



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

Previo a la obtención del Título de Médico Veterinario

TEMA:

Epidemiología del virus de la Lengua Azul (*Orbivirus*), en 6 predios de ganado bovino de los cantones Santa Ana y 24 de Mayo, en la provincia Manabí.

Modalidad:

Proyecto de Investigación

AUTORAS:

Centeno Centeno Mariella

Chiliquinga Vélez Denisse

TUTOR:

Biol. Maritza Barrera, Ph. D.

Santa Ana – Manabí

2022

DEDICATORIA

En primer lugar, a *Dios*, por ser mi inspiración en cada momento, por darme la vida y permitir culminar mi carrera, por darme la salud para seguir adelante en cada paso que doy y sabiduría para ser una persona y una profesional de bien.

A mi padre *Ricardo Chiquinga* por ser mi ejemplo de padre, por su arduo trabajo, tenacidad y lucha en la vida. Por haberme brindado todo su apoyo incondicional, por sus consejos y amor en todo momento de mi vida y por ser un pilar fundamental en mi vida.

A mi madre *Deisy Vélez* por darme la vida, por forjarme con un carácter fuerte por sus constantes oraciones, por su amor, ejemplo de coraje y fortaleza para poder llegar a cumplir este gran sueño.

A mi mascota *Blacky* quien me acompañó en cada momento de mi vida, cada noche de desvelo, por estar acompañándome en cada paso de mi carrera, por su gran amor y lealtad, este logro se lo dedico con gran amor a ella.

A mis amigos con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron en mí una mejor persona y que una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

Los amo infinitamente.

Denisse Chiquinga

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a *Dios* por ayudarme a evadir las piedras del camino y enseñarme que los errores solo se convierten en fortaleza y oportunidad para seguir avanzando.

A *mi adorada familia, mi madre*, mi abuela, mi padre y mi hermano que son el principal soporte para cumplir mi proyecto de vida. Los amo con mi vida.

De igual forma a la *Dra Maritza Barrera* que es la capitana de este barco y un gran ejemplo para mí.

A todos esos jóvenes que perdieron la batalla luchando por sus sueños porque les hicieron creer que no eran capaces y que fueron consumidos por la ansiedad dentro de una sociedad llena de estereotipos sociales.

Pincky y Holly mis angelitos hermosos.

Por aquellos jóvenes que siguen luchando diariamente con sus miedos, con las amenazas e injusticias y problemas del entorno para cumplir sus sueños ,quiero decirles que RESISTAN al final del túnel hay una luz ,hay esperanza TENGAN FÉ.

Mariella Centeno

*‘Pero en cuanto a ustedes, sean fuertes y valientes porque su trabajo será recompensado.’
(2 Crónicas 15:7 NTV)*

AGRADECIMIENTO

*Agradezco a Dios por bendecirme, protegerme, guiarme y permitirme poder alcanzar,
uno de mis sueños más anhelado.*

A mis padres Ricardo Chiliquinga y Deisy Vélez por ser el pilar fundamental en mi vida, por el apoyo incondicional, por hacer de mí una persona digna y con valores, hermanos y amigos que me llenaron de fortaleza con sus motivaciones y palabras que a lo largo de mi carrera universitaria estuvieron apoyándome lo cual aprecio mucho.

A la Universidad Técnica de Manabí, que me dio la oportunidad de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día, y en especial a mis docentes por haberme brindado todos sus conocimientos para así formarme como una profesional.

A mi compañera de tesis Mariella Centeno por estar siempre apoyándome y ser parte de este logro.

A mi tutora de tesis el Dra. Maritza Barrera Valle PhD., por estar siempre pendiente en el desarrollo de la tesis con su experiencia, conocimiento, sugerencias y por toda la confianza que ha puesto en nosotras.

Al Dr. Jimmy Álava por toda su ayuda, por su paciencia y su gran colaboración en todo el proceso, al Dr. Carlos Bulnes por ser un gran apoyo en toda mi carrera, por sus consejos, apoyo, ayuda y confianza estoy muy agradecida con el por todo el cariño.

Al Ing. José Velázquez por la paciencia, apoyo y enseñanza, a mis amigos más cercanos el Dr. Cristhian Lectong y la Dra. Ammy Frank por sus consejos, ánimo, compañía en esta larga travesía y su apoyo incondicional.

Denisse Chiliquinga

AGRADECIMIENTO

A Dios, por mantenerme firme y ayudarme a conocer el significado de resiliencia, paciencia y perseverancia ante las dificultades que se me ponen en el camino.

A mis madres, mi madre Inés y mi abuela Olivia por luchar por mí para tener una vida llena de alegría, triunfos y un futuro impecable a pesar de las adversidades, de ustedes serán los frutos. Las honro y las amo.

A mi padre por forjar mi temperamento, y demostrarme que cuando tenemos sueños debemos trabajar duro para materializarlos.

A mi hermano Jorge por su apoyo y demostrarme que nada es imposible.

A mi compañera Denisse Chiliquina por su amistad honesta, por subirse a este barco y no rendirse nunca.

De manera especial a la Dra Maritza Barrera, por enseñarnos que todo con estudio, disciplina y trabajo responsable se logra, gracias por ser nuestra luz en los momentos más oscuros, gracias por ser el ejemplo más evidente de cómo ser un profesional de calidad en esta hermosa carrera y sobre todo gracias por creer en nosotras cuando muchos no lo hicieron.

Al Ing. José Velásquez Mg, por su paciencia, los conocimientos impartidos y calidad humana en el proceso.

Al Dr Jimmy Álava, el Ing Enrique Macias por su apoyo incondicional y a los demás profesionales, ganaderos que ayudaron al desarrollo de esta investigación.

A Agrocalidad por colaborar y creer en esta investigación

A la academia, Universidad Técnica de Manabí por la excelencia educativa proporcionada en estos años de educación.

Mariella Centeno

CERTIFICACIÓN

Portoviejo, 09 septiembre de 2022

Yo, Blga. Maritza Barrera Valle, PhD,

Certifico:

Que el proyecto de tesis de grado titulado: **“Estudio de infecciones por el virus de Lengua Azul (*Orbivirus*), en predios ganaderos de los cantones Santa Ana y Pichincha, en la provincia Manabí”**

Realizada por las Srtas. **Centeno Centeno Mariella** y **Chiliquinga Vélez Nicole** se desarrolló y culminó bajo mi supervisión y tutoría.



Maritza Isidra Barrera Valle

Tutor de tesis de grado

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS
VETERINARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TRABAJO DE TITULACIÓN

MODALIDAD:

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

“EPIDEMIOLOGIA DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL (*ORBIVIRUS*), EN
6 PREDIOS DE GANADO BOVINO DE LOS CANTONES SANTA ANA Y 24 DE
MAYO, EN LA PROVINCIA MANABÍ”

Sometida a consideración del tribunal de defensa designado por el H. Consejo
Directivo como requisito previo a la obtención del título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADO POR EL TRIBUNAL DE DEFENSA

Dr. Juan José Zambrano, Mg.

DECANO

Biol. Maritza Barrera Valle, PhD.

TUTOR DE TITULACIÓN

Dra. Marina Zambrano Aguayo, PhD.

PRESIDENTE TRIBUNAL

Dr. Victor Montes Zambrano, PhD.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Ronald Vera Mejia, PhD.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Mariella Jamileth Centeno Centeno y Denisse Nicole Chilingua Vélez , nos declaramos responsables del contenido y los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación, denominado: “EPIDEMIOLOGIA DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL (*ORBIVIRUS*), EN 6 PREDIOS DE GANADO BOVINO DE LOS CANTONES SANTA ANA Y 24 DE MAYO, EN LA PROVINCIA MANABÍ”, el cual consta de absoluta originalidad y autenticidad, con sus respectivas fuentes bibliográficas que indican la autoría de la información recolectada.

Autores:

.....

Mariella Jamileth Centeno Centeno

C.I. 1315077063

.....

Denisse Nicole Chilingua Vélez

C.I. 1311466211

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
AGRADECIMIENTO	V
CERTIFICACIÓN.....	VI
APROBADO POR EL TRIBUNAL DE DEFENSA	VII
DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	VIII
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	IX
INDICE DE ABREVIATURAS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XIV
RESUMEN	XV
ABSTRACT.....	XVI
I.- INTRODUCCIÓN	17
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
III.- ANTECEDENTES.....	20
IV.- JUSTIFICACIÓN	22
V.- HIPÓTESIS.....	23
VI.- OBJETIVOS.....	23
6.1 Objetivo general.....	23
6.2 Objetivos específicos	23
VII.- MARCO REFERENCIAL.....	24
7.1 Importancia de la producción bovina en el centro-sur de Manabí.	24
7. 2 Generalidades de la enfermedad Lengua Azul.....	25
7.2.1 Taxonomía.....	25
7.2.2 Etiología.....	26
7.2.3 Distribución	26
7. 3 Proteínas Virales	27
7.4 Multiplicación del virus en el vector.....	29
7. 5 Epidemiología.....	29
7.5.1 Periodo de incubación.....	29
7. 6 Patogénesis de la infección por el virus LA en bovinos.....	30
7.6.1. Transmisión	31
7.6.2 Sintomatología en bovinos.....	31
7.6.3 Lesiones patológicas en bovinos.....	31
7. 7 Diagnóstico Diferencial	32
7.7.1 Ectima contagioso.....	32
7.7.2 Enfermedad hemorrágica epizoótica (EHE)	32

7.8 Diagnóstico Laboratorial	33
7.8.1 Ensayo Por Inmunoadsorción Ligado A Enzimas (ELISA)competitiva	33
7.8.2 PCR con reverso traenscripción (RT- PCR)	34
7.9. Vector Biológico de la enfermedad.....	34
7.9.1 Taxonomía	35
7.9.2 Distribución y hábitats	35
7.9.3 Ciclo biológico del vector.....	37
7.9.4 Principales especies de vectores documentados en Ecuador.....	39
7.9.5 Identificación del género y especie	40
7.9.6 Métodos de captura.....	43
7.9.7 Métodos de diagnóstico molecular	44
7.9.8 Métodos de identificación.....	45
7. 10 Control y vacunación de la enfermedad	45
VIII.- MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	47
8.1 Lugar de estudio.....	47
8.2 Tiempo.....	48
8.3 Tipo de estudio.....	49
8.4. Cálculo de muestra.....	49
8.5 Materiales Generales.....	51
8.6 Métodos	53
8.6.1 Toma de muestras, y diagnóstico serológico.	53
8.6.2 Captura y caracterización de especies de <i>Culicoides</i> spp.....	55
8.6.3 Extracción del ARN a partir de <i>Culicoides</i> spp.	57
IX.- RESULTADOS.....	59
9.1 Diagnóstico Serológico.....	59
9.2 Análisis de la captura e identificación de especies de <i>Culicoides</i> spp	60
9.2.1 Caracterización de <i>C. insignis</i>	61
9.2.2Caracterización de <i>C. diabolicus</i>	62
9.2.3 Caracterización de <i>C. crepuscularis</i>	62
9.2.4 Caracterización de <i>C. foxi</i>	63
9.2.5 Caracterización de <i>C. Batesi</i>	63
9.2.6 Caracterización de <i>C. antunesi</i>	64
9.3. Análisis de los grupos de <i>Culicoides</i> de todas las fincas mediante RT- PCR en tiempo real.....	64
X.- DISCUSIÓN	66
XI.- CONCLUSIONES.....	71
XII.- RECOMENDACIONES	72
XIII.- PRESUPUESTO	73
XIV. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	74
XV.-BIBLIOGRAFÍA	75
XVI.- ANEXOS	82

INDICE DE ABREVIATURAS

OMSA: Organización Mundial de Sanidad Animal

VLA: Virus de Lengua Azul

PCR-RT: reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción.

ELISA-c : enzimoimmuno análisis de adsorción de competición

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (España).

Ct: Ciclo umbral

LA: Lengua Azul

BTV: Bluetongue Virus

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución geográfica a nivel mundial	27
Figura 2 Partícula del virus de la lengua azul.....	28
Figura 3 Patogenia del VLA en el huésped	30
Figura 4 Distribución de las diferentes especies del género Culicoides	36
Figura 5 Ciclo biológico de Culicoides ssp.....	37
Figura 6 Morfología del género Culicoides	40
Figura 7 Trampa CDC empleada en el Programa de Vigilancia Entomológica de VLA	44
Figura 8 Mapa de Santa Ana y de 24 de mayo.....	48
Figura 9 Ubicación de los predios estudiados	50
Figura 10 Ala de una hembra de la especie <i>C. insignis</i>	61
Figura 11 Caracterización de <i>C. insignis</i>	61
Figura 12 Caracterización de <i>C. diabolicus</i>	62
Figura 13 Caracterización de <i>C. crepuscularis</i>	62
Figura 14 Caracterización de <i>C. foxi</i>	63
Figura 15 Caracterización de <i>C. Batesi</i>	63
Figura 16 Caracterización de <i>C. antunesi</i>	64
Figura 17 Curvas de fluorescencia de la corrida de RT PCR en tiempo real para detectar el ARN de VLA en los grupos de Culicoides de cada predio.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Taxonomía de la lengua azul	25
Tabla 2 Proteínas estructurales de la lengua azul	27
Tabla 3 Taxonomía del vector Culicoides	35
Tabla 4 Predios, números de muestras totales.	50
Tabla 5 Interpretación de ELISA.....	54
Tabla 6 Bovinos seropositivos mediante Elisa C, por localidad y finca.	59
Tabla 7 Especies de Culicoides identificadas en el estudio.....	60
Tabla 8 Resultado del análisis por RT PCR en tiempo real para detectar el ARN de VLA en grupos de 50 culicoides colectados en cuatro predios de Santa Ana y 24 de Mayo.....	65

