia de infecciones activas del Virus de la lengua azul en predios seleccionados de las parroquias en estudio.

CAPITULO 1

1.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Las arbovirosis son enfermedades o infecciones provocadas por virus (la gran mayoría de tipo ARN) que son transmitidos por artrópodos vectores. Tras la picadura de un vector biológico a un hospedador virémico, el virus es capaz de replicarse en las células del invertebrado, incrementándose de forma significativa los títulos virales en estos artrópodos; el ciclo se completa tras la picadura del vector infectado a un hospedador susceptible. (Montes, 2013)

1.1.1. Lengua Azul – Definición.

Es una enfermedad infecciosa y no contagiosa transmitida por vectores que afecta a rumiantes domésticos y silvestres y camélidos. No es una zoonosis por lo cual no es un problema de salud pública. La lengua azul resulta de la infección por un virus miembro del género *Orbivirus* perteneciente a la familia *Reoviridae* (SGA, 2016).

La infección por el virus de la lengua azul se encuentra incluida dentro de la lista de enfermedades notificables de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2020) y para los países de la Unión europea es actualmente es una enfermedad exótica que se está extendiendo por numerosos países de Europa, desde Finlandia hasta Malta. Presenta 25 serotipos, habiéndose detectado en España el 1, 4 y 8 (Larioja, 2016). En el Caribe, Centroamérica y Suramérica ha habido reportes sobre todos de seroreactores y pocos de aislamiento viral y no se ha medido el impacto de la enfermedad (Legisa *et al*, 2014).

1.1.2. Etiología.

El virus de la lengua azul es un virus ARN desnudo que requiere para su transmisión de la picadura de un mosquito del género *Culicoides* o la inoculación de forma experimental de sangre (Vega, 2014).

Los virus de la familia *Reoviridae* fueron originariamente aislados de los tractos respiratorio y digestivo, sin estar asociados a ninguna enfermedad. Estos virus icosaédricos, de 60 a 80 nm de diámetro, carecen de envoltura y poseen una doble o triple cápsida formada por cubiertas proteicas concéntricas. El genoma está compuesto por 10 o 12 segmentos de ARN bicatenario. Su replicación tiene lugar en el citoplasma intracelular, con la formación, a menudo, de inclusiones intracitoplasmáticas (Axonveterinaria, 2016).

Los Reovirus son bastante resistentes al calor, los disolventes orgánicos y los detergentes no iónicos.

La partícula de virus está compuesta por diez fragmentos de ARN bicatenario rodeadas por dos cápsidas de proteínas. A diferencia de otros arbovirus, Virus Lengua Azul (VLA-BTV) carece de una envoltura lipídica. La partícula tiene un diámetro de 86 nm. (Acevedo *et al*, 2016).

El núcleo está conformado de 3 proteínas menores que se asocian al genoma, la VP1, la VP4 y la VP6, de igual forma 2 proteínas mayores, la VP3 y la VP7. La cápsida externa que rodea al núcleo la conforman 2 proteínas específicas del virus, la VP2 y VP5 que determinan su variabilidad antigénica. Dentro de las proteínas no estructurales se reconocen la NS1, NS2, NS3 y la recientemente descubierta NS4 (Arenas, 2013).

Existen tres géneros de importancia veterinaria: Orthoreovirus, Rotavirus y Orbivirus (Axonveterinaria, 2016). El virus de la Lengua Azul pertenece a este último grupo y, hasta el momento, se han descrito 27 serotipos antigénicos diferentes (Schulz *et al.*, 2016).

El virus no sobrevive en tejido muscular, órganos o material putrefacto y no es transmitido por estos materiales (Noebauer, 2013).

En el caso del ganado vacuno el período de incubación puede ser de más de 40 días y sin presentar síntomas (Zotal, 2015).

Taxonomía del Virus de la lengua azul

Taxón	<i>Nombre</i>
Dominio	<i>Riboviria</i>
Reino	<i>Orthornavirae;</i>
Filo	<i>Duplornaviricota</i>
Clase	<i>Resentoviricetes</i>
Orden	<i>Reovirales</i>
Familia	<i>Reoviridae</i>
Subfamilia	<i>Sedoreovirinae</i>
Género	<i>Orbivirus</i>
Especie	<i>Virus de la lengua azul</i>

1.1.3. Epidemiología.

El virus está presente desde la latitud 35° S hasta 50° N, que se corresponde con la franja tropical y subtropical (Mellor *et al.*, 2000). Esto se debe a que la lengua azul es transmitida por Dípteros de la familia Ceratopogonidae, del género Culicoides y la presencia de las infecciones por este virus siempre están asociadas a la presencia del vector.

Los cambios recientes en la distribución global de BTV se han especialmente profundos en Europa donde, antes de 1999, solo había incursiones limitadas de serotipos individuales de BTV en el Mediterráneo partes del continente habían sido documentadas (Gómez Trejedor, 2004; Mellor y *col.*, 2008; Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2008). Desde el presente milenio, múltiples serotipos de BTV han invadido y propagado en todo el borde norte de la cuenca mediterránea y el virus está ahora bien establecido en partes de la región, la mayoría de central /el sur de Italia, por ejemplo (Calistri *et al.*, 2004; Rodríguez-Sánchez y *col.*, 2008; Zientara y Sánchez-Vizcaíno, en prensa. El cambio climático se ha propuesto como un potencial impulsor de esta reciente expansión hacia el norte de BTV desde África y Asia en la Europa mediterránea (Maclachlan *et al.*, 2013).

Las hembras de estos insectos depositan los huevos en la vegetación próxima a zonas húmedas o pantanosas, estos eclosionan entre los 2 y 9 días, dependiendo de las especies y de la temperatura.

En los países cálidos, el desarrollo de las larvas se completa en 14-25 días, pero, en áreas templadas, este periodo se puede prolongar hasta siete meses. Los adultos emergen de la pupa en 3-10 días, machos y hembras chupan jugos vegetales, pero solo las hembras necesitan, además, realizar la ingestión de sangre para la maduración y puesta de los huevos. Presentan actividad crepuscular y nocturna y prefieren las temperaturas cálidas con alta humedad ambiente y sin aire. Aunque los adultos vuelan solo unos cientos de metros, la dispersión de estos insectos debida al viento puede tener, en ocasiones, una gran importancia (Axonveterinaria, 2016).

El tema de las especies de vectores sospechosas de ser responsables de la transmisión de VLA entre rumiantes, ha sido revisado por de Legisa *et al* (2014), donde se establece que este virus ha sido aislado de *Culicoides insignis*, *C. filarifer* y *C. pusillus* [Walton y Osburn (1992), Greiner *et al.* (1990) y Mo *et al.* (1994)] en la región Central y El Caribe. Además, sugirieron que estas tres especies, principalmente *C. insignis*, eran las especies principales involucradas en la transmisión del virus en dicha región. *C. insignis* es una de las especies más frecuentes encontradas en el sureste de los EE. UU., la cuenca del Caribe y América Central y del Sur (Maclachlan *et al.*, 2012) y, por supuesto, está directamente asociada con la transmisión de BTV entre hospederos naturales rumiantes y no rumiantes. Otras especies de *Culicoides* que podrían actuar como vectores en esa región son *C. pusillus*, *C. furens*, *C. filarifer* y *C. trilineatus*.

En Perú Navarro *et al.*, (2019) reportaron alrededor de 33 especies de *Culicoides* , pero solo en *C. insignes* se ha encontrado ARN de VLA.

1.1.4. Transmisión.

La especie de culicoides que transmiten VLA son: *Culicoides variipennis* en EE. UU y en el Subtrópico y el Caribe por *Culicoides insignes* y *Culicoides pussilus*. Este último vector se extiende hasta la región de Brasil y Ecuador (Fernanda *et al.*, 2014).

La transmisión del virus puede ocurrir durante el año, en particular durante los periodos de lluvia. Los bovinos infectados cumplen un papel importante para el mantenimiento del virus en una región, pueden servir como una fuente de virus por varias semanas sin mostrar signos clínicos o sólo pocos signos, y a menudo son el hospedador preferido de los insectos vectores.

Ha sido comprobada la transmisión vertical de vacas gestantes a sus descendientes mediante la placenta (Shrijs *et al*, 2016) y de los machos a las hembras por medio del semen (Gu, y otros, 2014), pues se ha encontrado en el semen de toros y carneros y así puede transmitirse a las vacas y ovejas susceptibles, pero este no es un mecanismo de transmisión significativo. No se transmite por contacto con animales o lana, ni por el consumo de leche (OIE., 2011)

1.1.5. Patogénesis.

El virus de la lengua azul se replica en células hematopoyéticas y de los vasos sanguíneos. La destrucción de estas células endoteliales ocasiona las hemorragias e inflamaciones (Escandon, 2011).

El insecto vector es la clave de la transmisión del virus de lengua azul entre los animales. Los vectores son infectados con el virus al ingerir la sangre de animales infectados. Sin el vector, la enfermedad no puede transmitirse entre los animales. Para que exista transmisión del virus, este debe replicarse en el hospedero hasta alcanzar el nivel mínimo de viremia que permita ser ingerido en la cantidad suficiente por el vector para ser capaz de replicar en éste. Viremias suficientes para transmitir el virus a vectores alcanzan los ovinos (104.4 U inf/ml), los bovinos (104.5 U. inf/ml) y los caprinos (104.5 U. inf/ml) (Jímenez, 2008).

1.1.6. Signos Clínicos.

Las infecciones experimentales realizadas en rumiantes domésticos demuestran que, en los animales afectados, tras un período de incubación de 5 a 10 días la temperatura corporal alcanza 41°C, manteniéndose durante 5 o 6 días. A las 48 horas del comienzo de la fiebre, se manifiestan otros signos como descarga nasal mucopurulenta en ocasiones acompañada de sangre, salivación de aspecto espumoso y enrojecimiento de las mucosas nasal y oral (MacLachlan, *et al.* 2009; Montes, 2013).

Solo el 5% de los bovinos pueden presentar síntomas leves y la tasa de mortalidad por lengua azul en el ganado vacuno es también inferior a la del ovino, situándose en torno al 5%. Este hecho hace más difícil el diagnóstico, ya que la lengua azul podría ser confundida con otras enfermedades (Zotal, 2015)

En ganado ovino la morbilidad es del 100% y la mortalidad varía del 30 al 70% en función del serotipo de virus y de la raza afectada. En los casos de supervivencia la recuperación es muy lenta, quedándole secuelas permanentes como tortícolis y cojera (Zotal, 2015).

1.1.7. Lesiones Macroscópicas

La mayoría de las muertes son debidas a neumonía secundaria. En algunos casos, el ganado puede morir a causa de una degeneración extensa del tracto gastrointestinal. Las infecciones congénitas de becerros pueden causar una variedad de anormalidades, incluyendo hidrocefalia, ceguera, ataxia temporal, artrogrifosis y escoliosis (Noebauer, 2013).

1.1.8. Diagnóstico.

La mejor opción para su diagnóstico es recurrir a técnicas de laboratorio para la identificación del virus y la detección de anticuerpos en animales no vacunados. Se obtiene muestras de suero y sangre con EDTA de animales que muestren signos clínicos de la enfermedad y en caso de

sospecha en animales muertos, se toman muestras de bazo, hígado, ganglios linfáticos, lengua o médula ósea. Las muestras de abortos y neonatos deben incluir sangre completa con EDTA y si es posible bazo, pulmón, cerebro y suero (Delgado, 2017).

Para la detección de anticuerpos de grupo se ha recomendado el ELISA de competición que es más específico que la inmunodifusión doble en agar y para poner en evidencia la presencia de virus, las técnicas recomendada son la PCR con reverso transcripción (RT –PCR) tanto anidado en gel como en tiempo real. El aislamiento viral en embriones de pollo y en cultivos celulares de células de mosquito, es el método más sensible (OIE, 2017).

1.1.9. Diagnóstico serológico

- a)** ELISA para la detección de anticuerpos frente al virus de la Lengua azul; disponible en todos los Laboratorios de diagnóstico de la enfermedad.
- b)** Serotipificación por seroneutralización: Técnica de confirmación serológica disponible frente a los diversos serotipos del virus.

1.1.10. Identificación del agente

1.1.10.1. Aislamiento del virus

Las muestras óptimas para el aislamiento del VLA es la sangre de animales febriles. Los glóbulos rojos lavados son diluidos en medio adecuado e inoculados vía intravenosa en huevos de gallina embrionados de 10-12 días de edad o por inoculación en líneas celulares de mosquitos, BHK-21 y VERO (OIE, 2014).