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Registro Clínico y Zootécnico	82
Anexo 2 Modelo de la encuesta	82
Anexo 3 Acta de consentimiento	83
Anexo 4 Kits de Elisa-c empleado	83
Anexo 5 Protocolo para la elaboración de ELISA competitivo	84
Anexo 6 Trampa CDC con luz ultravioleta.....	84
Anexo 7 Solución Hoyer	85
Anexo 8 Protocolo del laboratorio de biología molecular –diagnóstico animal para la toma de muestras	85
Anexo 9 Protocolo para la ejecución de la q-PCR- RT.....	86
Anexo 10 Kit PCR-RT empleado.....	86
Anexo 11 Proceso de muestreo en bovinos.....	87
Anexo 12 Proceso de muestreo entomológico.	87
Anexo 13 Proceso de montaje de los dípteros.....	87
Anexo 14 Placas listas para estudiar a 70° en estufa.....	88
Anexo 15 Vista desde el estereoscopio de culicoides insignis (Agrocalidad Manta). ...	88
Anexo 16 Muestra entomológica procesada para equipo cryo laser.	88
Anexo 17 Preparando el homogenizado de los insectos mediante trituración con un pistilo en trizol.....	89
Anexo 18 Procesador del vector en PCR.....	89
Anexo 19. Resultado completo Elisa competitiva.....	90

RESUMEN

La lengua azul es una enfermedad infecciosa cuyo agente etiológico es el virus de la lengua azul (VLA) que se transmite por dípteros del género *Culicoides*, específicamente es la hembra de algunas especies de este género. En Ecuador existen pocos reportes de infecciones por VLA. La presente investigación tuvo como objetivo demostrar por primera vez la presencia de infecciones por este virus en predios de los cantones Santa Ana y 24 de Mayo, mediante estudios epidemiológicos, que conllevaron el monitoreo de la presencia de bovinos seroreactores y de culicoides infectados con el virus de la lengua azul. En primer lugar, se monitoreó la presencia de bovinos seroreactores al virus por ELISA-c en 100 muestras de suero de bovinos procedentes de seis predios de Santa Ana (Bonce, Visquije La Unión, Monte Oscuro) y 24 de mayo (Bellavista, Tierras Negras), con condiciones de temperatura y humedad que favorecen el ciclo de vida del vector. Todos los animales muestreados resultaron seroreactores, sin evidencia de sintomatología clínica consistente con lengua azul, en el momento del muestreo. Posteriormente se colectaron culicoides durante tres noches en 4 predios, utilizando una lámpara trampa CDC, en tres de los predios estudiados de Santa Ana (Bonce, Visquije y Monte Oscuro) y en uno de 24 de mayo (Bellavista). Se realizó la identificación de las especies de culicoides que se encontraban en cada predio mediante claves entomológicas y para confirmar la presencia de culicoides infectados, se realizó la extracción de ARN de pools de 50 culicoides de cada predio y el análisis mediante PCR en tiempo real específico para el VLA. Se obtuvieron 2480 ejemplares de Culicoides, identificando seis especies: *C.crepuscularis*, *C.antunesis*, *C.batesi*, *C.foxi*, *C.diabolicus*, *C.insignis*. Esta última fue la especie más abundante y con reportes en otros países de ser vector para la transmisión del VLA. Se detectó ARN de VLA en los culicoides colectados en Bonce y Monte oscuro de Santa Ana y en Bellavista de 24 de Mayo. Se presume que el resultado negativo del PCR de Visquije se debe al sistema de control y vigilancia de plagas y vectores que se efectuó en el predio. Se demostró que en las tres fincas positivas por PCR se cumple el ciclo biológico del virus y una amplia circulación en todas las fincas estudiadas, se recomienda el uso de estas técnicas de detección para continuar los estudios de prevalencia de infecciones activas de lengua azul a nivel nacional.

Palabras claves: Virus de la lengua azul; Culicoides; bovinos; PCR; ELISA competitivo; Ecuador, Manabí.

ABSTRACT

Bluetongue is an infectious disease whose etiological agent is the bluetongue virus (BTV) that is transmitted by dipterans of the genus *Culicoides*, specifically the female of some species of this genus. In Ecuador there are few reports of BTV infections. The objective of this research was to demonstrate for the first time the presence of infections by this virus in farms in the cantons of Santa Ana and 24 de Mayo, through epidemiological studies, which involved monitoring the presence of bovine seroreactors and culicoides infected with the virus. of blue tongue. First, the presence of bovine seroreactors for the virus was monitored by ELISA-c in 100 bovine serum samples from six farms in Santa Ana and 24 de Mayo, with temperature and humidity conditions that favor the life cycle of the vector. . All the animals sampled were seroreactors, without evidence of clinical symptoms consistent with bluetongue, at the time of sampling. Subsequently, culicoides were collected during three nights in each farm, using a CDC trap lamp, in three of the farms studied in Santa Ana (Bonce, Visquije and Monte Oscuro) and in one in 24 de Mayo (Bellavista). The species of culicoides found in each farm was identified using entomological keys and to confirm the presence of infected culicoides, RNA was extracted from pools of 50 culicoides from each farm and the analysis was carried out using specific real-time PCR. for the VLA. 2480 specimens of Culicoides were obtained, identifying six species: *C.crepuscularis*, *C.antunesis*, *C.batesi*, *C.foxi*, *C.diabolicus*, *C.insignis*. The latter was the most abundant species and with reports in other countries of being a vector for BTV transmission. BTV RNA was detected in culicoides collected in Bonce and Monte Obscure from Santa Ana and in Bellavista from 24 de Mayo. It is presumed that the negative result of the Visquije PCR is due to the pest and vector control and surveillance system that was carried out on the property. It was shown that the biological cycle of the virus is fulfilled in the three positive farms and the use of these detection techniques is recommended to continue studies on the prevalence of active bluetongue infections at the national level.

Keywords: Bluetongue virus; Culicoides; cattle; PCR; competitive ELISA; Ecuador, Manabi

I.- INTRODUCCIÓN

La lengua azul (LA) es una enfermedad infecciosa, no contagiosa transmitida por vectores que afecta a rumiantes domésticos y salvajes, así como ovejas, bovinos, búfalos, etc., es transmitida por la picadura del díptero hematófago de ciertas especies del género *Culicoides* (OMSA, 2022).

La enfermedad de LA es producida por un virus ARN del género *Orbivirus*, familia *Reoviridae*. La infección por el virus de la lengua azul (VLA) tiene una mayor presentación en el ganado ovino, que en el ganado bovino. En el ganado bovino es especialmente importante la epidemiología de la enfermedad debido a la larga viremia, por lo que actúa como reservorio natural. Los síntomas clínicos se deben principalmente a la permeabilidad vascular y consisten en fiebre, hiperemia, congestión, edema, hemorragias faciales, y erosión de las mucosas (OMSA, 2022)

La enfermedad se relaciona de forma directa con la distribución de vectores competentes, íntimamente ligada a las condiciones ecológicas y climatológicas, las cuales determinan la distribución y abundancia de las diferentes especies, por ende, el cambio climático es considerado como factor clave en el aumento de la enfermedad (Olvera, 2012)

Desde 1986, había evidencias serológicas de circulación del virus LA en Ecuador (López, 1985), pero como en bovinos la enfermedad transcurre con signos clínicos leves, no se ha reportado su presencia en el país. Sin embargo, recientemente Verdezoto (2016) expone que encontraron bovinos con diagnóstico positivo de lengua azul por PCR y por ELISA procedentes de Tandapi y Santo Domingo.

En general en Ecuador no existe mucha información acerca de la patogenicidad de la enfermedad de LA en bovinos, mucho menos estudios sobre el vector, ni acerca del

impacto y la distribución de las infecciones por VLA. La única evidencia de circulación de VLA en Manabí fue obtenida por Moreira, (2019) y De La Torre *et al.*, (2021) en bovinos del cantón Chone, donde el 100% de los predios investigados tenían una seroprevalencia cercana al 99,1%.

En el presente trabajo se realizó el estudio de la presencia de bovinos seroreactores a VLA en bovinos, como indicador de la presencia de infecciones con el virus y de culicoides infectados en las unidades productoras seleccionadas de los cantones Santa Ana y 24 de Mayo, situados al centro este de la provincia, Manabí, así como se recolectaron las primeras evidencias de la situación epidemiológica de la enfermedad en la zona.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La lengua azul se encuentra incluida dentro de las enfermedades cuya declaración es obligatoria y restringe la comercialización de animales vivos, semen y óvulos desde los países afectados (OMSA, 2021).

En América Latina se ha presentado información preliminar base de casos de diagnóstico, prevalencia y epidemiología de LA, así como de su vector el díptero del género *Culicoides* spp, aportando una gran información y conocimiento de la caracterización de esta enfermedad del ganado bovino, pero no de manera local en su totalidad.

En Ecuador se desconoce la presencia del virus de la lengua azul, puesto que no existen suficientes fuentes de información que permitan conocer el estado real de estas enfermedades en las ganaderías. Además, los estudios son escasos para establecer un dato específico de la incidencia de esta enfermedad y sus pérdidas económicas.

De acuerdo con la información bibliográfica recolectada no existen investigaciones en los cantones objeto del estudio por lo que esta investigación tiene como propósito conocer la epidemiología de la enfermedad Lengua Azul en predios de estos dos cantones.

Formulación del Problema

La presente investigación está orientada teórica y metodológicamente a responder:

¿Existen infecciones por el virus Lengua Azul en predios de los cantones Santa Ana y 24 de Mayo relacionadas con la presencia del vector?

III.- ANTECEDENTES

Varios estudios (Legisa ,2014; Lobato *et al.*, 2015; Guimarães *et al.*, 2017), mencionan que la infección por VLA se ha reportado en América, aunque no hay tanta información existente, casi todos los países tienen evidencia serológica de la presencia del VLA, pero solo Brasil y Argentina tienen aislamientos del VLA. Se ha demostrado en estos estudios que la presencia del virus está relacionada con la presencia del vector, que se ha replicado abundantemente en la zona del neotrópico.

Navarro (2017) reporta infecciones por VLA en ovejas en tres granjas de las cuales dieron el 96% fueron seropositivas a VLA, evidenciando una alta circulación del virus.

La primera evidencia serológica de la circulación del VLA en Ecuador fue la de López (1986), donde expresa que, la enfermedad se presenta en bovinos con signos clínicos leves, posterior a ello Vinueza *et al.*, (2019) mencionan que no se encontraron seroreactores del VLA en una encuesta realizada en el 2014, en tres fincas de las Islas Galápagos.

Verdesoto 2016 y Verdezoto *et al.* (2017) encontraron 98.9% bovinos positivos por ELISA y 10.2% por PCR en muestras de predios de Tandapi (Santo Domingo), en Alluriquin (cantón Mejía de la provincia de Pichincha) y Cotundo (NAPO) y además del matadero de Santo Domingo. Se obtuvieron tres aislados del virus que según arrojó la secuenciación nucleotídica resultaron tres serotipos diferentes BTV-9 , BTV-13 y BTV-18.

Moreira (2019) en su investigación en la ciudad de Chone encontró una amplia circulación del virus, ya que el 97.87% de bovinos muestreados, resultaron seroreactores

a VLA por ELISA, mientras que De La Torre et al (2021) obtuvieron una prevalencia de 99.1% en una investigación con mayor número de animales en predios de Chone.

IV.- JUSTIFICACIÓN

La lengua azul está incluida en la lista de enfermedades de notificación obligatoria que infectan a múltiples especies de la Organización Mundial de Sanidad Animal. El principal impacto adverso de esta enfermedad radica en las pérdidas económicas debidas a las restricciones en el movimiento internacional de ganado rumiante y germoplasma y reducción de la productividad animal, mortalidad y el aborto, gastos en medicamentos, y servicios veterinarios (Guimaraes et al 2017).

La presente investigación se realiza con el fin de identificar la presencia de infecciones por el virus de la lengua azul en el ganado bovino de los cantones Santa Ana y 24 de Mayo de la provincia Manabí.

La identificación de las especies de *Culicoides* que es el vector del VLA culicoides no se ha realizado anteriormente en la provincia de Manabí y es fundamental contar con esta información ya que estos son parte el ciclo de vida del virus y no en todas las especies de culicoides el virus se multiplica teniendo como consecuencia la transmisión del virus mediante la picada a un herbívoro susceptible.

Esta investigación constituye el primer aporte de información epidemiológica de la enfermedad en los mencionados cantones y con ella se busca aportar conocimientos a los ganaderos sobre la enfermedad y contribuir a proyectar un plan de control basado en la información colectada

V.- HIPÓTESIS

Existen infecciones por el virus lengua azul en predios ganaderos de los cantones Santa Ana y 24 de Mayo que son favorecida por la presencia de los *Culicoides*.

VI.- OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Demostrar la presencia de infecciones y transmisiones por el virus de la lengua azul en predios del cantón Santa Ana y 24 de Mayo, provincia Manabí.

6.2 Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de bovinos seroreactores al virus de la lengua azul en bovinos en los predios estudiados.
2. Estudiar la presencia de especies del vector mediante la identificación taxonómica en los predios seleccionados.
3. Demostrar la presencia de *Culicoides* infectados con el virus de la lengua azul en los predios en estudio.

VII.- MARCO REFERENCIAL

7.1 Importancia de la producción bovina en el centro-sur de Manabí.

La zona centro-sur de la provincia de Manabí la comprenden los cantones Jipijapa, Paján, Puerto López, Santa Ana y 24 de Mayo por tal motivo, se la considera como la provincia que lidera a nivel nacional el número de cabezas de ganado vacuno en el territorio ecuatoriano, registrándose del mismo modo una producción de 610 mil de litros de leche a nivel nacional (Pino, 2017).

Según los datos presentados en la última encuesta de superficie y producción agropecuaria presentada por el INEC (2021) expresa que “en la provincia de Manabí se concentra el mayor número de cabezas de ganado vacuno con 951.769 cabezas lo que representa el 21,95% del total nacional. Del total de ganado existente, el 69,73% son hembras y de ellas el 57,61% son vacas” (p.29).

A través de los datos presentados en las encuestas nacionales y en los trabajos de investigación se establece la relevancia de la producción bovina en la provincia de Manabí, específicamente en la zona sur donde se concentra el mayor porcentaje de participación, por ende, el cuidado de los bovinos y el control de las enfermedades que pueden afectar de forma negativa constituyen temáticas de investigación que deben ser desarrolladas para diseñar métodos de prevención, diagnósticos temprano y tratamientos oportunos.

La ganadería bovina es un pilar fundamental dentro del sector agropecuario de la zona sur de Manabí debido a que contribuyen al dinamismo de la economía rural campesina con la oferta de productos cárnicos y leche, que son parte de la canasta básica y la seguridad alimentaria del país (MAGAP, 2015).

7. 2 Generalidades de la enfermedad Lengua Azul

Dentro de las generalidades de la enfermedad, la OMSA define que:

La lengua azul 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 género *Culicoides*.

A su vez, Sánchez *et. al* (2008) afirman que:

Es una enfermedad infecciosa no contagiosa de distribución mundial, que afecta tanto a rumiantes domésticos como salvajes con importantes diferencias según las especies afectadas. Está producida por un virus ARN del género *Orbivirus* de la familia *Reoviridae*.(p.52).

El virus presenta 27 serotipos con diversos grados de patogenicidad, presentes en todos los continentes excepto la Antártida (Purse *et al.*, 2005)

7.2.1 Taxonomía

La siguiente tabla que será presentada detalla la clasificación taxonómica del virus de la lengua azul.

Tabla 1 Taxonomía 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>Sedoreoviridae</i>
Género	<i>Orbivirus</i>
Especie	<i>Virus de la lengua azul</i>

Nota. Fuente: NCBI Taxonomy Browser. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cg>

7.2.2 Etiología

El virus de la lengua azul (Bluetongue virus, BTV) es icosaédrico desnudo de 50-100 nm de diámetro, el genoma está compuesto por ARN lineal de doble cadena. Dividido en 10 segmentos, cada uno de los cuales codifica para las diferentes proteínas estructurales y no estructurales. Por multiplicarse el virus en artrópodos y vertebrados, se considera un arbovirus desde el punto de vista epizootiológico. El virus presenta 27 serotipos tipos, cuyos antígenos de precipitación y fijación de complemento son comunes. Los serotipos se producen por variaciones en la secuencia de las Proteínas VP 2 y VP 5, que son los responsables de la especificidad inmunológica generando la inmunidad específica del serotipo, que parcialmente protege también contra otros serotipos. (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2006, p.3)

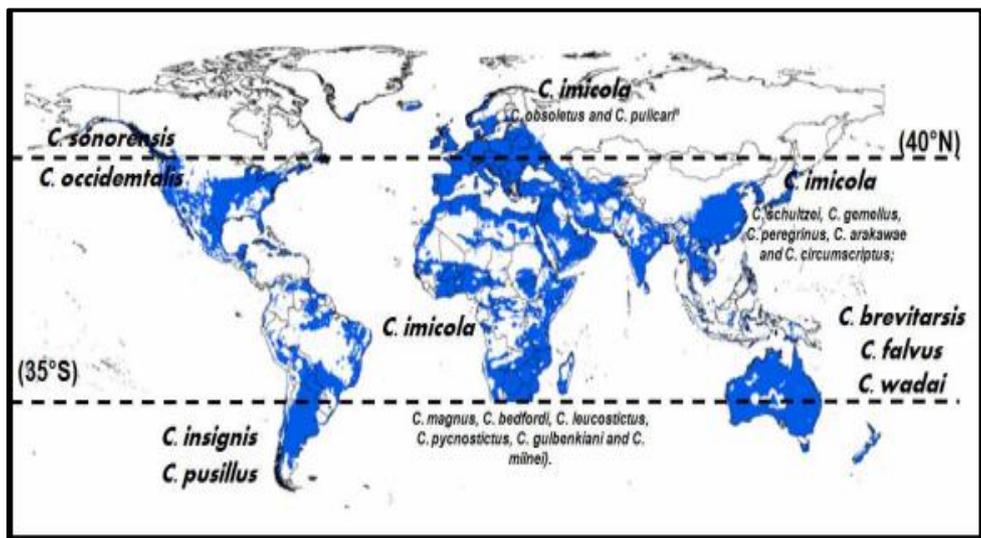
7.2.3 Distribución

La distribución geográfica de la LA depende de la presencia de ciertas especies del género *Culicoides*: *C. variipennis*, *C. imicola*, *C. obsoletus*, *C. brevitarsis*, etc. Según el Ministerio de agricultura, pesca y alimentación de España la enfermedad se presenta en zonas tropicales, subtropicales y regiones de climas templados, en los que la actividad de los vectores mantiene al virus mediante continuos ciclos hospedador-vector. La reintroducción del virus en regiones con climas templados es probable mediante el transporte de animales infectados o mediante el transporte a través del viento de culicoides portadores del virus. (MAPA, 2019, p.10)

Se sabe que la distribución de VLA es global, ha sido detectado en todos los continentes excepto en el territorio antártico. Además, también se encuentra en una amplia franja que incluye regiones entre las latitudes 40°N y 35°S. Sin embargo, estos límites han sido superados en regiones de Asia, Norteamérica y Europa donde la

infección por el VLA ha sido detectada hasta los 50°N (Ruder *et al.*, 2015, como se citó en Navarro, 2017).

Figura 1 Distribución geográfica a nivel mundial



Nota: Fuente (Modificado de Samy y Peterson, 2016, como se citó en Navarro, 2017)

7. 3 Proteínas Virales

Los viriones están conformados por 7 proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP6, VP7) y el genoma codifica también para la síntesis durante la replicación en la célula de cuatro proteínas no estructurales que van desde NS1 a NS4, la función de cada proteína se resume en la Tabla 2. La cápsida icosaédrica está formada por tres capas de las que la VP2 es la más superficial y junto con la VP 5 responsable de la variabilidad antigénica.

Tabla 2 Proteínas estructurales de la lengua azul

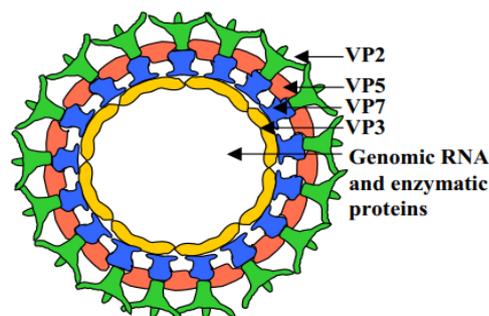
Proteínas virales	Función
VP1+ ARN polimerasa	Transcripción y replicación viral
VP2	Proteína estructural en la superficie del virus

VP3	Forma la capa del sub-núcleo del virus
VP4	Limita el ARN mensajero
VP5+ Proteínas externas	Unión del virus con el hospedero susceptible
VP6	Desenrolla y reconecta el RNAs durante la transcripción y replicación
VP7	Une el receptor de células de vector y parece ser capaz de realizar la unión entre VLA y las proteínas de membrana celular.
NS1	Actúa como una reguladora de la expresión del virus y se encarga de aumentar la síntesis de proteínas
NS2	Ensambla las proteínas y los ácidos nucleicos en el virión maduro
NS3	Facilita la liberación del virus de la célula infectada
NS4	Modifica la inmunidad del hospedador al inhibir la transcripción de genes de interferón. Logra proteger al virus, aumentando la replicación y diseminación por todo el hospedero.

Nota. **Fuente:** (Van den Bergh C, Coetzee P, Venter EH, 2018, como se citó en Reyes *et al.*, 2021, p. 8)

A continuación, se mostrará una arquitectura de una partícula del virus de la Lengua Azul señalando algunas de las proteínas estructurales que se describieron en la tabla presentada con anterioridad.

Figura 2 Partícula del virus de la lengua azul



Nota: **Fuente** (Bhattacharya, B *et al.*, 2007)

7.4 Multiplicación del virus en el vector

El virus se replica activamente en el interior de las células epiteliales cuboidales del intestino delgado del vector para después, atravesar de nuevo la pared celular y ser liberado en el hemocele del insecto, a través del cual se diseminará y podrá infectar tejidos diana secundarios, como son las glándulas salivares. La fase final de la infección se produce cuando los viriones invaden las células de las glándulas salivares del insecto, fenómeno que ha sido claramente demostrado mediante estudios de microscopía electrónica (Bowne y Jones, 1966, como se citó en López, 2012, p.9).

7.5 Epidemiología

El virus es transmitido indirectamente entre animales a través de las picaduras de un artrópodo del género *Culicoides*. El ganado es el hospedero de mayor poder de amplificación debido a su prolongada viremia y a las preferencias alimenticias de los culicoides. El virus puede transferirse también al feto atravesando la placenta, dependiendo de la cepa el ganado bovino o caprino suele no presentar sintomatología, en otras circunstancias el ganado bovino puede enfermar y manifestarse la enfermedad hasta en un 5% de los animales, y la mortalidad no es común (Ministerio de Agricultura, 2016). Otra vía de transmisión es a través del semen (Givens, 2018).

7.5.1 Periodo de incubación

Este virus tiene un periodo de incubación de 2 a 4 días y los síntomas aparecen aproximadamente al quinto día de la infección, en el ganado vacuno dura aproximadamente de 50 a 80 días. (Reyes *et al.*, 2021, p. 6)

En el vector el período comprendido entre la ingestión de sangre infectada y la aparición del virus en la saliva del vector se denomina Periodo de Incubación Extrínseco (PIE), y su duración aproximada es de una a dos semanas dependiendo de la temperatura exterior. A partir

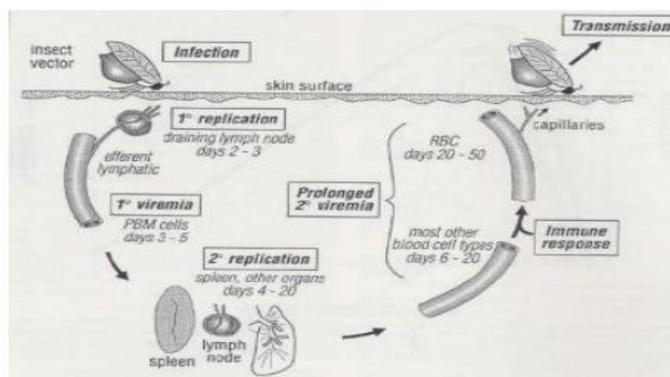
de ese momento, las glándulas salivares del culicoides estarán infectadas, algunas partículas víricas se alojarán en los conductos salivares y el vector estará en condiciones de poder transmitir el virus sobre un nuevo hospedador vertebrado. (Beaty y Marquardt, 1996, como se citó en López, 2012, p.11)

7.6 Patogénesis de la infección por el virus LA en bovinos

En lo que respecta a la patogenia del virus, Escandón (2011) refiere:

Tras la penetración percutánea del virus, se produce una replicación primaria en los ganglios regionales y una posterior difusión hematogena asociada a hematíes, con viremia febril. El virus es vasculotropo, con localización y replicación en endotelio de vasos de la mucosa oral y nasal, corion podal, piel y musculatura. Lesiona el endotelio, produciendo trombosis y necrosis isquémicas, aumento de permeabilidad con edemas, y de fragilidad, con hemorragia.

Figura 3 Patogenia del VLA en el huésped



Nota. Fuente: (Lengua Azul, 2010, como se citó en Escandón, 2011).

En las vacas el cuadro suele ser subclínico presentando exclusivamente ligeras alteraciones en la fórmula leucocitaria y linfocitaria sanguínea. En el caso de que haya existido una sensibilización previa con un *Orbivirus* puede producirse una sintomatología similar a la ovina, aunque de carácter más leve. (p.22).

7.6.1. Transmisión

La transmisión se da principalmente por la picadura de mosquitos del género *Culicoides*, que son infectados con el virus al picar e ingerir la sangre de animales infectados, propagando así el virus a los animales sanos (Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria, 2021).

El virus de la lengua azul se ha desarrollado de manera que se producen ciclos alternos de replicación en hospedadores vertebrados e invertebrados. Hasta la fecha, la principal vía de transmisión que se ha demostrado es la de tipo horizontal, a través de las picaduras de distintas especies del género *Culicoides*. (López, 2012, p. 10)

Se ha demostrado la transmisión transplacentaria y a través del semen.

7.6.2 Sintomatología en bovinos

En los bovinos, los síntomas clínicos no son frecuentes. En su fase primaria es una infección inaparente en la mayoría de los casos. En brotes de lengua azul el rebaño afectado puede mostrar signos clínicos menores al 5%. La mortalidad también es baja, menor del 5%, la sintomatología se centra en hiperemia leve en la cavidad bucal y en las bandas coronarias. Se presentan vesículas y ulceraciones en la mucosa bucal, rodete dentario, dientes incisivos y en la punta de la lengua y pezones. El pelo se ve hirsuto y apelmazado (Rodríguez, 2007).

7.6.3 Lesiones patológicas en bovinos

De igual manera la Center for Food Security & Public Health (2015) detallan algunas de las lesiones patológicas en bovinos:

Lesiones que incluyen dermatitis vesicular y ulcerosa, dermatitis periocular, lesiones necróticas, desprendimiento de la piel afectada y fotodermatosis. En algunos casos, la piel puede desarrollar pliegues gruesos y grietas, particularmente alrededor de

la cruz y el cuello. Se han informado lesiones en la ubre y los pezones, como eritema, úlceras, grietas y lesiones necróticas, tanto en bovinos, además, la producción de leche puede disminuir. Se han informado abortos y muertes, y se han observado anomalías congénitas, incluidas lesiones del SNC, en terneros recién nacidos. (p.3)

Esta enfermedad está presente en el ganado bovino, se caracteriza por ser subclínica o inaparente, la lesión principal es el daño endotelial que provoca agregación de plaquetas y coagulación, fiebre, inflamación y hemorragias en mucosas orales, nasales y en todo el tracto digestivo, la lengua puede presentar tumefacciones y un color cianótico, inflamación en el rodete coronario y láminas de la pezuña. (Ibatá *et al.*, 2020, p.5)

7.7 Diagnóstico Diferencial

El diagnóstico diferencial debe realizarse debido a que en bovinos resulta más difícil. La enfermedad de la lengua azul puede ser confundida con enfermedad vesicular, diarrea viral bovina, rinotraqueítis infecciosa bovina, fiebre catarral maligna o fiebre aftosa, ectima contagiosa entre otras (Rodríguez, 2007).