1.1.10.2. Detección del ARN genómico del VLA

La técnica de la reverso-transcripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) es una técnica sensible y específica para la detección de genomas de virus ARN (Mackay *et al.*, 2002).

Primero se realiza la reacción de reverso-transcripción para la obtención de la hebra de ADN complementario que sirve de molde para la PCR. En el caso de VLA se emplean dos parejas de cebadores que amplifican dos regiones anidadas del segmento 6 del ARN viral que codifica para la NS-1. Esta proteína no estructural es un antígeno que comparten los virus de la lengua azul de todos los serotipos (Roy, 2017).

La presencia de los productos de la PCR se pone en evidencia a través de una electroforesis de agarosa en tampón apropiado y en presencia de un colorante intercalador de ADN. Los geles son observados en un transiluminador bajo luz UV y tomadas fotografías con una cámara digital. En el caso de VLA debe obtenerse un producto de PCR de 200pb (Roy, 2017).

1.1.10.3. Serotipificación por RT-PCR-Secuenciación.

Para la identificación del serotipo es necesario amplificar el segmento 2 que corresponde al gen de la proteína VP2 que tiene una gran variabilidad y es el responsable de los diferentes serotipos y posteriormente secuenciar para determinar el serotipo de la cepa de VLA circulante (Maan *et al.*, 2007).

1.1.11. Diagnóstico de rebaño mediante la tecnología de centinelización.

Desde 1992 (Sukarsih *et al.*, 1992) establecieron la tecnología de la centinelización para los estudios epidemiológicos de los arbovirus (virus transmitidos por mosquitos) sobretodo de bovinos.

Este es un método de investigación epidemiológica activa que consiste en colocar en los predios en estudio terneros susceptible (desprovistos de anticuerpos contra el virus) y realizar un estudio de cohorte (longitudinal) de las muestras de sangre tomadas secuencialmente durante 6 semanas o más, las cuales se analizan por una técnica de detección de anticuerpos y de detección de virus (Díaz *et al.*, 2013).

Para los estudios epidemiológicos de LA se ha utilizado ampliamente este método (Davies 1978, Ferrari *et al* 2005, Virrouge *et al.*, 2014), ya que permite obtener animales virémicos en dos o tres semanas sin necesidad de obtener muestras de sangre de una gran cantidad de animales; esto último es laborioso y costoso sobre todo en bovinos de cría extensiva por la movilización de los animales hacia el lugar de la extracción de sangre, adicionado al costo de las pruebas de diagnóstico.

1.1.12. Diagnóstico Diferencial.

El diagnóstico diferencial incluye la fiebre aftosa, estomatitis vesicular, peste de los pequeños rumiantes, fotosensibilización por plantas, fiebre catarral maligna, diarrea viral bovina, rinotraqueitis infecciosa bovina, infección por parainfluenza-3, Ectima contagioso (dermatitis pustulosa contagiosa), viruela ovina, pododermatitis infecciosa y la infestación de *Oestrus ovis*. En el ganado vacuno y ciervos, el EHD (enfermedad epizootica hemorrágica) también puede provocar síntomas similares (CFSPH, 2006).

1.1.13. Prevención y Control.

Se ha demostrado que la utilización de vacunas es el arma más eficaz en el control y lucha contra esta enfermedad, tanto para permitir el movimiento de los animales sensibles (Agronegocios, 2015). Pero es necesario determinar previamente cuáles son los serotipos circulantes para una adecuada formulación de la vacuna (Rao *et al.*, 2014).

El control y eliminación de los Culicoides es fundamental ya que su picadura inocula el virus al ganado. Se recomienda el uso de insecticidas de uso ganadero (Zotal, 2015).

Este tipo de mosquito cría en el estiércol y purín por lo que el tratamiento de estos y la desinfección e higienización de recintos ganaderos es clave para prevenir un brote de lengua azul (Zotal, 2015).

CAPITULO 2

2.1. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

Este trabajo constó de tres partes:

1. Investigación de campo de corte transversal cuantitativa para la evaluación de la existencia de factores de riesgo relacionados con las infecciones por lengua azul en las parroquias de San Antonio, Canuto, Boyacá y Ricaurte, donde se considera se presentan las condiciones más idóneas para el desarrollo de vectores (Mosquito) ya que hay la presencia de agua y humedad. La fuente de información fueron los datos obtenidos de una encuesta epidemiológica realizado por AGROCALIDAD en el 2018 en 325 predios de Chone.
2. Investigación de campo de corte transversal cuantitativa en 6 predios correspondientes a las parroquias en estudio, para determinar la circulación del virus de la lengua azul, mediante la demostración de la presencia de anticuerpos específicos al virus.
3. Investigación de campo, cualitativa y longitudinal utilizando la metodología de centinelización, para investigar la presencia de infecciones activas del virus en los predios de Chone estudiados. Este estudio longitudinal, se dividió en 2 experimentos, para facilitar los muestreos. Los dos experimentos se realizaron en el año 2019, en los meses de febrero/ marzo y en julio/agosto respectivamente.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

1.- Determinar la presencia de factores de riesgo a la lengua azul en predios del cantón Chone

Investigación documental cuantitativa
Instrumento: 9 Preguntas de encuestas realizadas a propietarios de 6 parroquias de Chone con elevada mortalidad

Factores de riesgo evaluados:

- Clima
- Presencia de mosquitos época del año
- Presencia de Humedales y depósitos de agua
- Mortalidad
- Nivel de diagnóstico
- Conocimiento de la lengua azul

2.-Determinar la circulación del virus lengua azul en los predios seleccionados

Investigación de campo de corte transversal cualitativa y descriptiva

Medición: Determinación de la proporción de examinados positivos de Anticuerpos al VLA

Se determinó la N suponiendo una prevalencia de 98% y un error del 10%

3.- Demostrar la presencia de infecciones VLA en los predios seleccionados mediante el estudio de terneros centinelas.

Tipo de Investigación: Experimental de campo, cualitativa y longitudinal

Es Experimental de campo porque se realizó en el campo, pero se controlaron las siguientes variables:

- a) **Circulación viral en el predio**, porque se realizó en predios con alta tasa de examinados positivo, presencia del vector culicoides
- b) **Susceptibilidad el animal** (se colocaron animales susceptibles o sea desprovistos de anticuerpos)

Medición: Presencia de VLA en sangre a través de PCR y seroconversión por ELISA, en animales centinelas

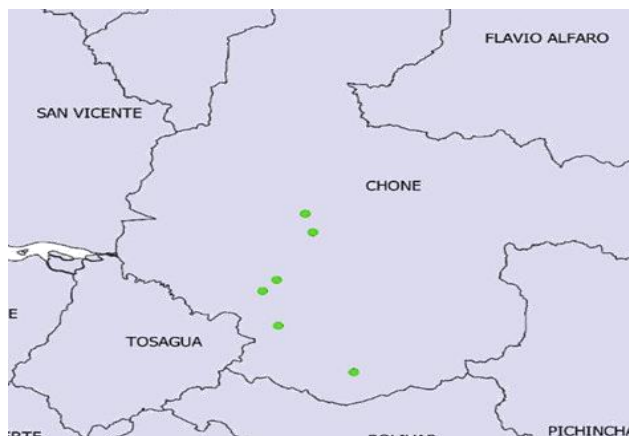
2.1.1. Selección de Predios

La investigación se realizó en el Cantón Chone, los datos recopilados en la primera parte, corresponden a una encuesta en 325 predios en las parroquias San Antonio, Boyacá, Ricaurte y Canuto (Fig. 1).



Fig. 1. Ubicación dentro del mapa de Chone de las parroquias donde se encuentran las UPA encuestados por AGROCALIDAD

Para la segunda y tercera etapas se seleccionaron seis predios de estas parroquias en base a la presentación de incrementos de mortalidad entre los años 2018 y 2019 y a la aceptación de los propietarios de participar en la investigación.



PARROQUIAS	X	y
San Antonio	597522	9923946
San Antonio	595999	9922355.
Boyacá	600670	9933633
Ricaurte	601492	99330915
Canuto	597704	9917252
Canuto	605977	9910464

Fig. 2 Ubicación geográfica según las coordenadas de los predios seleccionados para la investigación de la presencia del virus de la lengua azul

2.1.2. Extracción de sangre en los bovinos

Se introduce el vacutainer con la aguja en la yugular del ternero, una vez localizada la vena se coloca el tubo rojo y tubo lila en el vacutainer para conseguir la sangre con anticoagulante (tubo lila) y sin anticoagulante para obtención del suero sanguíneo (tubo rojo).

2.1.3. Obtención del suero

La sangre sin anticoagulante se dejó a temperatura ambiente para la retracción del coágulo. Se centrifugó a 4000 rpm durante, 5 min y se extrajo el suero con una micropipeta de 200 µL; el suero extraído se colocó en un microtubo y se envió refrigerado al laboratorio de AGROCALIDAD Tumbaco para la determinación de anticuerpos a VLA.

2.1.4. Determinación de anticuerpos a VLA

Todas las muestras de sueros se analizaron mediante un ensayo de ELISA de competición para la determinación de Anticuerpos específicos a VLA (VMRD, SA)

2.1.5. Análisis de los datos del estudio epidemiológico de corte transversal realizado por AGROCALIDAD

La base de datos de la encuesta epidemiológica de AGROCALIDAD referentes a las parroquias en estudio fueron enviadas por AGROCALIDAD. La encuesta contenía 49 preguntas, pero se procesaron solo 9 preguntas que estaban relacionadas con los factores de riesgo de lengua azul (Ver tabla 4 del epígrafe 3. 1)

Se determinó el porcentaje de respuestas afirmativas a cada una de las preguntas y se elaboró una tabla resumen y gráficos de barra

2.1.6. Estudio serológico de corte transversal en los predios seleccionados

Se realizó el cálculo del tamaño muestral asumiendo una prevalencia esperada del 98%, un error del 10% y un nivel de significancia del 95%, utilizando la fórmula establecida por Thrusfield y et al 2018).

$$n = \frac{1.96^2 P_{\text{exp}} (1 - P_{\text{exp}})}{d^2};$$

Se determinó que el número de muestras a tomar para un estimado de la prevalencia era de 7.5

Se propuso realizar extracciones de sangre a 10 terneros de cada predio seleccionado para la determinación de anticuerpos a VLA por ELISA y calcular la tasa de examinados positivos: No. de reactores/ No. total de muestras examinadas.

2.1.7. Diseño del estudio longitudinal con terneros centinelas

El estudio longitudinal consistió en colocar 1 o 2 terneros serológicamente negativos a VLA en cada predio seleccionado, para observar si los animales se infectaban al llegar al predio. Como evidencia de infección se utilizó la presencia de VLA en la sangre de estos animales susceptibles, por PCR y la seroconversión por ELISA. Para lograr este objetivo se realizaron muestreos semanales de los centinelas hasta que apareciera la viremia y la seroconversión en todos los terneros (6 a 8 semanas).

Debido a la poca disponibilidad de terneros centinela machos serológicamente negativos a VLA y a la larga distancia entre los predios, que dificultaba los muestreos, se realizaron dos experimentos espaciados temporalmente. El primer experimento se realizó del 26 de febrero al 5 de marzo del 2019 con tres terneros, uno para cada uno de tres predios (Tabla 1) y el 2do experimento del 13 de junio al 23 julio de 2019 con 5 terneros distribuidos entre otros tres predios (Tabla 2).

Tabla 1. Distribución de los terneros del grupo 1 en los predios

N° Ternero	Propietario	Nombre del predio	Cantón	Parroquia	Alimentación
130212138	Walter Vivas	San Fernando	Chone	Canuto	artificial
130212145	Euclides De La Torre	Don Pocho	Chone	Canuto	nodriza
130212139	UTM	Facultad de Zootecnia	Chone	San Antonio	artificial

Fuente: Investigadores.

Tabla 2. Distribución de los terneros del grupo 2 en los predios.

N° Ternero	Propietario	Nombre del predio	Cantón	Parroquia	Alimentación
223868	Carlos Solórzano	La Pradera	Chone	San Antonio	nodriza
223869	Carlos Solórzano	La Pradera	Chone	San Antonio	nodriza
38591	Mario Zambrano	La María	Chone	Ricaurte	nodriza
38592	Mario Zambrano	La María	Chone	Ricaurte	nodriza
223874	Olga Cedeño	La Argentina	Chone	Boyacá	artificial

Fuente: Investigadores.