7.7.1 Ectima contagioso

La ectima contagioso ovino, también conocida comúnmente como boquera, es una enfermedad muy contagiosa. Es un virus epiteliotropo por lo que produce un cuadro cutáneo eruptivo en el que se pueden observar sobre todo vesículas y costras. No genera grandes cifras de mortalidad, pero su incidencia es muy alta, se diagnostica en función del cuadro clínico que presentan los animales y las lesiones macroscópicas que produce (Ferrer y Ortín, 2020).

7.7.2 Enfermedad hemorrágica epizoótica (EHE)

Es una enfermedad vírica infecciosa no contagiosa transmitida por vectores que afecta a rumiantes domésticos y salvajes, principalmente al ciervo de cola blanca (*Odocoileus*

virginianus), y al ganado bovino. En este grupo casi nunca se observan signos clínicos, pero se ha documentado fiebre, anorexia, disfagia, emaciación, estomatitis ulcerosa, cojera, dificultad respiratoria y eritema de la ubre (Terrestre, 2021).

7.8 Diagnóstico Laboratorial

Se recomienda enviar suero y sangre con EDTA de animales que muestren signos clínicos de la enfermedad, o en el caso de animales muertos bazo, hígado, ganglios linfáticos, lengua o médula ósea. Las muestras se remitirán al laboratorio refrigeradas, pero no congeladas, ya que la congelación dificulta notablemente el aislamiento del virus. El diagnóstico se basa en el aislamiento del virus y su identificación por PCR a partir de muestras de sangre y tejidos, así como en la detección de anticuerpos en animales no vacunados. (Escandón, 2011, p.63)

7.8.1 Ensayo Por Inmunoadsorción Ligado A Enzimas (ELISA) competitiva

MacLachlan *et al.* (2017) sobre ELISA define que:

Son las pruebas serológicas ensayos de elección para el diagnóstico cualitativo (positivo o negativo) o la determinación cuantitativa de anticuerpos contra el virus porque son rápidos, relativamente rentables y es posible que no requieran la producción de virus infecciosos para el antígeno.

Los ELISA son una excelente alternativa para el análisis serológico de grandes poblaciones. Se han descrito ELISAs indirectos (I-ELISA) y competitivos (C-ELISA), ambos dieron mejores resultados que la inmunodifusión doble en agar (AGID) pero se encontró que el C-ELISA es superior en sensibilidad y especificidad a las otras técnicas. (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2006, p.6)

La prueba recomendada por la OMSA (2018) para determinar la prevalencia de infección por el VLA es el ELISA de Competición. En este formato, los pocillos de las

microplacas están recubiertos con la proteína recombinante VP-7 (que es el antígeno conservado en todos los serotipos de VLA) y se añaden el suero problema y un anticuerpo monoclonal anti VP 7 que, en el caso de un animal infectado o recuperado de la infección, compite con las Inmunoglobulinas en el suero del animal por el antígeno (p.123).

7.8.2 PCR con reverso traenscripción (RT- PCR)

Es un método rápido y conveniente para la detección del ARN del VLA en la sangre, dada la prolongada viremia que se produce durante la infección. Se han desarrollado varios protocolos de RT-PCR que detectan los segmentos 1, 2, 3, 6, 7 ó 10 en los últimos 20 años (Billinis *et al.*, 2001; Zientara *et al.*, 2002; Aradaib *et al.*, 2003; Shawn *et al.*, 2007, como se citó en Navarro, 2017).

RT-PCR suele tener más sensibilidad que el aislamiento del virus y puede dar un resultado positivo aún varias semanas después de la infección (MacLachlan *et al.*, 2017). Los métodos convencionales de RT-PCR requieren electroforesis en gel de agarosa, lo que limita el número de muestras que se pueden analizar en un día. Durante los últimos años, se han desarrollado los ensayos cuantitativos en tiempo real por RT-PCR (Shawn *et al.* 2007, como se citó en Navarro, 2017, p.42).

7.9. Vector Biológico de la enfermedad

Culicoides spp.

El género *Culicoides* es el único vector de la lengua azul, aunque también es vector de otras enfermedades como la Peste Equina Africana.

Se trata de un género que engloba especies que tienen un tamaño muy pequeño, de 0,5 a 5 mm (p.16). La hembra es la responsable de la transmisión, ya que es hematófaga porque necesita la sangre para madurar los huevos. (Sánchez *et al.*, p.46)

De igual manera, como lo menciona Reyes *et al.* (2021) “El vector del género *Culicoides* es un mosquito el cual pertenece al orden Díptera, familia *Ceratopogonidae*. Tiene alrededor de 1400 especies clasificadas en 31 subgéneros.

7.9.1 Taxonomía.

Tabla 3 Taxonomía del vector Culicoides

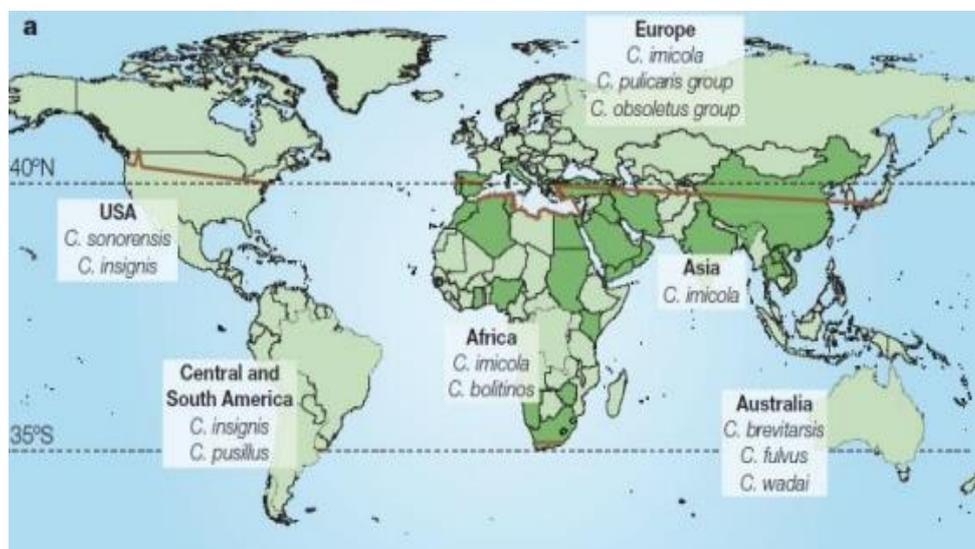
DOMINIO:	<i>Eukaryota</i>
REINO:	<i>Animalia</i>
Subreino:	<i>Eumetazoa</i>
FILO:	<i>Arthropoda</i>
Subfilo:	<i>Hexapoda</i>
CLASE:	<i>Insecta</i>
Subclase:	<i>Pterygota</i>
Intra clase:	<i>Neoptera</i>
Superorden:	<i>Endopterygota</i>
ORDEN:	<i>Diptera</i>
Suborden:	<i>Nematocera</i>
Infra orden:	<i>Culimorpha</i>
Superfamilia:	<i>Chironomoidea</i>
FAMILIA:	<i>Ceratopogonidae</i>
Subfamilia:	<i>Ceratopogonidae</i>
Tribu:	<i>Culicoidini</i>
GÉNERO:	<i>Culicoides</i>

Nota. **Fuente:** Modificado de (Latreille, 1809, como se citó en Navarro, 2017)

7.9.2 Distribución y hábitats

Por lo general se encuentran en zonas tropicales y en áreas agrícolas, ganaderas y en zonas húmedas y boscosas (Reyes *et al.*, 2021, p. 16).

Figura 4 Distribución de las diferentes especies del género *Culicoides*



Nota. Fuente: (Purse *et al.*, 2006, como se citó en Bonet, 2014)

En la figura 4 se observan los géneros del vector culicoides que se encuentran implicados en la transmisión del virus de la lengua azul, los países señalados con el color verde oscuro son en los que se ha detectado la presencia de *C. imicola*, considerado como el vector más antiguo de la LA (Bonet, 2014).

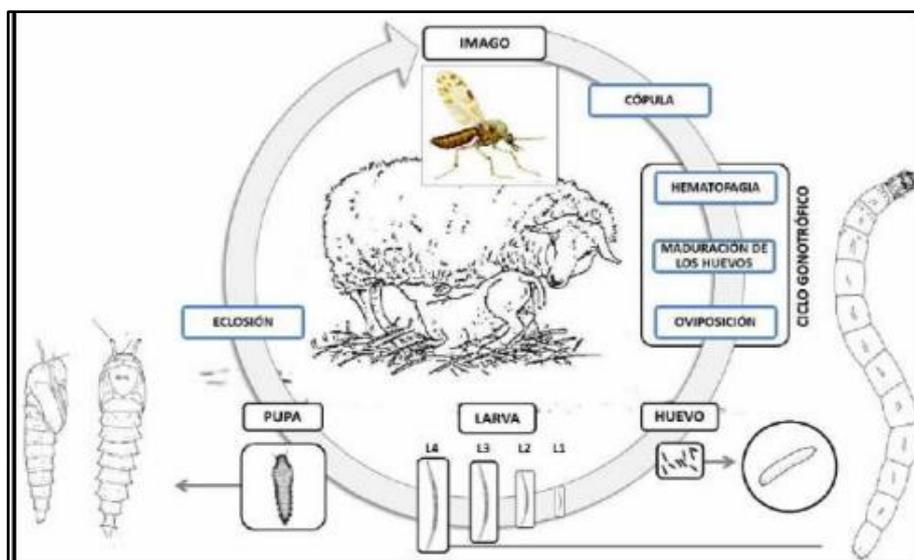
Ocupan una amplia gama de hábitats semiacuáticos, pero las especies que abundan cerca del ganado a menudo se vinculan con la transmisión de arbovirus. Dichos hábitats incluyen boñigas intactas (*C. bolitinos*, *C. brevitarsis*, *C. chiopterus*, *C. dewulfi*), lodo en la interfaz suelo-agua (*C. insignis*, *C. pulicaris*, *C. stellifer*, *C. sonorensis*), y sustratos de suelo húmedos y altamente orgánicos que son estiércol viejo y compostado mezclado con suelo que generalmente no tiene agua estancada (*C. imicola*, *C. obsoletus*, *C. pusillus*). (Purse *et al.*, 2015, p.376)

Si bien la mayoría de las especies de culicoides son semiacuáticas como larvas, sus hábitats están en gran parte mal definidos y la gran mayoría de las especies se reconocen sólo a partir de formas adultas (Meiswinkel *et al.*, 2004, como se citó Harrup *et al.*, 2013.p.2)

Las distintas especies de los culicoides difieren en algunos detalles, necesitan agua dulce y otras agua salada, algunas crías se desarrollan en agujeros de los árboles llenos de agua y otras en la vegetación de descomposición, en suelos arenosos, cenagosos y similares. Los adultos son de vida crepuscular y nocturna. (Bowman *et al.*, 2004, p.8)

7.9.3 Ciclo biológico del vector

Figura 5 Ciclo biológico de Culicoides



Nota. Fuente: (Adaptado de Blanton y Wirth, 1979, como se citó en Alarcón, 2015)

Los adultos de Culicoides se reúnen en determinados puntos, como pueden ser árboles, y realizan la cópula. Para la puesta de huevos es necesario que la hembra ingiera sangre de animales o humanos. La sangre hará que maduren los ovocitos y se formen los huevos. (Lucientes *et al.*, 2019, como se citó en González, 2020, p.11).

Huevo

Las hembras colocan sus huevos en masas gelatinosas o hileras ya sea sobre la vegetación húmeda o en el lodo. Los huevos son blancos, pero al poco tiempo se comienzan a tornar negros, la estructura de los mismos puede ser alargada y arqueada, o corta y cilíndrica, por lo general, eclosionan entre los 2 y 9 días (Amador *et al.*, 2015).

Larvas

Son típicamente largas y finas, con una longitud de 2 a 5 mm en su etapa madura. El cuerpo es translúcido y algo blanquecino. El tórax está usualmente marcado por un patrón de pigmentación subcutáneo. Los segmentos torácicos y abdominales tienen un tamaño similar, lo cual contribuye a la forma cilíndrica del cuerpo. Las partes bucales de la larva están compuestas por un par de mandíbulas no opuestas. (Mullen y Durden, 2002, como se citó en Mullo, 2014, p.17)

Pupas

La duración de este estadio suele oscilar entre los 2 – 3 días, aunque al igual que los anteriores, depende de la temperatura ambiental. Las pupas de la mayoría de Culicoides flotan, pudiendo sobrevivir a las inundaciones del suelo (Calvete *et al.*, 2008, como se citó en Bonet, 2014, p.7)

Imago

Fase final del ciclo donde se puede apreciar el culicoides adulto. Las hembras necesitan alimentarse de sangre para conseguir las proteínas necesarias para la maduración de los huevos. (Wittmann & Baylis, 2000, como se citó en Bonet, 2014. p.7).

7.9.4 Principales especies de vectores documentados en Ecuador

En el Ecuador se han reportado 65 especies del género Culicoides, 16 fueron registradas recientemente. El subgénero Hoffmania es considerado como el más prevalente en el país. Además, se han identificado algunas especies antropofílicas: *C. ginesi*, *C. neoparaensis*, *C. paraensis*, *C. diabolicus*, *C. castillae*, *C. foxi*, *C. insignis*, *C. acotylus*, *C. belemensis*, *C. pachymerus*, *C. pifanoi*, *C. reticulatus*, *C. deanei* (Ortiz & León, 1955; Dillon & Lane, 1993; Borkent & Spinelli, 2007; Gualapuro & Zapata, 2013, como se citó en Torres. 2014, p.18).

7.9.4.1 *C. insignis*.

En la investigación realizada por Torres (2015) acerca de la identificación molecular del vector Culicoides expone que:

En la provincia de Bolívar (Echendía), se encontraron 2 especímenes del género *Culicoides* que exhiben sangre café, identificados como *C. insignis*, el cual es considerado como el principal vector del virus de la Lengua Azul en América del Sur. La digestión de sangre y el número tan bajo de individuos de esta especie en la investigación, imposibilita definir el origen de alimentación de los culicoides de la especie *C. insignis*. (p.40)

7.9.4.2 *C. guttatus*.

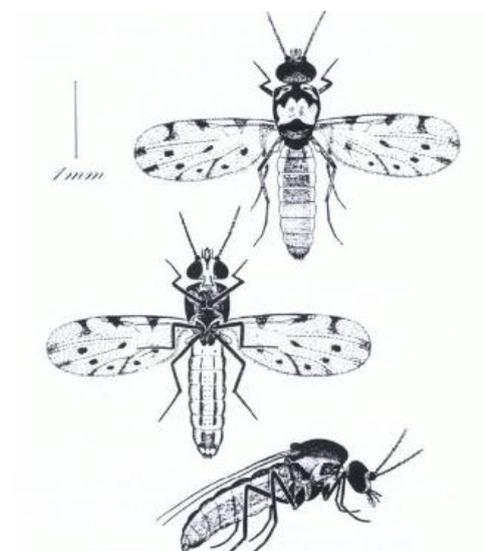
Se encontró en 4 provincias en donde se realizaron las colecciones para este estudio siendo estas Pichincha, Esmeraldas, Bolívar y Santo Domingo de los Tsáchilas, el resultado que se obtuvo fue que la especie *C. guttatus* es la más abundante con un porcentaje de 37% del total de hembras culicoides alimentadas recientemente. Este alto porcentaje se pudo dar ya que se ha demostrado que esta especie se adapta rápidamente a diversas condiciones ambientales,

esa es la especie del género *Culicoides* que está más dispersa en Florida (Beck, 1952; Vargas,1960, como se citó en Torres, 2014).

7.9.5 Identificación del género y especie

Los mosquitos picadores del género *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) son vectores biológicos de arbovirus de importancia internacional. Para comprender el papel de *Culicoides* en la transmisión de estos virus, es fundamental identificar correctamente las especies involucradas. (Garros *et al*,2014, p.2)

Figura 6 Morfología del género *Culicoides*



Nota. **Fuente:** (Dibujo de J.C Delecolle 1985, como se citó, en Lucientes *et al.*, 2008)

Como expresa Alarcón (2015) en su informe doctoral acerca de la morfología del vector:

Las larvas son alargadas y delgadas, lo cual les confiere un aspecto vermiforme y cilíndrico, y constan de 13 segmentos con un tamaño cercano a los 0,5 mm de longitud en L1 y alcanzando la L4, tras tres mudas, una longitud de hasta 1 cm en las especies más grandes, aunque este rango suele oscilar en la mayoría entre 2 y 5 mm.

Cabeza

Tienen un par de ojos compuestos bastante grandes, reniformes, que inician en la cara anterior de la cabeza, cubren las caras laterales y llegan hasta la frente; donde en algunas especies se juntan y en otras están parcial o moderadamente separados, esto es de importancia en la identificación. (Gualapuro,2013, p.22)

Antenas

Poseen un par de antenas moniliformes que son unos segmentos alargados y ensamblados como una cadena. Se originan en la parte superior de la convexidad justo debajo de los ojos. Cada antena se compone de 15 segmentos, rara vez 14 en algunos machos. (Felippe-Bauer, Bauer & Silva, 1989; Kline & Axtel, 1999; Minh, 2010, como se citó en Gualapuro, 2013, p.23)

Abdomen

El cuerpo es blanco translúcido, la cápsula cefálica amarilla y marrón y el tórax tiene marcas con un patrón característico de pigmentación subcutánea, siendo los segmentos abdominales y torácicos de tamaño parecido, lo cual confiere una apariencia fusiforme y tubular que favorece el desplazamiento por el medio con un movimiento serpentino particular. (Alarcón ,2015, p.43)

Espermatecas

Son ovarios fusiformes en números de 1 a 4 de los cuales 1 a 3 son funcionales y uno es vestigial (no funcional), se conectan a través de oviductos que se fusionan y en la parte final tienen un anillo esclerotizado de formas y dimensiones diferentes que son útiles en la identificación de especies. Son de interés taxonómico el número, forma y tamaño (largo y ancho) de las espermatecas. (Gualapuro,2013, p.28).

Hipopigium

De igual forma como lo manifiesta Gualapuro (2013) “en los machos la apariencia genital externa es única y lo más importante en la identificación de las especies macho. Las estructuras que lo componen son: pene o aedeagus, parámero, cercus, esterno, tergo, lamella, estilo, coxito, apodema” (p.27).

Alas

Los Culicoides presentan alas con vena transversal radio-mediana presente, celdas radiales desarrolladas, segunda celda radial que sobrepasa la mitad del ala, vena anterior vena cubital bifurcada en la mitad del ala o más que cubren la superficie del ala. De igual manera, poseen manchas, máculas o áreas de color blanco mate, además de abundancia o no de pequeñas cerdas llamadas macrotiquias que cubren la superficie del ala. (Perruolo, 2009, p.125)

Celdas

Las celdas como lo afirma Gualapuro (2013)” son los espacios llanos formados por las venas y los bordes de las alas; desde lo anterior a posterior se ubican: celda subcostal (ssc), basal (b), radial (r, r1, r2), media (m, m1, m2), cubital (cu) y anal (an)” (p.26).

Aparato bucal

Los principales órganos que lo conforman son: el clípeo que se encuentra justo debajo de la base de la inserción de las antenas y las piezas bucales de perforación. Este aparato está formado de: labrum - epifaringe, par de estiletes, la mandíbula, las maxilas, la hipofaringe, el labio y el cibarium. Las mandíbulas y las maxilas tienen unos dientes pequeños. (Gualapuro, 2013, p.25).

Los elementos anexos

Corresponde a las microtriquias, macrotriquias y cerdas. Las microtriquias son pequeñas extensiones pilosas de la cutícula y distribuidas por toda el ala. Las macrotriquias con estructuras pilosas más largas que las microtriquias, tienen una base alveolar en la superficie del ala, su distribución difiere según las especies y generalmente cerca del borde de las celdas r3, m1, m2 y venas radiales. Las cerdas son estructuras pilosas que están generalmente al borde del ala en la celda costal y anal. (Gualapuro, 2013, p.26)

7.9.6 Métodos de captura

El estudio de los lugares de cría de los culicoides nos permite conocer el hábitat en el que se desarrollan sus etapas inmaduras. Para relacionar un hábitat de cría con los adultos, existen dos formas fundamentales para su estudio. El primer caso, es la captura de los adultos mediante trampas de emergencia colocadas en el propio sustrato susceptible de poseer las larvas. Las herramientas principales para el monitoreo usadas para la captura de ejemplares adultos de culicoides son varios modelos de trampas siendo la más conocida las de luz suctoras: mini CDC. (González y Goldarazena, 2011, p.63-64)

7.9.6.1 Trampas CDC

La captura de los Culicoides como lo detalla Lucientes *et al.* (2008):

Se viene realizando mediante la utilización de trampas de captura de aspiración tipo mini CDC con luz ultravioleta (miniature CDC Light Trap) y célula fotoeléctrica incorporada. La luz ultravioleta sirve de atracción para estos insectos que al acercarse a la luz son aspirados por un ventilador situado en su parte inferior, pasando a un recipiente con alcohol diluido donde son almacenados. Estas trampas pueden funcionar con baterías de 6 voltios o a la corriente eléctrica con transformador.

Las muestras una vez retiradas son enviadas a los laboratorios de referencia donde se separan e identifican a nivel de especie, y dentro de estas se cuentan machos y hembras y en las hembras se identifican las paras, es decir las que han chupado sangre con anterioridad a su captura y tienen el riesgo de transmitir el virus, de las nulíparas que acaban de emerger y nunca han podido ingerir sangre y por lo tanto no son de riesgo (p.45).

Figura 7 Trampa CDC empleada en el Programa de Vigilancia Entomológica de VLA



Nota. **Fuente:** Lucientes *et al* (2008), p.45

7.9.7 Métodos de diagnóstico molecular

Con la aparición de las técnicas de biología molecular, especialmente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la secuenciación automática, el estudio del genoma en insectos, principalmente aquellos considerados vectores de enfermedades, se ha transformado en un paso importante en la resolución de varios conflictos taxonómicos. (Bejarano,2001, como se citó en Ayala, 2019, p.65-66).

7.9.8 Métodos de identificación

La identificación morfológica sirve como estándar de oro para la especificidad de los cebadores. Por lo tanto, los mosquitos utilizados para la extracción de ADN y el desarrollo de cebadores específicos de especies deben montarse en portaobjetos de microscopio e identificar morfológicamente. Las alas, la cabeza y el abdomen con genitales son cruciales para la verificación de la especie. El material restante se puede utilizar para la extracción del ADN del mosquito y el desarrollo de cebadores. (Stephan *et al.*, 2009, p.369)

La identificación morfológica de culicoides se realiza de forma rutinaria con la ayuda de claves morfológicas, que se refieren principalmente a los patrones de las alas, sensilas de los palpos y flagelos antenales. Las herramientas moleculares aplicadas a la taxonomía proporcionan un método rápido y eficaz de identificación de especies de vectores. (Ayala *et al.*, p. 1211)

7. 10 Control y vacunación de la enfermedad

Es de relevancia incluir diversas formas de prevención con el fin de evitar la proliferación de los vectores y la propagación de la enfermedad. Los ganaderos y el personal encargado del estudio de los animales, como es el caso específico de los veterinarios, pueden contribuir a disminuir la proliferación de los mosquitos, evitando que se formen charcos de agua en diferentes superficies u objetos, así como también un sinnúmero de técnicas dirigidas a disminuir la exposición del ganado al vector (Reyes *et al.*,2021).

Dando paso a uno de los puntos más importante para el control de la enfermedad la Center for Food Security & Public Health (2015) mencionan que:

Se controla principalmente mediante la vacunación. Las vacunas deben coincidir con el serotipo viral; la protección contra otros serotipos puede ser limitada o

inexistente. Actualmente se fabrican tanto vacunas atenuadas como muertas, y hay vacunas multivalentes disponibles. Las vacunas atenuadas se consideran más eficaces que las vacunas muertas; sin embargo, los mosquitos pueden transmitir estas cepas vacunales a animales no vacunados durante la temporada de vectores. (p.5)

Estas vacunas son fáciles y rápidas de producir produciendo una inmunidad de un año de duración, mediante el uso de una sola dosis en animales primo- vacunados, y han demostrado su eficacia en áreas endémicas, así como para reducir la circulación viral en brotes. (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019, p. 12)

Entre otros controles que se pueden desarrollar son los programas de vigilancia serológica basados en la utilización de animales “centinela”, a los que periódicamente se les extrae muestras de sangre para la detección del virus mediante técnicas de PCR, o mediante detección de anticuerpos. (López, 2012, p.37)

En la mayoría de los casos, se acepta que la vacunación es el método más eficaz para prevenir la transmisión de *Orbivirus* transmitidos por Culicoides. (Harrup *et al.*,2016)

VIII.- MATERIALES Y METODOLOGÍA

8.1 Lugar de estudio

El cantón Santa Ana de la provincia de Manabí en Ecuador, cuenta con un clima tropical seco con las estaciones invierno y verano, y temperaturas promedio de 26°C- 37°C, y 19, 36°- 31, 62° de temperatura respectivamente (Álava, 2017).

El cantón 24 de Mayo de la provincia de Manabí en Ecuador, con un clima de bosque seco en la parroquia Sucre y bosque seco tropical en el resto y una temperatura que oscila entre los 25°C- 35°C, y 20°- 30° de temperatura respectivamente (Ramírez, 2020).

El criterio de selección de las zonas se basó en el consentimiento de los ganaderos (**Ver anexo 3**), zonas de mayor producción ganadera, las condiciones ambientales y climáticas que condicionan la presencia del vector tales como presencia de humedad, riachuelos, ríos, arbustos, donde se encuentra gran cantidad de vectores, etc.

Para la toma de muestras se escogieron 6 predios, en los 2 cantones los cuales se encuentra en las siguientes coordenadas tomadas desde el software *UTM Geo Maps*:

Santa Ana

- Bonce: 568272.064E 9864846.949N 17M
- Viquije: 576831.346E 9861285.975N 17M
- La Unión: 591314.876E 9864682.998N 17M
- Monte Oscuro: 567292.217E 9864477.743N 17M

24 de Mayo.

- Bellavista: 579724.702E 9849925.003N 17M
- Tierra Negra: 580446.253E 9863970.046N 17M

Figura 8 Mapa de Santa Ana y de 24 de mayo



Nota. Adaptado de Mapa de Santa Ana y 24 de Mayo, por Álava ,2017.

8.2 Tiempo

Se desarrolló en la siguiente cronología:

Del 11 de abril al 01 mayo del 2022: Se procedió a la toma de muestras para diagnóstico serológico de 6 predios ganaderos, además del estudio del estado clínico de los bovinos muestreados a través de encuestas epidemiológicas y registros clínicos (datos generales, constantes fisiológicas, sintomatología) (**Ver Anexo 1 y 2**).

Del 10 de mayo al 08 de julio del 2022: Se realizó el muestreo entomológico para determinar la presencia y caracterización a nivel taxonómico

Del 13 de julio del 2022: Se realizó la determinación de la presencia de ARN del VLA en grupos de culicoides capturados en cada predio extracción de ARN de hembras del vector *Culicoides*

8.3 Tipo de estudio

El estudio es de tipo descriptivo transversal. Para selección de animales para la extracción de sangre se usó el método no probabilístico de conveniencia.

8.4. Cálculo de muestra

El número de animales a muestrear en cada predio se calculó según la fórmula establecida por Thrusfield (2008) para conocer si una enfermedad está presente en un grupo de animales.

$$n = \left(1 - (1 - P)^{\frac{1}{d}}\right) \cdot \left(N - \frac{d-1}{2}\right)$$

Donde:

N= tamaño de la población

d= número mínimo esperado de animales afectados en la población,

n= tamaño de muestra requerido;

P= probabilidad de encontrar al menos un caso en la muestra.