2.1.8. Terneros centinelas

Fueron adquiridos 11 terneros machos de raza Holstein, recién nacidos que habían tomado calostro y leche de la madre en su lugar de nacimiento. Procedían de 2 predios de Machachi, es decir del clima Sierra, donde no habitan los culicoides. Había evidencias serológicas anteriores de que en esa zona no hay seroreactores a VLA (AGROCALIDAD, datos no publicados).

Los terneros fueron adquiridos en 2 grupos de 6 y 5 terneros, respectivamente. La edad de los seis terneros del primer grupo era de 5-8 días y de 7-10 días los del segundo grupo. Cada ternero era identificado con un arete en cuanto llegaban al predio, para así llevar un registro de cada animal.

La alimentación de los centinelas, después de llegar al predio consistió en algunos casos leche de una vaca nodriza y en otros casos se preparaba leche en polvo y concentrado que llamaremos artificial en las Tablas 1 y 2.

Hay que destacar que en el primer grupo de terneros murieron tres enseguida en los primeros días después de su llegada a los predios debido al estrés del viaje y el cambio de alimentación.

2.1.9. Muestreo pre-inicial

Para asegurar que los terneros no eran seroreactores a VLA, se les realizó una extracción de sangre sin anticoagulante, antes de su adquisición y traslado a Chone; una vez extraído el suero, siguiendo la metodología referida en 1.2.4, se envió a AGROCALIDAD Tumbaco, para el análisis de anticuerpos al VLA por ELISA.

2.1.10. Muestras de sangre

Se realizaron extracciones de sangre tomando un tubo con anticoagulante y otro sin anticoagulante cada 7 días, durante 6-8 semanas, utilizando la metodología referida en 2.1.2 y 2.1.3

2.1.11. Determinación de la presencia de VLA en la sangre con anticoagulante mediante RT PCR.

En todos los casos muestras de sangre con anticoagulante se enviaron refrigeradas al laboratorio de AGROCALIDAD de Tumbaco, el mismo día de la extracción donde se las almacenaba a -80°C en un ultra congelador BIOBASE hasta el momento de su análisis.

Se realizó la purificación de ARN totales de cada muestra y posteriormente se analizaron por PCR con retro transcripción (RT-PCR) para detectar la presencia de ARN de VLA.

Se analizaron por RT- PCR las muestras correspondientes a los muestreos anteriores a la seroconversión por ELISA (anteriores al primer muestreo con ELISA positivo) y no se realizaba la RT-PCR después que se constataba uno o 2 resultados de PCR positivos en cada ternero.

Para la purificación del ARN se empleó “High Pure RNA Purification kit” (Roche). Posteriormente se obtuvo el ADN complementario mediante una reacción de Reverso transcripción utilizando la Enzima RT MLV (Promega). El ADN-complementario obtenido se utilizó de molde en la PCR anidada con las parejas de primers BTV-A, BTV-B, BTV-C, BTV-D (OIE, 2014) y el kit de PCR green Flexi (PROMEGA). Los productos de las dos PCR fueron corridos en una electroforesis de Agarosa teñida con SyberSafe utilizando un patrón de PM 100Kb. Como Control positivo se utilizó ARN extraído de una cepa de referencia de VLA-2 (ATCC). La talla esperada del fragmento final de la segunda reacción de PCR era de 100 pb (Katz *et al.*, 1993).

Tabla 4. Cronograma (Ver en anexos)

RESULTADOS

3.1. Evaluación de la presencia de factores de riesgo a lengua azul mediante el Análisis de las encuestas

Para la caracterización de las Unidades de Producción Agropecuarias (UPA) investigadas en la encuesta de AGROCALIDAD se resumieron los datos del número de UPA por parroquia, el rango, la media y el total del número de bovinos por UPA y el área media de las UPA Tabla 3.

El sistema de producción que se aplica en todos los cantones es extensivo, por lo que es complejo el control de vectores.

Tabla No 3 Población bovina y Área de las Unidades de Producción Agropecuaria de las parroquias de Chone encuestados por AGROCALIDAD durante el último trimestre de 2018

Parroquias	San Antonio	Boyacá	Ricaurte	Canuto
N° de UPAs	64	100	65	88
Rango del N°.de bovinos/UPA	9-374	5-502	1-442	7-248
Media de del N°.de bovinos/UPA	62.57	53.37	53.37	42.2
Total de bovinos	4064	5100	3730	3715
Área media de las UPA (Ha)	91.98	75.12	81.08	61,63 Ha.

La pregunta N° 1 de la encuesta estaba relacionada con el clima que prevalece en las UPAs. En la Fig. No 3 observamos que tres de las parroquias concuerdan con el 100% de los predios con el clima húmedo tropical y seco que son Ricaurte, Boyacá y San Antonio mientras que el clima húmedo tropical en la parroquia Canuto es de 1.14% y el clima seco no se encuentra en ninguna parroquia.

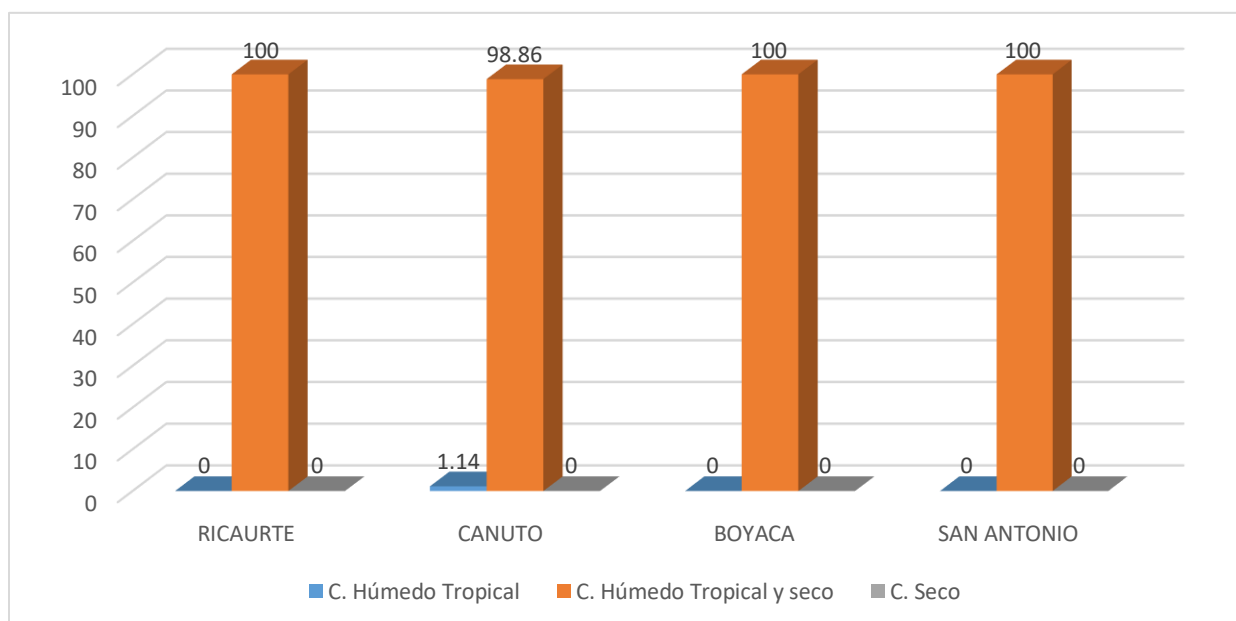


Figura 3. Clima que prevalece generalmente en las UPAs

En la Fig No 4 se analiza el resultado de las respuestas a la pregunta N° 2 de la encuesta: dos parroquias (Ricaurte y Canuto) tienen un mayor consumo de agua mediante pozo, mientras que la parroquia Boyacá su consumo de agua es de tapes en esteros y la parroquia San Antonio sus habitantes tienen consumo de agua por albarradas.

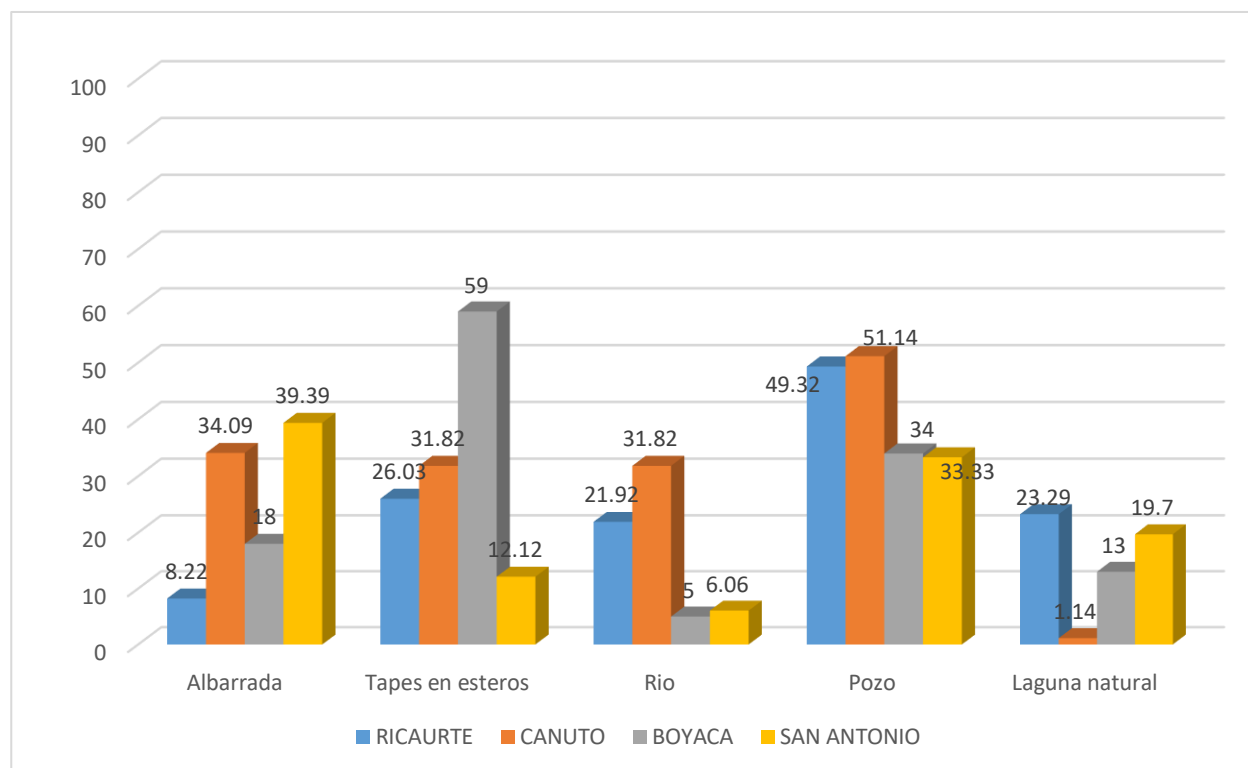


Figura 4. De donde provee agua para el consumo de su ganadería

Según la Fig. No 5 donde se grafica la proporción de respuestas positivas a la pregunta N° 3 de la encuesta todos los encuestados de las cuatro parroquias concuerdan con un 100% que existe la presencia de mosquitos en las inmediaciones donde descansa o pasa el ganado.

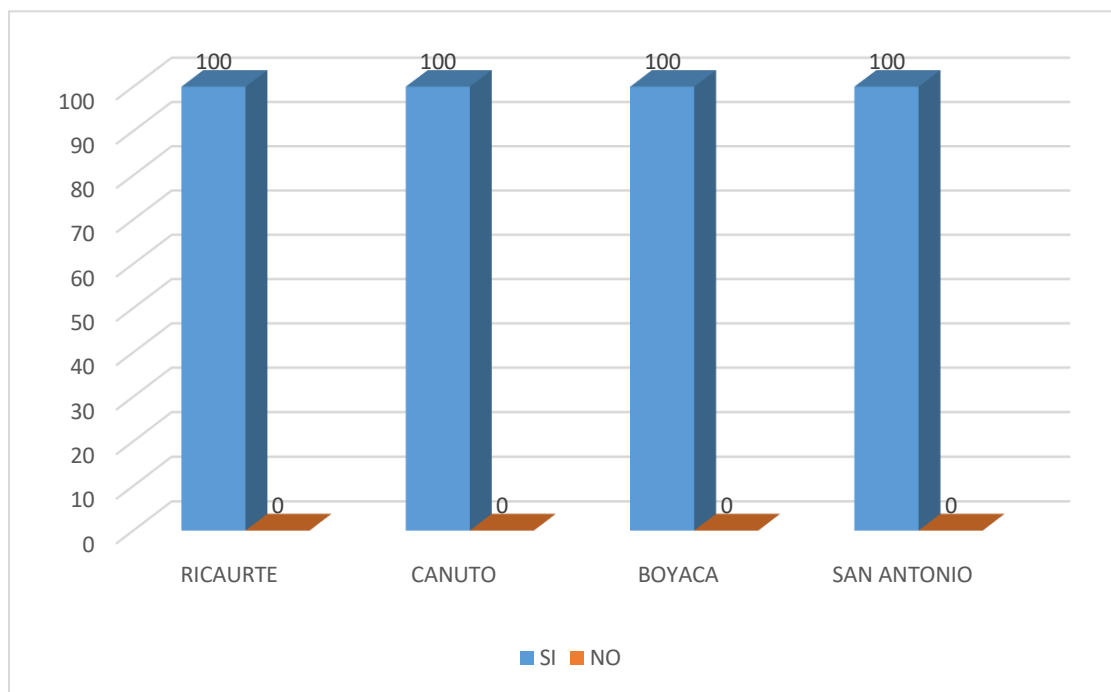


Figura 5. Presencia de mosquitos en las inmediaciones donde descansa o pasta el ganado

En la pregunta N° 4 de la encuesta se consultó en que trimestre del año es más evidente la presencia del mosquito, en la cual los encuestados de tres parroquias Ricaurte, Canuto y Boyacá coinciden con un 100% y la parroquia San Antonio con un 66% de que entre el primer y segundo trimestre es más evidente la presencia del mosquito en las zonas.

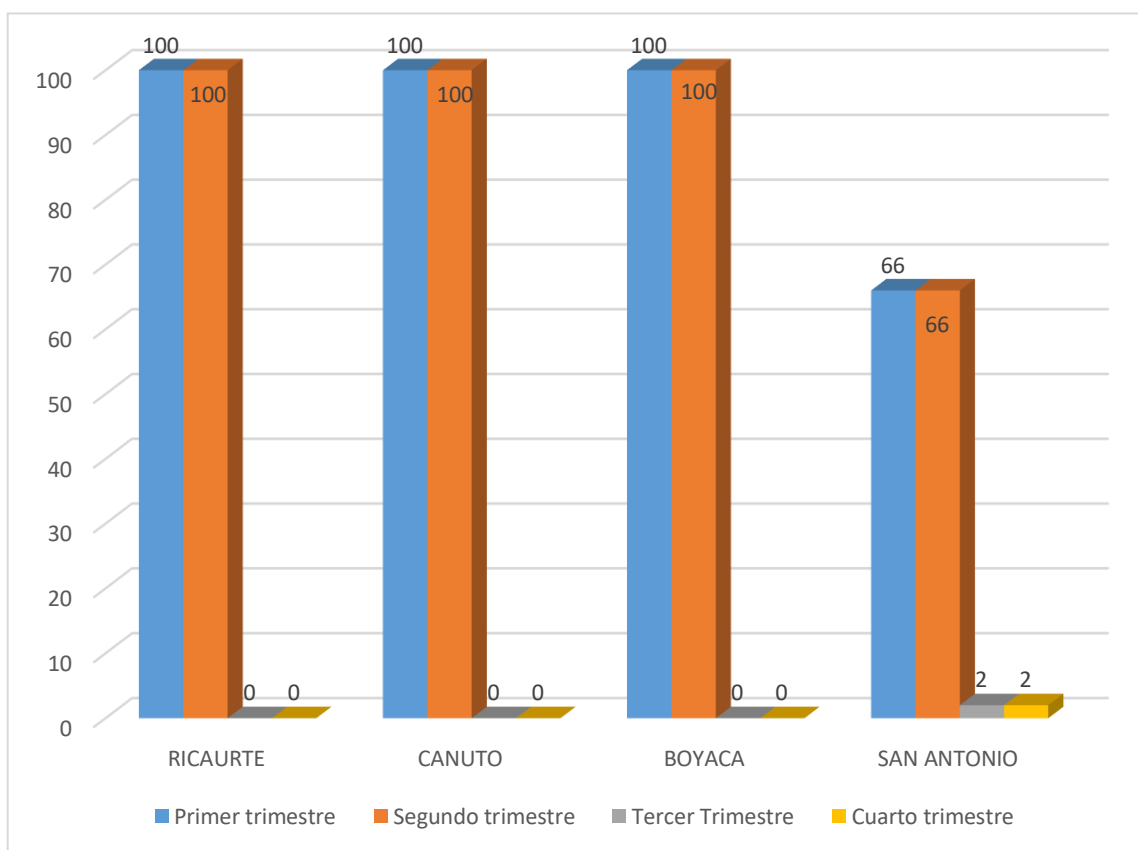


Figura 6. Trimestre del año la presencia de mosquito es más evidente

La proporción de respuestas positivas a la pregunta N° 5 de la encuesta se pueden observar en la Fig No 7. De acuerdo a los resultados, en la parroquia Ricaurte el 90.41% dice que en los últimos 8 meses han tenido presencia de infecciones en su ganado, mientras que el 9.59% no han tenido ninguna infección, mientras que en la parroquia Canuto el 83% han tenido infección y el 5% no, en la parroquia Boyacá el 96% sí presentaron infecciones y un 4% no, en la parroquia San Antonio el 33% no presenta infecciones en el ganado.

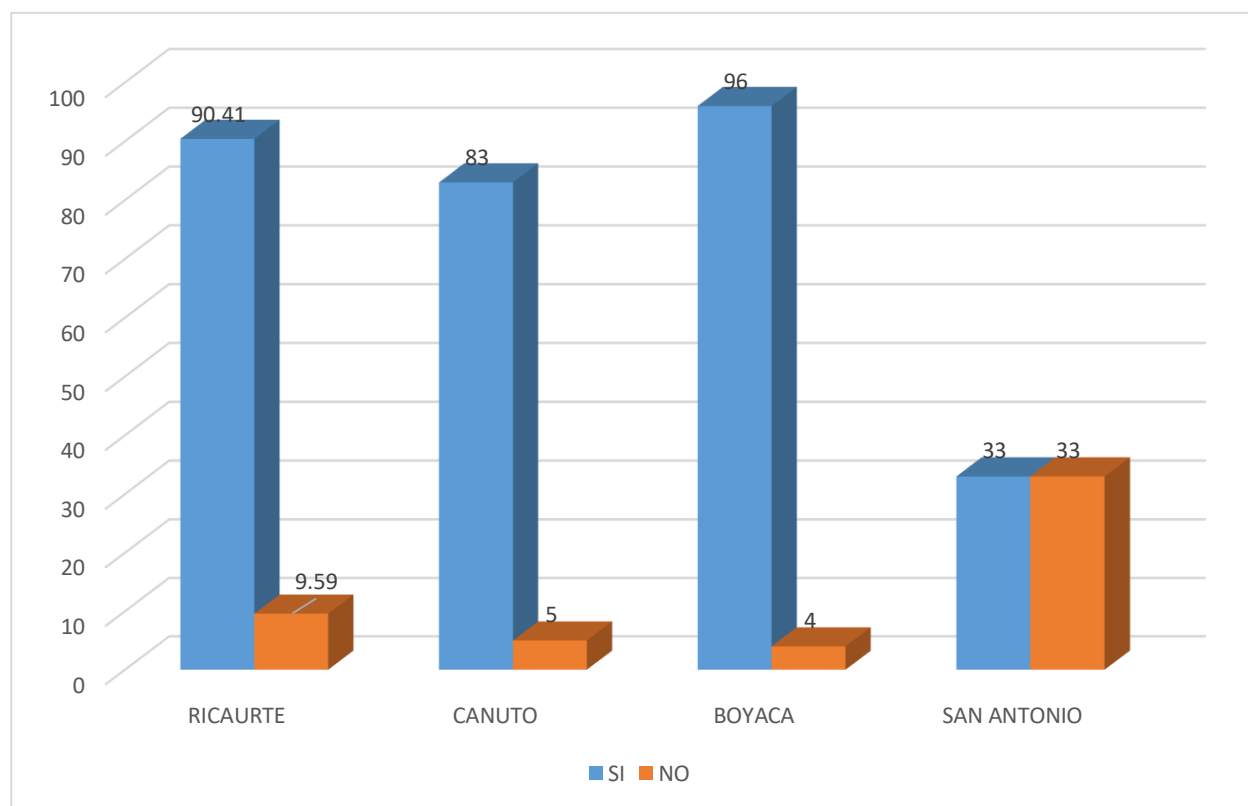


Figura 7. Los últimos 8 meses ha tenido presencia de infecciones en su ganado.

En la pregunta N° 6 de la encuesta todos los encuestados de las cuatro parroquias concuerdan en su mayoría que existe un desconocimiento de la causa de los decesos de su ganado. Mientras que el 1.37% en Ricaurte, el 1.14% en Canuto, 13,64% en San Antonio dicen que conocen la causa del deceso de su ganado.

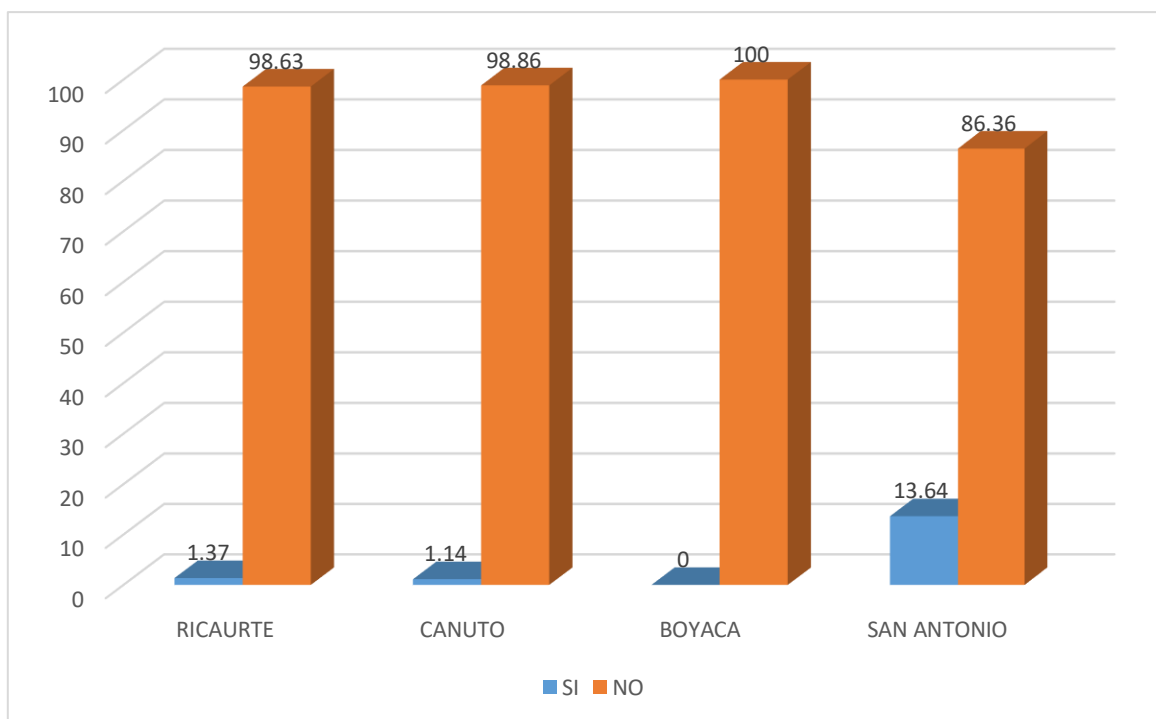


Figura 8. Ha conocido las causas del deceso

En la pregunta N° 7 de la encuesta se solicita información sobre la muerte de bovinos en los asentamientos (Fig 9), en la cual es muy frecuente las muertes de bovinos en las parroquias de Ricaurte, Canuto y Boyacá, mientras que en la parroquia de San Antonio con un 80,3% se muere un bovino y un 19,70% nunca ha fallecido uno.