Donde la población total de ganado en las 6 fincas de los cantones de Santa Ana y 24 de Mayo fue de 840, tomando en cuenta una prevalencia mínima esperada del 5% dado a que se desconoce la prevalencia de la zona, con un intervalo de confianza del 95% y un porcentaje de error del 5%.

Donde:

N= 840

d= 5% (840/5%) =42

n= x

P= 0,95

n = {1 - 0,95}^{1/42} {840 - 42/2} + 1

El total de muestras fueron de 57 en base a la fórmula, sin embargo, debido a una amplia accesibilidad de muestreo y condiciones propicias, se tomaron 100 muestras en total.

Distribuidas a continuación:

Tabla 4 Predios, números de muestras totales.

PREDIOS	BOVINOS POR PREDIO	MUESTRAS
Bonce-Santa Ana	50	6
Monte Oscuro-Santa Ana	20	5
La Unión-Santa Ana	300	33
Visquije-Santa Ana	100	14
Tierras Negras-Santa Ana	70	9
Bellavista-24 de Mayo	300	33
Total	840	100

Figura 9 Ubicación de los predios estudiados



Nota. Adaptado de *Ubicación de los predios establecidos*, por Procesado de Geo UTM Maps y Google Maps,2022, <https://n9.cl/2b789>

8.5 Materiales Generales

Algodón

5 litros alcohol 70%

Guantes

Gradillas

Mandil

Cooler/hielera

Fase I

Reactivos y utensilios

100 tubos vacutainer con EDTA

5ml

100 tubos vacutainer sin EDTA

5ml

100 agujas vacutainer con EDTA

21G

50 jeringuillas 10ml

3 capuchones

Puntas de pipetas

Equipos

Microcentrífuga

Micropipetas capacidad (10µL-100 µL-200 µL)

Micropipeta multicanal de 100 -300 µL

Kits ELISA Competitivo para la determinación de anticuerpos contra el virus de la lengua azul (VMRD, SA)

Lector de placas para ELISA

Lavador de placas.

Fase II

Reactivos y utensilios	Equipos	Equipos informáticos
Frascos de colección	Trampa tipo CDC	Computador
Pinzas entomológicas	luz ultravioleta	Claves
Pipetas Pasteur	Batería 6v	taxonómicas de
Porta objetos	Malla de colección	identificación
Cubre objetos	Estéreo-microscopio	(Lucid Central
Caja portaobjetos x100	marca <i>Leica</i>	Key: Diptera of
Tubos eppendorf de 1,5 ml	Agitador Térmico	Australia
Etanol al 70%	Estufa	https://n9.cl/dy9ie).
Solución Hoyer (hidrato de cloral, goma arábica, glicerina)		
Ácido acético		

Fase III

Equipos y reactivos

Cabina de Bioseguridad tipo II A	Juego de primers y Sonda TaqMan®
Cabina de Bioseguridad para PCR	(marcada con FAM) específico para el gen de la proteína NS-2 de VLA
Bloque térmico	(Hoffmann et al., 2008)
Termociclador para PCR en Tiempo real Light Cycler (Roche)	Kit de q-PCR -RT en un solo paso (GoTaq® 1-Step RT-qPCR System, Promega, Corp.)
Vortex	Microtubos de 200 µl (calidad PCR).

Centrifuga para Microtubos hasta 12000 X g	Microplacas para el termocicador (Roche, SA) Puntas nuevas con filtro de 10, 100 µl y 1000 µl (calidad PCR)
Congelador de -20° C	
Utra congelador -86° C	
Refrigeradora 4°C	Micropipetas de alta precisión de 10, 20, 100 1000 µl
Kits de extracción RNA (High Pure Viral RNA Kit, Roche, S.A.)	Charola para hielo
Kits de extracción RNA (SV Total RNA Isolation System, Prmega Corp.)	Agua libre de nucleasas (ultrapura)
Trizol	
Cloroformo	

8.6 Métodos

Fase I

8.6.1 Toma de muestras, y diagnóstico serológico.

Se seleccionaron animales mayores de 6 meses de edad de ambos sexos con la finalidad de que no se encuentren anticuerpos maternos a VLA en el suero de los bovinos.

Según el estudio el kit ID Vet Elisa para detectar anticuerpos a VLA, tiene una especificidad del 99.3% y una sensibilidad del 100% (Niedbalski, 2011) Las muestras de sangre de los bovinos se obtuvieron por punción en la vena coccigea y yugular utilizando

tubos al vacío sin EDTA de 5ml para serología y con EDTA para análisis molecular se emplearon agujas de 21G, todo bajo la debida autorización y consentimiento. **(Ver Anexo 3).**

Las muestras para serología fueron centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, se extrajo el suero con una micropipeta y se colectó en microtubos estériles de 1.5 ml, posteriormente fueron empacadas y conservadas a -20 °C y enviados en caja isotérmica velando por el mantenimiento de la cadena de frío al Laboratorio de Diagnóstico Animal de Agrocalidad (Tumbaco, Quito) para su procesamiento. Para el análisis serológico, se utilizó un kit comercial (Kit ID Screen Bluetongue Competition) para la detección de anticuerpos anti-VP7, **(Ver en Anexo 4).**

El protocolo se detalla en **(Ver en Anexo 5).**

Análisis de la información

Se calculó el porcentaje de competición (S/N%), según la recomendación del fabricante aplicando la siguiente fórmula:

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

Tomado de: (ID.vet, 2020), muestras con un S/N%:

- Superior o igual al 40% son considerados negativos
- Inferior al 40% son considerados positivos.

Tabla 5 Interpretación de ELISA

Resultado	Statuto
S/N % ≤ 40%	POSITIVO
S/N % ≥ 40%	NEGATIVO

Nota. Adaptado de *Interpretación de Elisa*, por IDvet, 2020.

- Validación

El ensayo es válido si cumple con los siguientes requisitos, tomado de: (ID.vet, 2020).

La densidad óptica media del control negativo (DOcn) es superior a 0.7.

$$\text{DOcn} > 0.7$$

La densidad óptica media del control positivo (DOcp) es inferior a 0.3 del DOcn.

$$\text{DOcp/DOcn} < 0.3$$

Fase II

8.6.2 Captura y caracterización de especies de *Culicoides spp.*

Se incluyeron 4 de las fincas estudiadas: Bonce, Visquije y Monte Oscuro de Santa Ana y Bellavista de 24 de Mayo. Los criterios de selección para esta fase se dieron de acuerdo a la seropositividad dada, diferencia de geolocalización que fueron tomadas por el software *UTM Geo Maps* y posicionadas en Google Maps, esto nos ayudó a considerar parámetros de temperatura, humedad de la zona, vegetación y fuentes de agua.

8.6.2.1 Captura

Para la captura se empleó una trampa tipo CDC (**Ver en anexo 6**) con luz ultravioleta la que fue acomodada en árboles o zonas altas a 2 m de altura cerca de fuentes de agua o alta presencia de humedad y zonas de descanso del ganado, a partir de las 18:00 horas hasta las 5:00 horas del otro día por 3 noches consecutivos por granja durante el mes de mayo.

Posterior a ello, los insectos fueron llevados a los laboratorios de Diagnóstico Entomológico de Agrocalidad en la ciudad Manta para su identificación taxonómica, en frascos de boca ancha con alcohol al 70% para una mejor conservación.

8.6.2.2 Procesamiento de las muestras.

Se inició con la separación de cada muestra en una caja Petri, con asistencia de un estéreo-microscopio se lograron separar los culicoides de otros tipos de insectos

empleando diversas claves morfológicas y taxonómicas tales como *Lucid Central Key: Diptera of Australia*, y *Keys to the immature stages of some Australian Ceratopogonidae (Diptera)*, que resumen la identificación a partir de características antenales con segmentos alargados, ojos grandes desde la cara anterior, a las con patrones de pigmentación (Elson-Harris, 1990).

Luego se realiza una separación de los machos y las hembras tomando criterios de selección dados por González y Goldarazena (2011) a partir del tamaño, genitales, abdomen y porciones antenales, finalmente se seleccionaron hembras con presencia de sangre tomando en cuenta la coloración rojiza o café del abdomen para diagnóstico molecular de la presencia de VLA.

8.6.2.3 Montaje

Se desarrolló a partir de la técnica descrita por González y Goldarazena (2011), donde se aplicó un lavado previo con etanol al 70%, hidróxido de sodio y agua durante 15 a 20 minutos respectivamente que ayudó a aclarar a los ejemplares para una mejor observación. Luego de 12 horas en solución AGA (alcohol, ácido acético, glicerina y agua destilada), los ejemplares se colocaron en una caja Petri para realizar la disección de 3 porciones anatómicas; alas, cabeza y abdomen con la ayuda de alfileres entomológicos; inmediatamente se coloca una gota de solución Hoyer (**Ver en anexo 7**) y las partes obtenidas en un portaobjetos cuidadosamente en una orientación y posición correcta para finalmente colocar un cubreobjeto sin dejar presencia de burbujas en el interior.

Se procede a la rotulación respectiva y secado en una estufa a 49° -50° por 5 o 24 h, para evitar el deterioro se coloca un sellado a base esmalte sintético alrededor del cubreobjetos; una vez retiradas las placas de la estufa están listas para ser estudiadas al microscopio óptico.

8.6.2.4 Caracterización morfológica de especie.

Las identificaciones de especies se determinaron a partir de patrones alares, abdomen y genitales.

Se usaron como referencia las claves y estudios realizados en la región neotropical tales como: List of Culicoides biting midges (Diptera: *Ceratopogonidae*) from the state of Amazonas, Brazil, including new records (Farias et al., 2016), la clave de las especies de *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) asociadas con la ganadería en la región neotropical (Perruolo, 2009).

La identificación fue supervisada, evaluada y aprobada por el técnico encargado del Laboratorio de diagnóstico entomológico de Agrocalidad, ciudad Manta; el Ing José Velásquez, MgSc.

Análisis de la información.

Se procesaron los datos y tablas obtenidos en Excel, además se realizó el cálculo de abundancia relativa para determinar la cantidad de taxones estudiados en la caracterización del vector.

Donde:

Abundancia relativa: $\text{número de especies} / \text{número total de placas estudiadas} \times 100$

Se representaron de forma porcentual.

Fase III

8.6.3 Extracción del ARN a partir de *Culicoides* spp.

Se realizó con el kit (High Pure Viral RNA Kit) versión 20, para el aislamiento del ARN viral para RT-PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante y el protocolo INT/BM/25 del Laboratorio de Biología Molecular de Agrocalidad. **(Ver en Anexo 8).**

La extracción del ARN de los culicoides se realizó a partir de la selección de las hembras de *Culicoides* de las 4 fincas seleccionadas, tomando los criterios de la metodología de Fase I. Brevemente: Con las hembras de culicoides con presencia de sangre en la cavidad abdominal colectadas en cada uno de los predios Bonce, Monte Oscuro y Visquiye (de Santa Ana) y de Bellavista (de 24 de mayo) se prepararon 4 pooles de 50 culicoides. Cada uno de los pooles se colocó en microtubos con alcohol al 70% para su conservación, se rotularon, se conservaron a una temperatura -20 ° C y se llevaron al Laboratorio de Diagnóstico Animal de AGROCALIDAD (Quito) para su procesamiento. Se realizó la extracción de ARN de cada pool mediante la extracción con Trizol ayudado de un molino de bolas y purificación mediante minicolumnas cromatográficas comerciales. Se determinó la cantidad y pureza de los ARN obtenidos. El protocolo se detalla en el Anexo 9.

El ARN purificado de cada pool se analizó mediante un ensayo de RT-PCR en tiempo real en un solo paso, que utiliza un juego de primers y Sonda TaqMan®, que es específico para cualquier serotipo del VLA y tiene como diana el segmento 10 del VLA, que codifica para la proteína NS3 (Hoffmann *et al.*, 2008; WOAHA, 2022) y el juego de enzimas del Kit de q-PCR -RT en un solo paso (GoTaq® 1-Step RT-qPCR System, Promega, Corp.) utilizando el equipo Light Cyclor (Roche).

Análisis de la información.

Se procesaron los datos del ciclo umbral (ct) en forma de tablas con ayuda de excel y la presentación gráfica de los resultados de la curva de fluorescencia obtenida del termociclador de PCR en tiempo real.

IX.- RESULTADOS

9.1 Diagnóstico Serológico

Los resultados de las 100 muestras de bovinos mediante la prueba de Elisa competitiva arrojaron que el 100% de animales eran sero-reactores al virus de lengua azul. (Ver Anexo 19)

Tabla 6. Resultado del análisis de la presencia de anticuerpos al virus de la lengua azul mediante ELISA-c en bovinos de los predios seleccionados de Santa Ana y 24 de Mayo

Cantón	Lugar	N° ANIMALES	POSITIVOS	NEGATIVOS	%
Santa Ana	Bonce	6	6	0	6%
	Monte Oscuro	5	5	0	5%
	La Unión	33	33	0	33%
	Visquiye	14	14	0	14%
24 de Mayo	Bellavista	33	33	0	33%
	Tierras Negras	9	9	0	9%
	TOTAL	100	100	0	100%

9.2 Análisis de la captura e identificación de especies de *Culicoides* spp

Se obtuvieron varias muestras entomológicas se colectaron en microtubos de la siguiente forma: 14 en Bellavista, 8 en Bonce, 6 en Monte Oscuro y 3 en Visquije con 80 especímenes de culicoides en cada una de las muestras, siendo esta última la de menor número de insectos capturados por día de colecta. De esta forma se colectaron 2480 especímenes del género *Culicoides*.