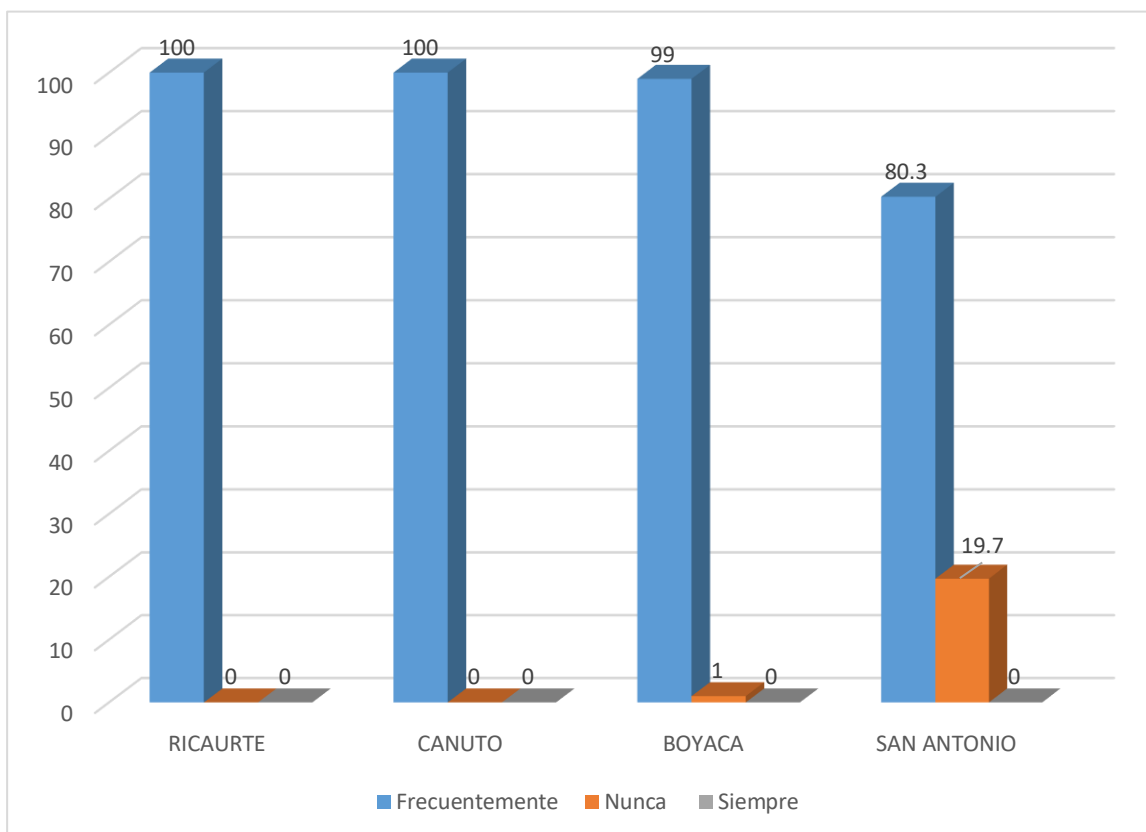


Figura 9. Se ha muerto algún bovino, en su asentamiento (UPA)

En la pregunta N° 8 de la encuesta (Fig.10), todos los encuestados en las cuatro parroquias concuerdan que la principal enfermedad que ha afectado a su ganado es la Anaplasmosis bovina con un 97,26% en Ricaurte, 98,86% en Canuto, 99% en Boyacá y con un 83,33% en San Antonio respectivamente.

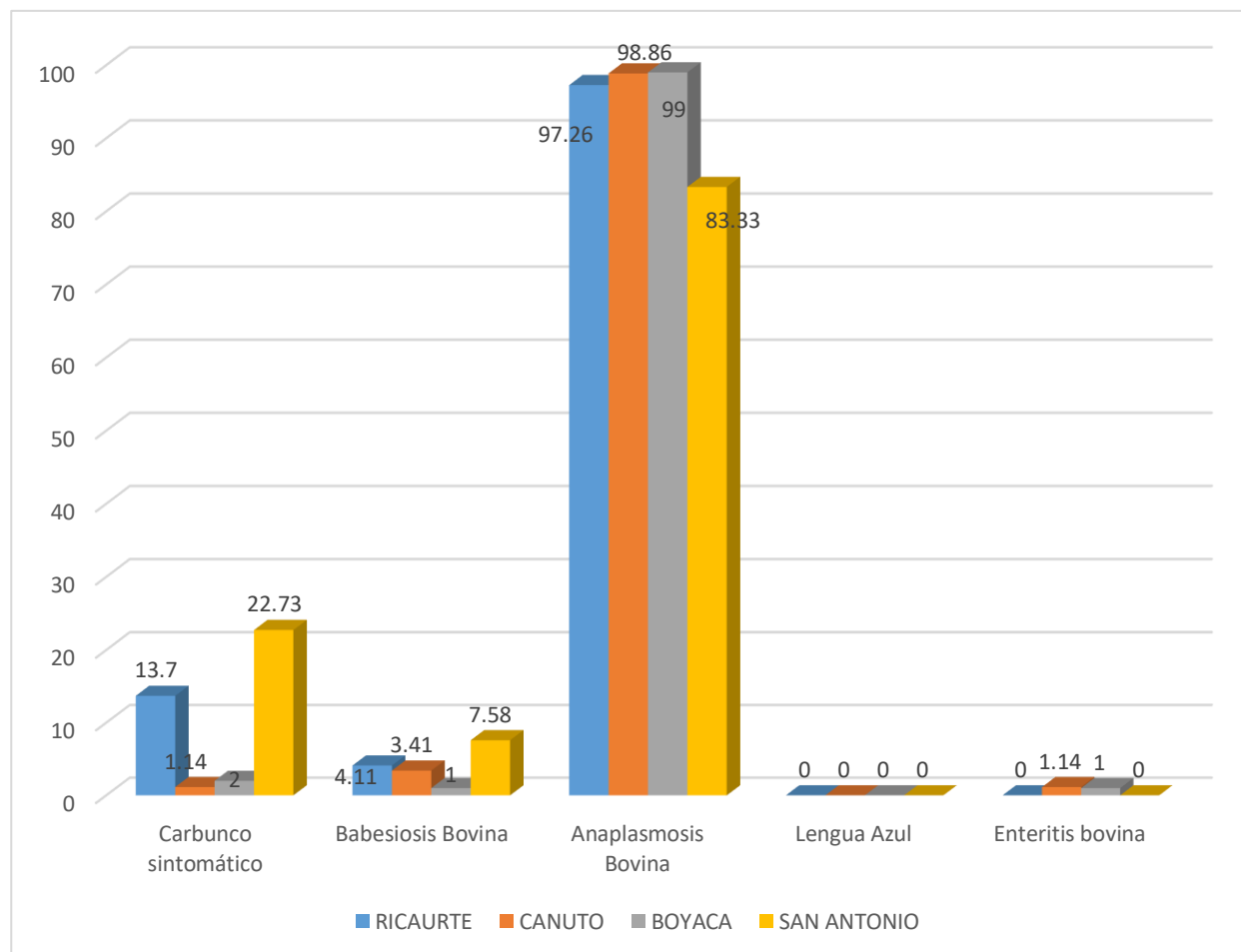


Figura 10. Cuál es la principal enfermedad que ha afectado a su ganado

En la pregunta N° 9 de la encuesta (Fig. 11) la mayoría de los encuestados de las cuatro parroquias dicen no conocer el virus de lengua azul.

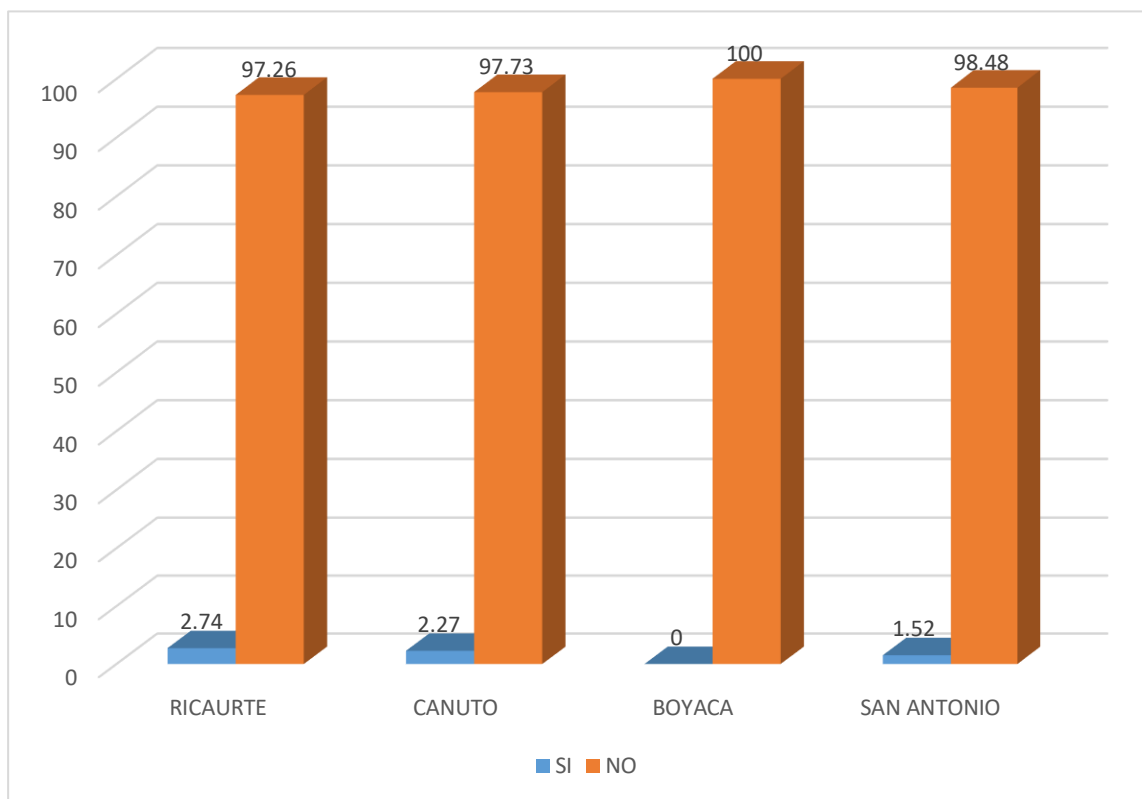


Figura 11. Conoce que es el virus de lengua azul

Tabla N° 4. Resumen del resultado del procesamiento de los datos de la encuesta epidemiológica realizada por AGROCALIDAD de Manabí, en las parroquias del cantón Chone

Factor de riesgo		Parroquias			
		RICAURTE	CANUTO	BOYACA	SAN ANTONIO
N° de predios encuestados		74	86	100	64
Clima que prevalece generalmente en las UPAs	C. Húmedo Tropical	0	1,14	0	0
	C. Húmedo Tropical y seco	100	98,86	100	100
	C. Seco	0	0	0	0
De donde provee agua para el consumo de su ganadería	Albarrada	8,22	34,09	18	39,39
	Tapes en esteros	26,03	31,82	59	12,12
	Rio	21,92	31,82	5	6,06
	Pozo	49,32	51,14	34	33,33
	Laguna natural	23,29	1,14	13	19,7
Presencia de mosquitos en las inmediaciones donde descansa o pasta el ganado	SI	100	100	100	100
	NO	0	0	0	0
Trimestre del año la presencia de mosquito es más evidente	Primer trimestre	100	100	100	66
	Segundo trimestre	100	100	100	66
	Tercer Trimestre	0	0	0	2
	Cuarto trimestre	0	0	0	2
Los últimos 8 meses ha tenido presencia de infecciones en su ganado.	SI	90,41	83	96	33
	NO	9,59	5	4	33
Ha conocido las causas del deceso:	SI	1,37	1,14	0	13,64
	NO	98,63	98,86	100	86,36
Se ha muerto algún bovino, en su asentamiento (UPA)	Frecuentemente	100	100	99	80,3
	Nunca	0	0	1	19,7
	Siempre	0	0	0	0
	Carbunco sintomático	13,7	1,14	2	22,73

Cuál es la principal enfermedad que ha afectado a su ganado	Babesiosis Bovina	4,11	3,41	1	7,58
	Anaplasmosis Bovina	97,26	98,86	99	83,33
	Lengua Azul	0	0	0	0
	Enteritis bovina	0	1,14	1	0
Conoce que es el virus de lengua azul	SI	2,74	2,27	0	1,52
	NO	97,26	97,73	100	98,48

3.2. Resultado del estudio serológico de corte transversal

En la Tabla 5 podemos observar que todos los animales en cinco de los 6 predios resultaron positivos a ELISA de VLA, solo un ternero de la finca Don Pocho resultó negativo y éste era de reciente adquisición. No se obtuvo el resultado de las 10 muestras tomadas en la finca Don Pocho y de la UTM por rotura de los tubos.

Tabla N° 5. Número de bovinos seroreactores al virus de la lengua azul en terneros de los predios de Chone encuestados.

Propietario	Nombre del predio	N° muestras analizadas	N° de seroreactores
Walter Vivas	Rancho El Trébol	10	10
Euclides De La Torre	Don Pocho	9	8
UTM	Facultad de Zootecnia	6	6
Carlos Solórzano	La Pradera	10	10
Mario Zambrano	La María	10	10
Olga Cedeño	La Argentina	10	10
	Total	55	54

Según se puede observar en la tabla No 5, el 98.18% (54 de 55 bovinos) presentaban anticuerpos a VLA, según fue determinado por ELISA.

3.3. Estudio longitudinal en terneros centinela

3.3.1. Descripción de los resultados del Primer Grupo

La dinámica por semanas de los animales virémicos (terneros positivos en la PCR) y de los animales que seroconvirtieron (Terneros seroreactores por ELISA) del primer experimento se puede observar en la Tabla 6.

La viremia no comenzó al mismo tiempo en todos los predios. El ternero de la hacienda El Trébol comenzó la viremia en la quinta semana, mientras que el de la hacienda Don Pocho comenzó en la tercera semana. El que más se demoró en mostrar virus en sangre, fue el de la Facultad de Zootecnia de la UTM (FZT-UTM), que lo hizo en la 6ta sem.

En cuanto a la semana que apareció la seroconversión también fue variable. En el Trébol el primer muestreo seroreactor fue en la 8va sem, mientras que se observó en la 4ta semana en el predio Don Pocho y en la 7ma semana en la FZT-UTM.

En todos los casos los animales seroconvirtieron después de haber mostrado virus en sangre

Tabla N° 6. Resultados de la determinación de anticuerpos al Virus de la lengua azul (VLA) por ELISA y de la presencia del VLA en sangre por RT-PCR del primer grupo de terneros centinelas.

semanas	Parroquia	Canuto		Canuto		San Antonio	
	Lugar	EL TREBOL		DON POCHO		FZT-UTM	
	Ternero No	130212138		130212145		130212139	
	Fecha	PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA
1	5 / 03 / 2019	NR	NEG	NR	NEG	NR	NEG
2	12 / 03 / 2019	NEG	NEG	NR	NEG	NR	NEG
3	19 / 03 / 2019	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
4	26 / 03 / 2019	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
5	3 / 04 / 2019	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
6	9 / 04 / 2019	POS	NEG	NEG	NR	POS	NEG
7	16 / 04 / 2019	NEG	NR	NR	NR	NEG	POS
8	6 / 05 / 2019	POS	POS	NR	NR	NR	NR

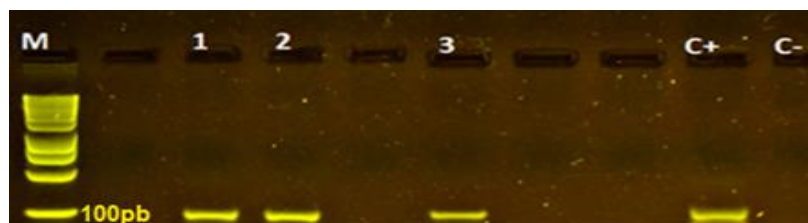


Fig. 12. Electroforesis de los productos de PCR del virus de la lengua azul del primer grupo de terneros

M= Marcador de peso molecular 1kb; 1=1302145 (19/03/2019); 2=1302145 (26/03/2019); 3=1302139 (09/04/2019); C+= Cepa de referencia BTV-2; C- = Agua

En la Figura 12 se puede observar la especificidad de la reacción de PCR ya que el producto de PCR obtenido en la primera muestra positiva de cada ternero se corresponde con los 100 pb del marcador de peso molecular y el control positivo que es una cepa de referencia de VLA serotipo 2

3.3.2. Descripción de los resultados del Segundo Grupo

Los terneros centinelas del segundo grupo se comenzaron a muestrear en la 2da semana posterior a su llegada (el día 25 de junio de 2019), pues según los resultados del primer experimento hasta la tercera semana no comenzaba la viremia.

Los resultados de la RT-PCR y el ELISA de anticuerpos a VLA de todos los muestreos de este grupo se encuentran en la tabla 7 y en la fig. 13 que corresponde con la electroforesis de los productos de RT PCR de las muestras de cada ternero ubicadas en el gel de forma secuencial por fechas.

Como en el primer grupo, la viremia no comenzó al mismo tiempo en todos los terneros. En el ternero 223869 de la hacienda La Pradera, se evidenció la viremia en la segunda semana de su llegada al predio. Sin embargo, el otro ternero de esa hacienda (ternero No.223868) resultó

virémico en la 5ta semana. Los dos terneros de La María fueron positivos por PCR en la 3ra semana y el ternero de La Argentina (No. 223874) resultó positivo por PCR en la 5ta semana.

En cuanto a los resultados del ELISA, un ternero de La María seroconvirtió en la 3ra semana, mientras que en todos los demás terneros la seroconversión se constató en la 5ta semana

Tabla No. 7. Resultados de la determinación de anticuerpos al Virus de la lengua azul (VLA) por ELISA y de la presencia del ARN del VLA en la sangre por RT PCR del segundo grupo de terneros centinelas

	PARROQUIA	San Antonio				Ricaurte				Boyacá	
	PREDIO	La Pradera				La María				La Argentina	
	No Ternero	223868		223869		38591		38592		223874	
Sem.	Fecha	PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA
2	25/6/2019	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
3	3/7/2019	NEG	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
4	9/7/2019	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
5	15/7/2019	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
6	23/7/2019	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS

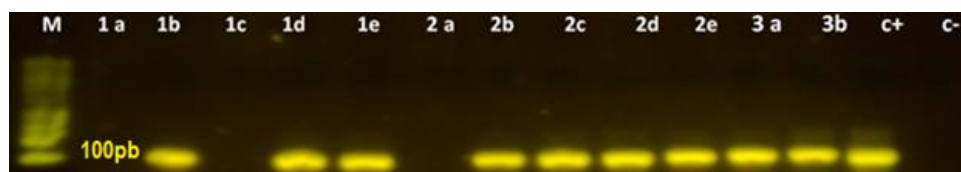


Fig. 13. Electroforesis de los productos de la PCR del virus de la lengua azul de tres de los terneros del segundo grupo en las muestras de cuatro días diferentes, (Excepto el ternero No. 223869, que se muestra el resultado de dos muestreos)

M= Marcador de peso molecular 1kb; 1=38591; 2=38592; 3=223869

a=25/6/2019; b=3/7/2019; c= 9/7/2019; d=15/7/2019; e= 23/7/2019; C+= Cepa de referencia BTV-2; C- = Agua

La RT- PCR se realizó a todas las muestras de cada muestreo. En la Fig. 13 se pueden observar los productos de la PCR de cuatro muestreos de los terneros No. 38591 y No. 38592 y dos muestreos del ternero No. 223869, colocados en el gel de forma secuencial como ya se mencionó arriba. Se puede observar la especificidad de la reacción, ya que en este segundo experimento. Al igual que en el primer experimento, el producto de la PCR correspondió a la talla esperada y al Control positivo de la cepa de referencia utilizada.

DISCUSIÓN

La investigación tuvo como objetivo determinar la presencia del Virus de la lengua azul en bovinos de predios con elevada mortalidad del cantón Chone de la provincia de Manabí

En primer lugar, se procesaron los datos relacionados con lengua azul de una encuesta epidemiológica realizada por AGROCALIDAD de Manabí para poner en evidencia la presencia de factores de riesgo a lengua azul.

Del análisis de las encuestas inferimos que el clima predominante en las parroquias en estudio es el primer trimestre del año, esto es debido a las temporadas lluviosa y seca, que en el primer caso se caracteriza por alta precipitaciones y en el segundo por bajas precipitaciones y soles frecuentes. Este clima tropical húmedo podemos acotarlo como un factor de riesgo ya que se ha establecido que es favorable para la presencia de los culicoides, pues ellos se establecen en las zonas de clima subtropical y tropical húmedo.

La principal fuente de agua en Ricaurte (49,32%) y Canuto (51,14%) son los pozos, por lo que el agua estancada no sería un factor de riesgo en estas dos parroquias; en cambio en San Antonio, y Boyacá prevalecen como fuente principal de agua, las albarradas y los esteros, respectivamente. La presencia de agua estancada constituye un factor de riesgo en estas parroquias. El agua

depositada favorece la puesta de huevos de la hembra del culicoides que es la que con su picada para chupar sangre transmite el VLA de un animal a otro.

Según los datos suministrados por la estación meteorológica de la PUCE de Chone del primer semestre de 2019 (Ver tabla I de Anexos), el pico de lluvia en el 2019, ocurrió en febrero y marzo y fue disminuyendo hasta 44 mm en Chone y 43 mm en Calceta en julio.

El estudio desarrollado en Venezuela por Pérez, *et al*, (1995) con una prevalencia de 62,57% de Positivos para anticuerpos de VLA en 1534 sueros, describe las áreas de ese estudio con características medio ambientales (temperatura de $28.4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; precipitaciones de 949 a 1095 mm) similares a las descritas en el presente estudio.

Luego podemos concluir que las condiciones de lluvia y temperatura de esta zona son favorecedoras para la presencia del culicoides descritas por (Navarro *et al*, 2017).

Según datos del (INEC, 2018) en Manabí se murieron 13131 reses en el año 2018, sin señalar la causa. Se evidenció en las encuestas que el 86,36% de los encuestado de la parroquia de San Antonio y alrededor del 75% de Boyacá, Ricaurte y Canuto, desconocían la causa de la muerte de sus animales y los restantes decían que era Anaplasmosis, pero sin un diagnóstico de laboratorio. En cuanto a la pregunta de si conocen la enfermedad lengua azul, el 96,35% de los encuestados desconoce esta enfermedad. Esto se puede explicar porque, aunque lengua azul produce una alta mortalidad en ovinos, en los bovinos la enfermedad puede transcurrir de forma subclínica (Saegerman *et al*, 2008). La viremia puede ocurrir con síntomas leves que pasan inadvertidos y su intensidad depende mucho del serotipo y los que han generado mayor mortalidad en bovinos son 2, 4, 5 y 6 (Vega *et al*, 2005).

El desconocimiento de las causas de las muertes de bovinos es un factor de riesgo, pues denota el bajo nivel de diagnóstico en los predios, que es un problema señalado anteriormente en los países de América Latina (Vargas *et al*, 2012)

La presencia del vector durante el primer trimestre del año fue reconocida por el 100% de los predios encuestado y constituye el factor de riesgo principal, ya que sin el vector no hay transmisión del virus, pues ésta es la vía principal vía de transmisión (Legisa *et al*, 2014).

En el estudio de corte transversal realizado en los predios seleccionados, se obtuvo un 98.2 % (54/55) de bovinos seroreactores al VLA, esto nos habla de una amplia circulación del virus entre los bovinos de estos predios. Seroprevalencia tan altas han sido reportadas en Cuba con un 99.1% (Martínez *et al*, 2011), en Puerto Rico e Islas Vírgenes cerca de 80% (Metcalf *et al*. (1981, Citado por Legisa 2014) y 84% en Guyana francesa (Virrouge *et al* 2014), países que tienen climas similares a la época de lluvia en Manabí, se reporta la presencia del vector culicoides y no se han tomado medidas de control de la enfermedad, lo que explica la alta proporción de seroreactores.

El primer dato de seroprevalencia a VLA en bovinos de Ecuador, fue de 10,3% (López *et al*, 1985). Luego, ha aumentado en gran medida la incidencia de la enfermedad. La distribución de VLA a nivel global ha cambiado drásticamente en las últimas décadas, pues desde 1998 está incursionando también en Europa mediterránea y norte (Rojas *et al.*, 2019) Se ha atribuido esto al incremento de la temperatura por efecto invernadero y la ampliación de la faja subtropical lo que favorece la presencia de los culicoides. Las hembras necesitan chupar sangre para poner sus huevos y el bovino, si bien no es la especie donde el VLA produce signos clínicos graves, que conducen a una alta letalidad, sí es la especie que más influye en la transmisión pues la presencia de virus

infectivo puede durar hasta 24 días, incluso se ha visto que las hembras culicoides prefieren la sangre del bovino (MacLachlan, 1994).

El desarrollo de la ganadería en Manabí ha hecho que se incremente en número de cabezas de ganado, fundamentalmente en Chone pues de los 4'190,611 de cabezas de ganado en Ecuador, la región litoral tiene el 42,32% (INEC, 2018) y Chone es el cantón manabita con el mayor hato ganadero del Ecuador, representando el 7,16%. Luego, este cantón tiene todas las condiciones para que se haya incrementado la presencia de infecciones por VLA.