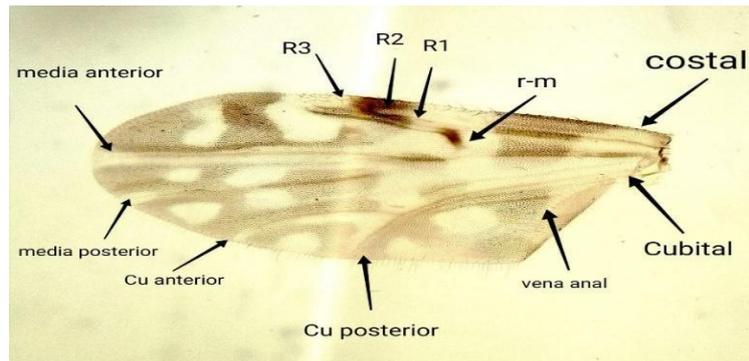
De acuerdo al trabajo de clasificación taxonómica realizado se pudieron identificar 6 especies diferentes dentro de todos los culicoides colectados cuya distribución fue: 62% de *C.insignis*, 15.48% de *C.crepuscularis*, 12% de *C.antunesis*, 7% de *C.batesi*, 1.8% *C.foxi* y 1,8% *C.diabolicus*.

Tabla 7 Especies de *Culicoides* identificadas en el estudio.

Especies de <i>Culicoides</i> identificadas de las zonas estudiadas			
Lugar	Especie	Abundancia total relativa	%
Bonce	<i>C.insignis</i>	173	7%
	<i>C.crepuscularis</i>	299	12,05%
	<i>C.antunesis</i>	85	3,42%
	<i>C.diabolicus</i>	42	1,7%
Bellavista	<i>C.insignis</i>	598	24,11%
Visquije	<i>C.insignis</i>	427	17,21%
	<i>C.batesi</i>	173	6,97%
	<i>C.foxi</i>	43	1,73%
Monte Oscuro	<i>C.antunesis</i>	213	8,58%
	<i>C.insignis</i>	342	13,79%
	<i>C.crepuscularis</i>	85	3,42%
TOTAL		2480	100%

Los resultados de identificación morfológica y taxonómica obtenidos se dan a partir de la utilización del patrón alar teniendo como principal herramienta las nerviaciones y pigmentaciones de esta estructura para la diferenciación de las especies de *Culicoides*.

Figura 10 Ala de una hembra de la especie *C. insignis*

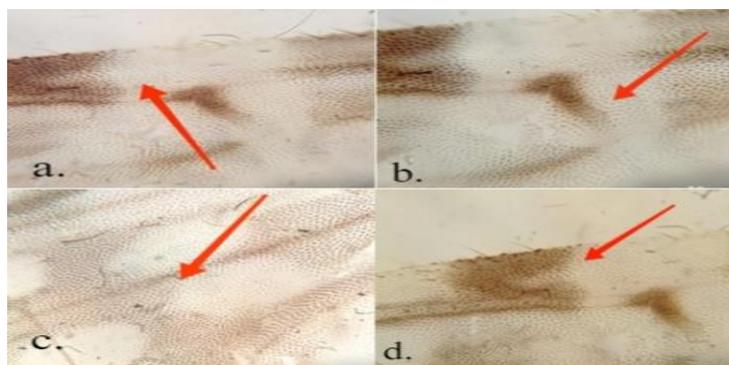


Nota: Ala de una hembra de la especie *C. Insignis*, donde se presentan las diferentes nerviaciones y bordes alares. R1: primera celda radial, R2: segunda celda radial, R3: tercera celda radial; RM, vena transversal, M, M1, M2: medial posterior y anterior; Cu: borde cubital y An: vena anal.

9.2.1 Caracterización de *C. insignis*

Basándonos en la clave taxonómica propuesta por Perruolo, J (2009) y Farias *et.al* (2016) se identificó el patrón alar de *C.Insignis*.

Figura 11 Caracterización de *C. insignis*

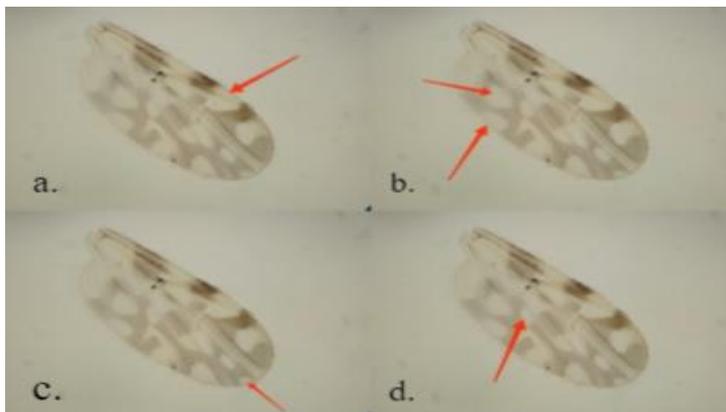


Nota: a.Segunda celda radial total o principalmente incluida en una mancha agotada; b. Vena trasnversal rm oscura, extendida a ambos lados de la vena M2 continua, noveno tergito masculino sin hendidura mesal, apicolateral; c. celda m1 con una mancha pálida distal; d. vena r3 oscura hasta el punto donde gira para encontrarse con la vena costal.

9.2.2 Caracterización de *C. diabolicus*

Basándonos en la clave taxonómica propuesta por Perruolo, J (2009) y Farias *et.al* (2016) se identificó el patrón alar de *C. diabolicus*.

Figura 12 Caracterización de *C. diabolicus*

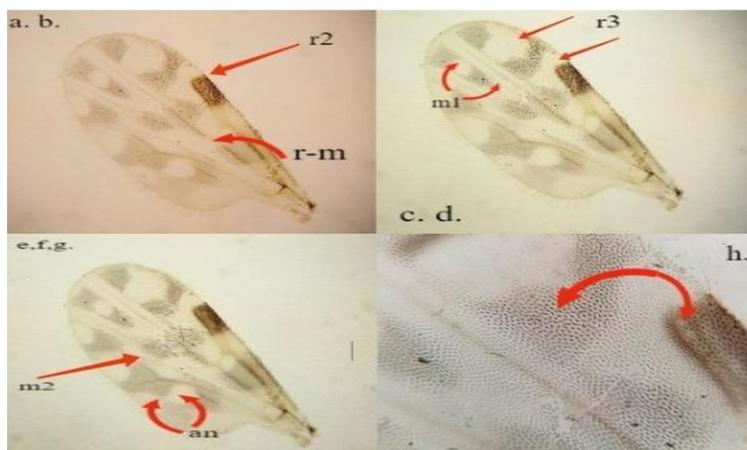


Nota: a. Segunda celda radial en macula blanca; b. Celda anal con dos manchas claras; c. Celda m1 con área clara en borde de ala; d. Mancha clara sobre bifurcación vena CuA grande.

9.2.3 Caracterización de *C. crepuscularis*

Basándonos en la clave taxonómica propuesta por Perruolo, J (2009) y Farias *et.al* (2016) se identificó el patrón alar de *C. crepuscularis*.

Figura 13 Caracterización de *C. crepuscularis*



Nota: a. Vena r-m no pigmentada; b. Segunda celda radial en macula oscura; c. Celda r3 con dos áreas claras; d. Celda m1 más de una macula blanca; e. Vena M2 no abrazada por área clara; f. Celda anal con una mancha blanca; g. Alas con microtriquias abundantes.

9.2.4 Caracterización de *C. foxi*

Basándonos en la clave taxonómica propuesta por Rossi *et. al* (2002), se identificó el patrón alar de *C. foxi*.

Figura 14 Caracterización de *C. foxi*

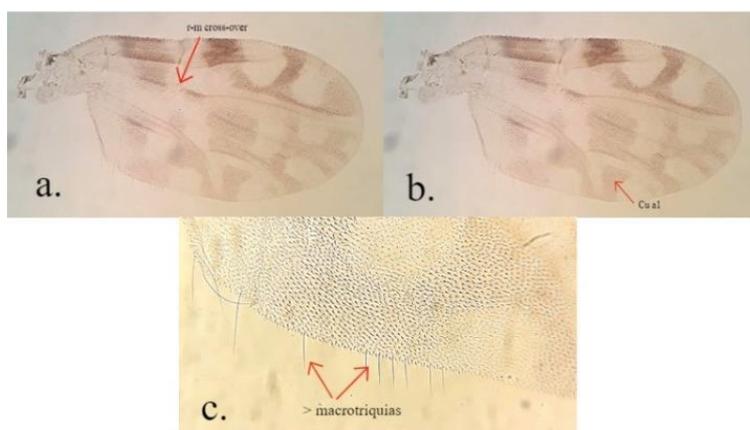


Nota: a.b. Alas grandes con áreas blancas nítidas; c.d. Transversal en la celda r3 que se encuentra ampliamente con el margen del ala; Prolongación vena r3 pigmentada; Pigmentación en la curvatura de la vena r3.

9.2.5 Caracterización de *C. Batesi*

Basándonos en la clave taxonómica propuesta por Rossi *et. al* (2002) se identificó el patrón alar de *C. Batesi*.

Figura 15 Caracterización de *C. Batesi*

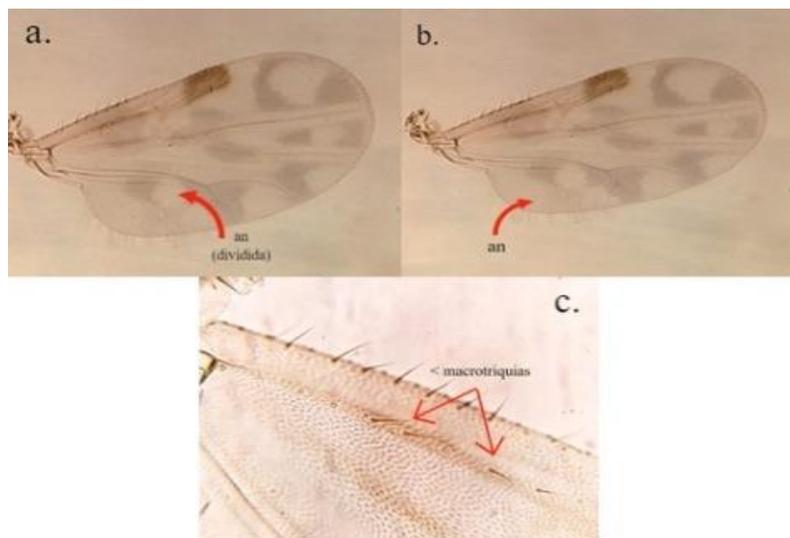


Nota: a. Vena r-m cruzada ligeramente oscura; b. Ápice oscuro de la vena Cu1; c. Macrotriquias presente en el tercio distal.

9.2.6 Caracterización de *C. antunesi*

Basándonos en la clave taxonómica propuesta por Perruolo, J (2009) y Farias *et.al* (2016), se identificó el patrón alar de *C. Antunesi*.

Figura 16 Caracterización de *C. antunesi*



Nota: a. Área clara celda anal dividida, b. Celda anal con una mancha blanca; c..., c. Alas con microtriquias escasas

9.3. Análisis de los grupos de Culicoides de todas las fincas mediante RT- PCR en tiempo real.

El ARN obtenido a partir de grupos (*pooles*) de 50 culicoides de cada finca tuvo una concentración entre 26.11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -35.52 y la relación $\text{D.O}_{260}/\text{DO}_{280}$ era mayor de 1 por lo que la calidad era apta para el análisis por PCR.

Cada uno de los ARN obtenidos se analizó en una corrida de RT PCR en un solo paso para determinar la presencia de ARN de VLA.

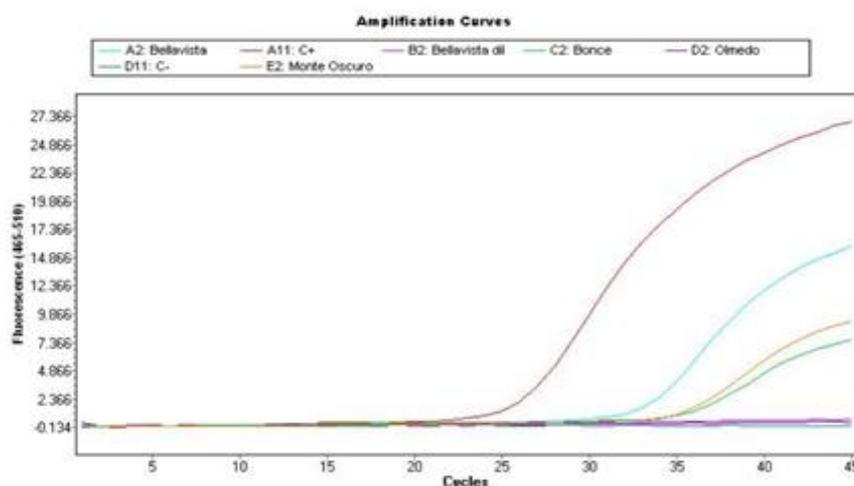
Tabla 8 Resultado del análisis por RT PCR en tiempo real para detectar el ARN de VLA de 1 pool de Culicoides (50) colectados por predio predios de Santa Ana y 24 de Mayo.

Zona/Finca	Ct*	Resultado
Bellavista-24 de Mayo	33.11	+
Bonce-SA	35.53	+
Monte Oscuro-SA	35.22	+
Visquiye-SA	0	-
C+	26.11	+

* (Ct= Ciclo Umbral) *(SA=Santa Ana)

Según se observa en la tabla 2 en tres de las fincas se detectaron niveles de Ct (Ciclo umbral) menores de 40 y levantaron una característica curva de incremento de fluorescencia en el tiempo (Fig 17) lo que corresponde con una lectura positiva. Luego podemos decir que los culicoides de tres fincas contenían ARN de VLA (Bellavista, Bonce y Monte Oscuro respectivamente). Sin embargo, los Culicoides colectados en Olmedo no contenían niveles detectables de VLA.

Figura 17 Curvas de fluorescencia de la corrida de RT PCR en tiempo real para detectar el ARN de VLA en los grupos de Culicoides de cada predio.



Nota. Adaptado de, *Curvas de fluorescencia de la corrida de RT PCR en tiempo real para detectar el ARN de VLA en los grupos de Culicoides de cada predio*, por Centeno y Chiliquinga, 2022.