Finalmente, el estudio epidemiológico activo que se realizó en los seis predios seleccionados mediante el ingreso de terneros centinela en dichos predios, permitió demostrar que existen infecciones activas en estos predios. Aunque no era objetivo del experimento demostrar la presencia de culicoides hembras cargadas de virus, indirectamente fue demostrado, pues cuando bovinos susceptibles se colocaron en estas fincas, se produjo la infección de estos animales demostrada por la aparición de la viremia y la seroconversión.

La viremia resultó intermitente, algunos terneros tuvieron un resultado positivo de PCR, seguido de uno negativo y luego otro positivo, pero en otros casos después de 2 resultados de PCR positivos, el siguiente muestreo era negativo. En la patogénesis del virus en la especie bovina, el virus primero se multiplica en los ganglios regionales y de ahí pasa a la sangre donde se multiplica en todas las células sanguíneas, pero después se une a los eritrocitos donde permanece por 24 días (Arenas, 2012) es por eso que la viremia es variable en intensidad y duración y está en dependencia de factores como la edad, la raza y la virulencia de la cepa (MacLachlan, *et al*, 2009).

En cuanto a la seroconversión en casi todos los casos fue posterior a la viremia y había muestras de sangre con PCR positivo y ELISA positivo o sea puede coexistir el virus con los anticuerpos,

lo que sucede es que el ELISA mide todos los anticuerpos generados contra cualquier antígeno viral, neutralizantes o no. Solo aquellos anticuerpos neutralizantes son capaces de eliminar el virus efectivamente. Por otra parte, se ha descrito que pueden generarse infecciones contra 2 serotipos diferentes y los anticuerpos generados contra un serotipo no inhiben la replicación de otro serotipo (Arenas, 2012).

No era objetivo de esta investigación estudiar la sintomatología clínica de las cepas de VLA que circulan en estos predios, pero en las visitas realizadas no se observaron signos clínicos evidentes, en algunos casos los terneros murieron después de terminado el experimento o quedaron con crecimiento retardado. Después de demostrada la presencia de infecciones de lengua azul activas en estos predios y la de factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad. Es una necesidad determinar el o los serotipos que circulan en cada región pues existe una alta variabilidad en los serotipos de diferentes zonas geográficas y este dato es imprescindible para implementar un plan de vacunación, pues la vacuna es eficaz si está elaborada con cepas del mismo serotipo circulante. Según los resultados de Verdezotto *et al.*, (1916) los virus aislados en Santo Domingo y Tandapi eran de los serotipos 3 y 9, pero pueden ser otro el serotipo circulante en Manabí.

Por tanto, se debe realizar el aislamiento del virus y la posterior caracterización molecular del gen de la VP2, para determinar el serotipo de la o las cepas circulantes y también la caracterización de la virulencia en bovinos. Se ha demostrado la presencia de infecciones activas de VLA desarrollar un plan de control que incluya la divulgación de los resultados, la capacitación de los ganaderos, la implementación de medidas preventivas en las zonas de riesgo. Para implementar el programa de control de esta enfermedad a nivel nacional se debe realizar una encuesta serológica en las provincias cuyas condiciones climáticas favorezcan el ciclo de vida del vector.

CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de factores de riesgo de lengua azul en predios de las parroquias San Antonio, Boyacá, Canuto y Ricaurte del Cantón Chone, principalmente la existencia del vector Culicoides, y el desconocimiento de la enfermedad que tienen los ganaderos de estas parroquias.
- Se demostró la presencia de infecciones activas y la amplia circulación del virus lengua azul en los seis predios de Chone estudiados, con una tasa de examinados positivos de 98.2%.

RECOMENDACIONES

- Realizar el aislamiento viral a partir de las muestras de sangre colectadas, para estudios posteriores de genotipificación y de la virulencia
- Continuar este estudio en otros cantones de la provincia y en otras provincias con temperaturas y humedad que favorezcan la presencia del vector
- Incluir en el estudio las especies del género Culicoides implicada en la transmisión del VLA en Ecuador
- Recomendar a AGROCALIDAD la utilización de la metodología de la centinelización para los estudios epidemiológicos posteriores en otras provincias de Ecuador y mantener una vigilancia epidemiológica de esta enfermedad anual.

ANEXOS

ENTREGA DE CABINA DE SEGURIDAD BIOBASE AL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS (LODANA)



PROCEDIENDO A REALIZAR EL PRIMER MUESTREO CON LA AYUDA DE UN FUNCIONARIO DE AGROCALIDAD EN LA PROVINCIA DE PICHINCHA-CANTÓN MEJÍA EN LA CIUDAD DE MACHACHI.



MATERIALES DE CAMPO Y DE LABORATORIO



27 DE FEBRERO, LLEGADA DE LOS 6 TERNEROS Y ALIMENTO:
LECHE LAPTOREEMPLAZANTE Y BALANCEADO

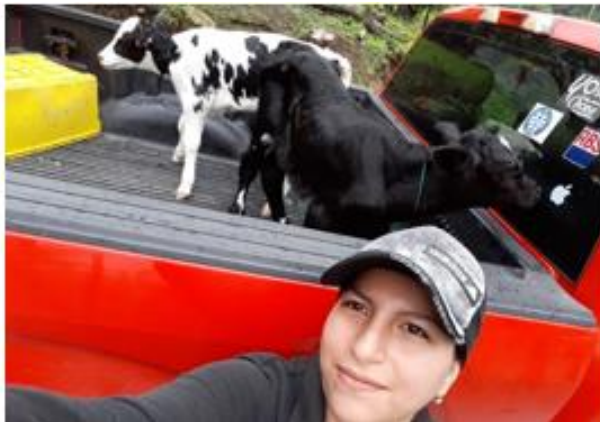




REUBICACION DE 2 TERNEROS EN EL PREDIO EL TRÉBOL DEL DR WALTER VIVAS, EN LA PARROQUIA CANUTO.



REUBICACIÓN DE 2 TERNEROS EN EL PREDIO DON POCHO, DEL DR. EUCLIDES DE LA TORRE EN EL SITIO CULEBRA, PARROQUIA CANUTO.



PRIMER EXPERIMENTO

SE DIO INICIO EL 6 DE MARZO DEL 2019, PARA ESTA FECHA 1 TERNERO DE LA UTM FALLECIÓ, SE TOMÓ UNA MUESTRAS LONGITUDINAL DEL BAZO Y SE ENVIÓ AL LABORATORIO.



MUESTREO DEL 12 DE MARZO DEL 2019



MUESTREO DEL 19 DE MARZO DEL 2019



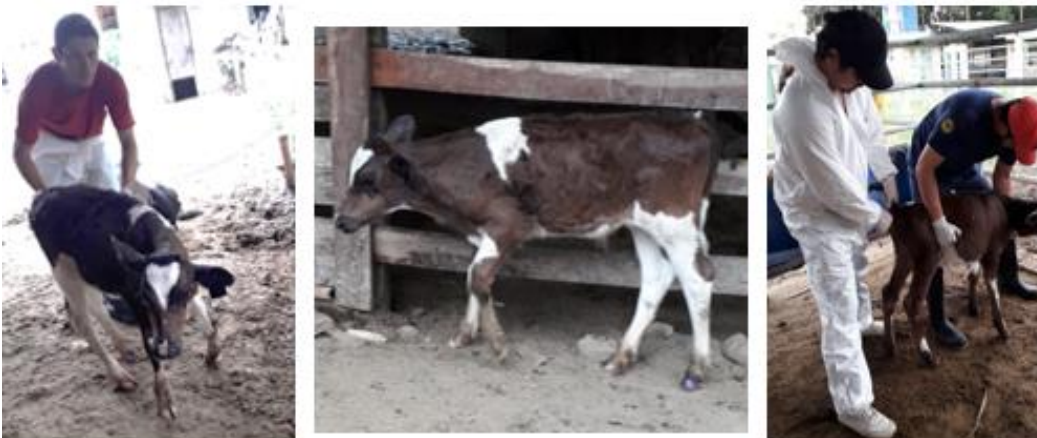
MUESTREO DEL 26 DE MARZO DEL 2019



MUESTREO DEL 2 DE ABRIL DEL 2019



MUESTREO DEL 9 DE ABRIL DEL 2019



MUESTREO DEL 16 DE ABRIL DEL 2019



MUESTREO DEL 6 DE MAYO DEL 2019



SEGUNDO EXPERIMENTO

LOS TERNEROS LLEGARON A CHONE EL 13 DE JUNIO DEL 2019 DESDE
MACHACHI



SE DA INICIO AL SEGUNDO EXPERIMENTO EL 25 DE JUNIO DEL 2019,
SIENDO ESTA LA SEGUNDA SEMANA EN LA QUE LLEGARON LOS
TERNEROS



MUESTREO DEL 2 DE JULIO DEL 2019 (SEGUNDO)



MUESTREO DEL 9 DE JULIO DEL 2019 (TERCERO)



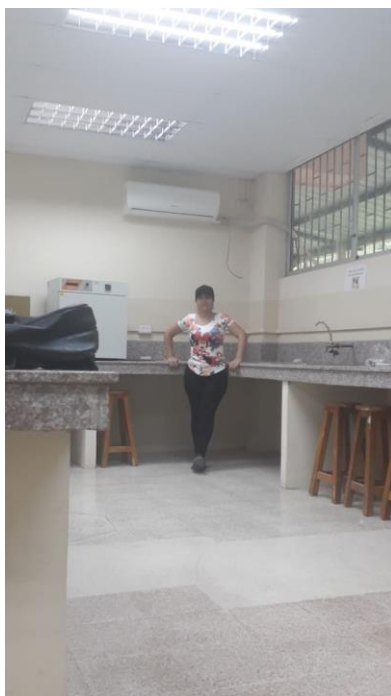
MUESTREO DEL 15 DE JULIO DEL 2019 (CUARTO)



MUESTREO DEL 23 DE JULIO DEL 2019 (QUINTO)



INSTALACIÓN DE ACONDICIONADORES DE AIRE EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA E INVESTIGACIÓN DE LA F.C.V.



MICROPIPETA, PUNTAS PARA PIPETA, PRIMERS PARA PRUEBA DE PCR, INSUMOS DE ALCOHOL



Datos meteorológicos de la zona de estudio durante el primer semestre de 2019

Meses	Estación Calceta			Estación Chone			Estación Bahía		
	T.			H T. °C			H T. °C Precipitacion(mm)		
	H		Precipitacion(mm)	H	T. °C	Precipitación(mm)	H	T. °C	Precipitacion(mm)
		°C							
								26,8	75
ene-19	88	26,2	199,9	89	26,0	220,1	74		
								26,3	140
feb-19	88	27,0	299,7	88	26,1	416,0	76		
								26,4	135
mar-19	87	26,9	198,9	90	26,0	313,1	77		
								26,4	60
abr-19	85	27,3	75,1	88	26,8	174,0	76		
								25,8	11
may-19	86	26,9	94,2	86	26,1	71,0	74		
jun-19	87	25,8	43,3	86	25,8	44,4	74	24,7	9
X	86,83	25,8	151,85	86	26,13	206,43	75	26,07	71,67

Inamhi: Estaciones meteorológicas de Calceta, Chone y Bahía 2019

TABLA 4. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

				Meses del año												
	Actividad	Fecha inicio	Fecha final	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Selección de Predios	03/09/2018	14/11/2018	X	X	X										
2	Muestreos en Predios antes de introducir a los centinelas y procesamiento de encuestas	15/02/2019	20/02/2019						X							
3	Encuesta epidemiológica	21/02/2019	23/02/2019						X							
4	Selección de Centinelas	20/02/2019							X							
5	Muestreos en Predios y procesamiento de muestras	6/03/2019	25/07/2019							X	X	X	X	X		
6	Diagnóstico	12/03/2019	15/07/2019								X	X	X	X		
7	Análisis de Resultados	25/06/2019	15/07/2019								X	X	X	X		

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Acevedo, A., Hinojosa, Y., Reloya, D., & Perera, C. (2016). Bluentongue virus: a known virus, a current threat. *Salud Animal* Vol.38 N°1, 52-59.
2. Agro, Z. (10 de Julio de 2016). *La Lengua Azul*. Obtenido de <http://www.nosmagazine.cl/zona-agro/zona-agro-maule-38/>
3. Agronegocios. (15 de Diciembre de 2015). *El gobierno autoriza la adquisición de reactivos de diagnóstico y vacunas frente a la Lengua Azul*. Obtenido de Agronegocios: <https://www.agronegocios.es/el-gobierno-autoriza-la-adquisicion-de-reactivos-de-diagnostico-y-vacunas-frente-a-la-lengua-azul/>
4. Alava, R. (24 de Febrero de 2017). *Ganadería Manabí*. Obtenido de <https://es.slideshare.net/rafa8911/ganaderia-manab>
5. Animal, P. (13 de Enero de 2015). *Syvazul 1, la vacuna de Lengua Azul de Syva*. Obtenido de produccionanimal.com: <http://www.produccionanimal.com/syvazul-1-la-vacuna-de-lengua-azul-de-syva/>
6. Arenas, A. J. (2013). Epidemiological study of bluentongue and epizootic hemorrhagic disease in Mediterranean ecosystem in Southern Spain. Obtenido de Tesis Doctoral Universidad de Córdoba.
7. Arnau, J., & Bono, R. (2008). Estudios longitudinales de medidas repetidas. Modelos de diseño y análisis. Obtenido de [scielo.isciii.es: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1989-38092008000300005](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1989-38092008000300005)
8. Axonveterinaria. (2016). *Lengua Azul*. Obtenido de http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/1/cys_1_Lengua_Azul.pdf
9. Calderón, N., & Iguarán, H. (2016). Frecuencia de hematozooarios de una región del caribe colombiano. *UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 19, 131-138.
10. CFSPH. (2006). Obtenido de *Lengua Azul*: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/lengua_azul.pdf

11. Da Silva, T., Lima, M., Spedicato, M., Carmine, I., Teodori, L., Leone, A., . . . Pituco, E. (2018). Prevalence and risk factors for bluetongue in the State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Medicine and Science* 4, 280-287.
12. Davies, F. G. (1978). Bluetongue Studies with Sentinel Cattle in Kenya. *The Journal of Hygiene*, Vol. 80, No. 2, 197-204.
13. Delgado, A. I. (1 de Agosto de 2017). *Lengua Azul en animales Bovinos. Transmisión, Prevención, Control y situación de la enfermedad en España*. Obtenido de agronegocios.es: <https://www.agronegocios.es/lengua-azul-en-animales-bovinos-transmision-prevencion-control-y-situacion-de-la-enfermedad-en-espana/>
14. Díaz, T., Barrero, D., & Barrio, L. (2013). Guía para la atención de focos y de situaciones de Emergencias Sanitarias de Fiebre Aftosa. Roma.
15. Escandon, A. M. (2011). *Lengua Azul en Bovinos*. Obtenido de dspace.ucuenca.edu.ec: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3058/1/mv174.pdf>
16. Gibbs, E., & Greiner, E. (1994). The epidemiology of bluetongue *Comp. Immun. Microbiol. Infec. Dis.*, 207-220.
17. Gu, X., Rodney, J., Davis, R. J., Walsh, S. J., Lorna, F., Melville, L. J., & Kirkland, P. D. (2014). Longitudinal study of the detection of Bluetongue virus in bull semen and comparison of real-time polymerase chain reaction assays. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 26, 18-26.
18. INEC. (2018). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria. Obtenido de https://www.google.com/ec/url?sa=t&rct=j&q=esrc=s&source=web&cd=4&ved=2ahUK Ewj_uq6snY3kAhUox1kKHf5jD5IQFjADegQIABAC&url=https%3A%2F%2Fwww.ecuadorencifras.gob.ec%2Fdocumentos%2Fweb-inec%2FEstadisticas_agropecuarias%2Fespac-2018%2FTabulados%2520ESP
19. I., S., W., D. P., & Sukarsih, S. E. (1992). Epidemiological studies of bluetongue viral infections in Indonesian livestock. In *Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses*, 147-154.

20. Jiménez, M. Á. (2008). *Virosis animales y cambio climático: La lengua azul y la fiebre de Nilo Occidental como paradigmas*. España: Monografías de Real Academia Nacional de Farmacia Monografía XXIV.
21. Katz, J. B., Alstad, A. D., Gustapson, G. A., & Moser, A. D. (1993). Sensitive Identification of Bluetongue Virus Serogroup by a Colorimetric Dual Oligonucleotide Sorbent Assay of Amplified Viral Nucleid Acid. *Journal Of Clinical Microbiology* , 2028-2030.
22. Larioja. (2016). *Información sobre Lengua Azul*. Obtenido de larioja.org: <http://www.larioja.org/laboratorio-regional/es/noticias/informacion-lengua-azul>
23. Legisa, D. M. (2014). *Estudio de aislamiento nacionales y desarrollo de una vacuna a subunidad, direccionada a células presentadoras de antígenos, para el Virus de la Lengua Azul*. Obtenido de digital.bl.fcen.uba.ar: http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n5526_Legisa.pdf
24. Legisa, D. M., Fernanda, N., González, F. N., & Dus Santos, M. J. (2014). Bluetongue virus in South America, Central America and the Caribbean. *Virus Research* 182, 87-94.
25. Legisa, D., González , F., & Dus Santos, M. (2013). Bluetongue virus in South America, Central and the Caribbean. *Virus Research* , 87-94.
26. López, W., Nicoletti, P., & Gibbs., E. (1985). Antibody tp bluetongue virus in cattlein Ecuador. *Tropical Animal Health and Production* 17, 82.
27. L. Varela, A., & R. Ron, S. (05 de Enero de 2020). Geografía y Clima del Ecuador. Obtenido de BioWeb: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/GeografiaClima/>
28. Maan, S., Maan, N. S., Samuel, A. R., Rao, S., Attoui, H., & Mertens, P. (2007). Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. *Journal of General Virology*, 88, 621-630.
29. Maan, N. S., Maan, S., Belaganahalli, M. N., Ostlund, E. N., Johnson, D. J., Nomikou, K., & Peter P. C, M. (2012). Identification and Differentiation of the Twenty Six Bluetongue Virus Serotypes by RT-PCR Amplification of the Serotype-Specific Genome Segment 2. *Plos One*, 2-4.

30. Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A. (2002). Real time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30 (6), 1292-1305
31. MacLachlan, N. J. (2009). The pathology and pathogenesis of bluetongue. *Journal of Comparative Pathology* 141, 1-16.
32. MacLachlan, N. J., Mayo, C. E., Mullens, B. A., Gerry, A. C., Barker, C. M., Mertens, P. P., . . . Guthrie, A. J. (2012). The combination of abundance and infection rates of *Culicoides sonorensis* estimates risk of subsequent bluetongue virus infection of sentinel cattle on California dairy farms. *Veterinary Parasitology* 187, 295-301.
33. MacLachlan, N. J., & Mayo, C. (2013). Potencial strategies for control of bluetongue, a globally emerging *Culicoides*-transmitted viral disease of ruminant livestock and wildlife. *Antiviral Research* 99, 79-90.
34. Martínez, N., & Barrera, M. (2011). Primer Reporte de Bovinos Seroreactores al virus Lengua Azul en Cuba. *Salud Animal*, 131-133.
35. Montes, A. J. (26 de Mayo de 2013). *Estudio epidemiológico de lengua azul y enfermedad hemorrágica*. Obtenido de hevia.uco.es: <http://helvia.uco.es/handle/10396/10754>
36. Navarro, D., Rojas, M., Jurado, J., Manchego, A., Ramírez, M., Castillo, A., & Rivera, H. (2019). Molecular detection of Bluetongue virus in *Culicoides insignis* and sheep of Pucallapa. *Rev Inv Vet Perú*, 465-476.
37. Noebauer, M. (2013). *Enfermedades Infecciosas en Veterinaria*. Obtenido de scribd.com: <https://es.scribd.com/doc/20575568/Libro-Enfermedades-Infecciosas-en-Veterinaria>
38. OIE. (Mayo de 2014). Lengua Azul (Infección por el Virus de la Lengua Azul). *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2018*, 4-6. Obtenido de Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2018: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.03_Lengua%20azul.pdf

39. OIE. (2011). Obtenido de Lengua Azul: http://www.oie.int/doc/ged/D13960.PDF?fbclid=IwAR34CFNdQkvpL_Ov3V6Xgrwi4TZW_GRAM32aT1PUeri08h8yXL6mcyom0Ow
40. OIE. (2017). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Recuperado el 20 de Julio de 2018, de <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
41. OIE. (2020). oie.int. Obtenido de <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/>: <https://www.oie.int>
42. OIE. (2020). OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2020. Obtenido de oie.int: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/>
43. Oviespaña. (24 de Agosto de 2017). *Historia reciente de la evolución de los serotipos de la lengua azul en España*. Obtenido de oviespana.com: <https://www.oviespana.com/informacion-de-ovino/servicio-diario-de-noticias/noticias/historia-reciente-de-la-evolucion-de-los-serotipos-de-la-lengua-azul-en-espana>
44. P.W., D., Pritchard, S. I., Eaton., & B., & Sukarsih. (2004). Trabajo de centinelización en Malasia. Regional overview of bluetongue viruses in South-East Asia: viruses, vectors and surveillance. *Veterinaria Italiana*.
45. Prosaia. (Febrero de 2016). *Detección de Lengua Azul en Ecuador*. Obtenido de prosaia.org: <http://www.prosaia.org/deteccion-de-lengua-azul-en-ecuador/>
46. Rao, P. P., Hegde, N., Reddy, Y. N., Krishnajyothi, Y., Reddy, Y. V., Susmitha, B., . . . Reddy, K. P. (2014). Epidemiology of Bluetongue in India. *Transboundary and Emerging Diseases*.
47. Reyna; et. al. (2017). Diagnóstico de los Hemótopicos *Anaplasma marginales*, *Trypanosoma spp.* y *Babesia spp.* Mediante las técnicas de Elisa y PCR en tres fincas ganaderas de la Provincia de Pastaza, Ecuador. *Revista Científica Latina*, 163.

48. Rojas, J. M., Rodriguez, M., D., M., Sevilla, V. N., & N. (2019). Diagnosing bluetongue virus in domestic ruminants: current perspectives. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 17-27.
49. Roy, P. (2017). Bluetongue virus structure and assembly . *Current Opinion in Virology*, 24: 115-123.
50. Saegerman, C., Reviriego, F., & Pierre, P. (2008). Lengua Azul en el norte de Europa.
51. Schulz, C., Breard, E., Sailleau, C., Jenckel, M., Viarouge, C., Vitaur, D., . . . Martin Beer, S. Z. (2016). Bluetongue virus serotype 27: detection and characterization of two novel variants in Corsica France. *Journal of General Virology*.
52. Shrijs, M., Smit, A., & Moormann, R. (2016). Vector Independent transmission of the vector-borne bluetongue virus. *Crit Rev. Microbiology* 42, 57-64.
53. SGA. (2016). *Lengua Azul (LA)*. Obtenido de sag.gob.cl: https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/f_tecnica_lengua_azul_2016.pdf
54. Vargas, D., Góngora, A., & Correa, J. (2012). Enfermedades virales emergentes en ganado de leche de América Latina. *Orinoquia* vol.16 no2, 88-96.
55. Vega, S., Tolari, F., García, A., Gómez, T., Fernández, S., Galiana, C., & Pérez, T. (2005). La lengua azul o fiebre catarral ovina es una enfermedad vírica, infecciosa, transmitida por mosquitos del género *Culicoides* que afecta a los rumiantes domésticos y salvajes. *Sanidad Animal*, 14-24.
56. Vega, S. (2014). *Lengua Azul-Fiebre Catarral Ovina*. Obtenido de colvema.org: <http://www.colvema.org/PDF/lenguazul.pdf>
57. Velasco, B. (23 de Noviembre de 2017). *Las reses mueren en Chone por Tripanosomiasis*. Obtenido de elcomercio.com: <http://www.elcomercio.com/actualidad/tripanosomiasis-mata-reses-chone-manabi.html>
58. Verdesoto et. al. (Mayo de 2016). Investigación de Orbivirus en ganado vacuno y sus posibles vectores. Quito, Pichincha, Ecuador.

59. Viarouge, C., Lancelot, R., Rives, G., Bréard, E., Miller, M., Baudrimont, X., . . . Sailleau, C. (2014). Identification of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus serotypes in French Guiana in 2011 and 2012. *Veterinary Microbiology* 174, 78-85.
60. Zambrano, J. B. (8 de Enero de 2018). Ganado muere de forma extraña en Chone. *EL UNIVERSO*, págs. <https://www.eluniverso.com/guayaquil/2018/01/08/nota/6557559/ganado-muere-forma-extrana-chone>.
61. Zotal. (12 de Marzo de 2015). *Cómo Prevenir la Lengua Azul o Fiebre Catarral Ovina*. Obtenido de <http://www.zotal.com/prevencion-lengua-azul-ganado/>