X.- DISCUSIÓN

La lengua azul se considera una enfermedad endémica limitada a las latitudes tropicales y subtropicales (N. J. MacLachlan, 2004) donde el vector encuentra condiciones óptimas para el desarrollo de su ciclo de vida. Manabí es una provincia con clima tropical y que a su vez se ve influenciado por corrientes marinas; en la época lluviosa (diciembre a mayo), el clima es húmedo con la formación de varios depósitos naturales de agua de lluvia que benefician las condiciones ambientales para el ciclo de vida del vector culicoides, por lo cual es una provincia con las características ambientales/climáticas para el desarrollo de infecciones del virus.

Todos los animales investigados en las fincas fueron positivos por ELISA-c similar a los reportes de Verdezotto *et al.* (2017) que encontraron que el 98,9 % de 295 bovinos investigados eran seropositivos sin síntomas de la infección entre Pichincha, Santo Domingo y Napo, mientras que De La Torre *et al.* (2021) halló una seroprevalencia de 99,1 % de un total de 430 muestras de suero bovino procedentes de 37 predios situados en 9 parroquias de Chone.

Estudios en América Latina, de Gibbs *et al.* (1983) encuentra una seroprevalencia de VLA del 70% en bovinos de siete países en América. En Cuba, con un clima similar al de Manabí, la prevalencia reportada fue del 99,7% (Martínez *et al.*, 2011) y en Sao Paulo un 100% en la investigación desarrollada por Da Silva *et al.* (2018).

Dado que en el caso del virus de la lengua azul el número de animales con anticuerpos anti VP 7 revelados por ELISA de competición, correlaciona muy bien con el número de animales infectados (OMSA, 2018), podemos inferir que la enfermedad se ha vuelto endémica en Manabí (Da Silva *et al.*, 2018) y es que probablemente este acontecimiento

está influenciado por el aumento del perfil ganadero en la zona de estudio y de las masivas actividades de compra-venta de ganado a nivel nacional e internacional tomando a consideración que existe una ausencia evidente de las medidas de vigilancia que comprenden el monitoreo entomológico, serológico y virológico del VLA, todo esto explica la alta cantidad de ganado seropositivos y la abundancia de las especies del vector implicadas en las transmisión del virus.

Con la utilización de una trampa CDC con luz ultravioleta colocada en cada predio, se colectaron 2480 Culicoides, procedentes de 4 fincas de los cantones Santa Ana(Bonce, Monte Oscuro, Visquiye) y 24 de mayo (Bellavista), en la provincia de Manabí. En los culicoides colectados, se identificaron 6 especies que son *C. insignis*, *C. crepuscularis*, *C. antunesis*, *C. batesi*, *C. foxi* y *C. diabolicus*,

Estudios similares se evidenciaron con Perruolo (2018), donde en Venezuela colectó 2610 ejemplares de culicoides de los cuales se registraron las especies: *C. insignis* y *C. foxi*.. Una investigación realizada en Brasil por Da Trindade (2010), menciona que se colectaron 1718 ejemplares del género culicoides de las especies *C. batesi* y *C. foxi*, el método de captura de los dípteros fue a través de una lámpara o trampa CDC y colectas sueltas. En Ecuador según Gualapuro (2013), se han registrado 65 especies de culicoides de los cuales se han identificado los siguientes: *C. insignis*, *C. foxi*, *C. diabolicus*.

Según Torres (2014), se colectaron 3317 especies de culicoides en 5 provincias de Ecuador (Esmeraldas, Pichincha, Manabí, Bolívar y Santo Domingo), exclusivamente en Manabí abordó la zona norte (Pedernales, Junín y El Carmen) donde halla 2 especies de culicoides ;en total el identificó 18 especies de culicoides: *C. batesi*, *C. carpenteri*, *C. castillae*, *C. diabolicus*, *C. filarifer*, *C. foxi*, *C. glabellus*, *C. guttatus*, *C. heliconiae*, *C. hylas*, *C. insignis*, *C. leopoldoi*, *C. limai*, *C. ocumarensis*, *C. pifanoi*, *C.*

pseudodiabolicus, *C. pusillus* y *C. tetrathyris*, de las cuales 4 de estas especies coincide con el reporte de nuestro estudio donde *C.diabolicus*, *C.insignis* y *C.foxi* son consideradas como especies antropofílicas (Gualapuro,2013) , exceptuando que *C.crepuscularis* y *C.antunesis* son especies reportadas por primera vez en la provincia Manabí y Ecuador con esta investigación.

Sin embargo aparte de *C.insignis* no existe el reporte de que las otras 5 especies encontradas tengan relación con la transmisión del virus en el Ecuador o provincia ,de tal manera es importante emprender en próximos estudios la investigación de aquellas principales especies de *Culicoides* implicadas en la transmisión de Lengua Azul, tomando como base las especies reportadas en los cantones estudiados de la presente investigación.

Como se había detallado fue la especie más predominante *C. insignis* con un 62% de abundancia. En los 4 predios el *C. insignis* se distribuye de la siguiente forma: Bonce 7%, Visquije 17,21%, Bellavista 24,11% y Monte Oscuro 8,58%; otras especies capturadas con poca frecuencia y cantidad fueron *C. crepuscularis* con 15.48%, *C. antunesis* 12%, el 7% *C. batesi*, el 1,8% *C. foxi* y el 1.8% *C. diabolicus*. En uno de los predios solo se encontró una de las especies que fue *C. insignis* esto se debe a la gran influencia de las condiciones climáticas, intensa humedad que favorecen la replicación del vector. *C. insignis* es una de las especies más virulentas y la que más se ha implicado como vector de VLA en la transmisión del virus.

Es por esta razón que se encuentra en mayor abundancia en todos los predios acontecimiento que se relaciona a la alta seropositividad obtenida. Estudios similares como el de Perruolo (2018) en Venezuela detalla que la especie *C. insignis* fue la más representativa en 3 lugares en donde se presentó con una abundancia alta en las zonas: Guayabo 74,0%, Machiques 69,7% y Villa del Rosario 85% siendo también especie

potencial del vector en este estudio, así como en diversos países neotropicales: Barbados 26%, (Greiner et al, 1990); Brasil 61,6%, (Laender et al. ,2004); Colombia 98,6%, (Homan et al 1985); Puerto Rico, Costa Rica, Honduras y Panamá 95%, (Sáenz y Greiner , 1984). Según Navarro (2017) en Perú se capturaron las siguientes especies de culicoides las cuales son; *C. insignis*, *C. foxi* y *C. diabolicus*, una de las especies más abundante fue el *C. insignis* con un 94,8%, donde expuso que es la especie de mayor circulación en América del Sur.

De tal forma Navarro (2017) menciona que la presencia de *C. insignis* sugiere el posible rol de *C. insignis* como potencial vector para la transmisión de VLA en los ovinos de las granjas peruanas donde se realizó el estudio. Considerando la abundancia de *C. insignis* hembras en las granjas de ovinos y que ha sido demostrado su competencia como vector del VLA.

Como resultado del análisis por RT PCR en tiempo real del ARN extraído de 1 pool (50 u) por 4 fincas, se detectó ARN del virus de la lengua azul en los culicoides de tres de las fincas estudiadas (Bellavista, Bonce, Monte Oscuro).

Este hallazgo hasta el momento no había sido reportado a nivel de provincia ni país en ninguna investigación y resulta de suma importancia para el avance del control en la vigilancia epidemiológica.

La velocidad y el alcance de la difusión del VLA dependen en gran medida de la presencia y abundancia de poblaciones de Culicoides competentes (Vanbinst et al, 2009) por lo que es muy importante que se investigue las diferentes especies del vector en todo el territorio ecuatoriano e identificar los diferentes serotipos del VLA que circulan

en Ecuador, para diseñar un programa de control basado en la vacunación y el control por fumigación emergente para la erradicación de su vector.

El virus de la lengua azul presenta una alta variación antigénica con más de 27 serotipos distintos, se ha observado que la patogenicidad entre cepas es diferente y se ha relacionado con el serotipo, por lo que la determinación del serotipo es una necesidad, sobre todo, para poder controlar el virus mediante la vacunación con un serotipo homólogo.

En Ecuador se desconocen los serotipos circulantes, solamente Verdezoto et al. (2017) han podido determinar el serotipo de tres aislados de VLA obtenidos de muestras de sangre de bovinos en la parroquia andina (Alluriquin) de la provincia de Santo Domingo y fueron serotipos diferentes. El serotipo circulante en Manabí con un clima y relieve geográfico tan diferente puede ser otro, por lo que es muy necesario el aislamiento y posterior serotipificación de los serotipos de VLA de Manabí

XI.- CONCLUSIONES

1. Se determinó que el 100 % de los bovinos investigados en las seis fincas estudiadas eran seroreactores por ELISAc en los predios estudiados de Santa Ana y 24 de Mayo.
2. Se identificaron 6 especies de *Culicoides* entre los 2840 especímenes colectados en 3 predios de Santa Ana y uno de 24 de Mayo.
3. Por primera vez para Ecuador se demostró que se cumple el ciclo epidemiológico del virus, pues se encontraron *Culicoides* hembras infectadas con el virus de la lengua azul en dos predios de Santa Ana y uno de 24 de Mayo.

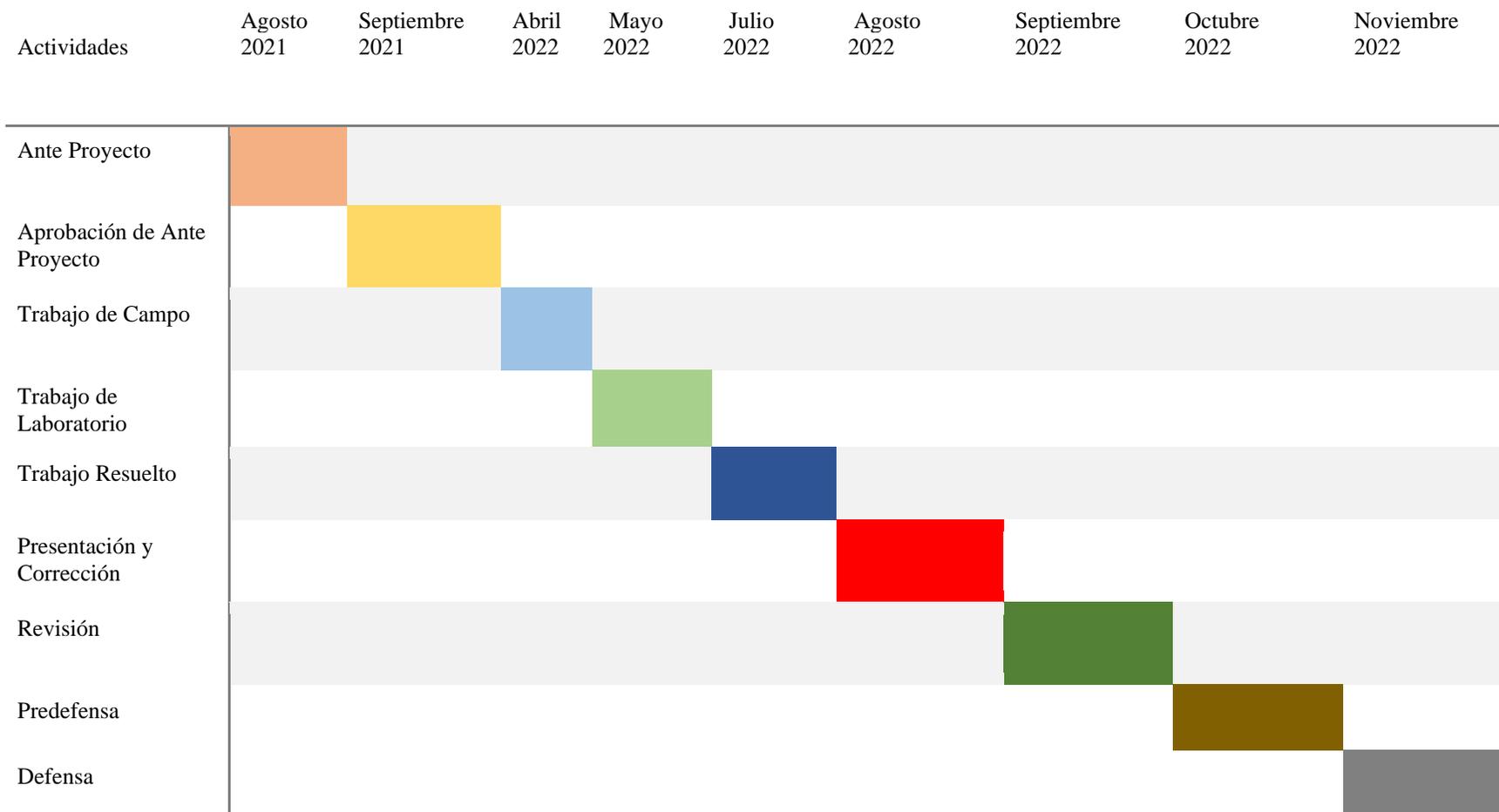
XII.- RECOMENDACIONES

1. Utilizar la colecta de *Culicoides* de diferentes regiones de Ecuador y su análisis por PCR de VLA para la identificación de los serotipos prevalentes en Ecuador
2. Empezar el estudio de aquellas especies de *Culicoides* implicadas en la transmisión de Lengua Azul, tomando como base las especies reportadas en esta investigación.
3. Aumentar las relaciones interinstitucionales para promover la capacitación y el entrenamiento a futuros investigadores, tesis en áreas relacionadas a la epidemiología, técnicas de diagnóstico y entomología que son esenciales para obtener mayores avances de la situación de la enfermedad en nuestra provincia.

XIII.- PRESUPUESTO

Descripción	Cantidad	Valor Total
Materiales de laboratorio	-	200
Transporte	-	80
Kit PCR- rt	1	400
Materiales de Limpieza	-	20
Alimentación	-	40
Otros	-	30
		770

XIV. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES



XV.-BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, P., Estrada, R., Carmona, V., Calvete, C., & Lucientes, J. (2016). Composición faunística y dinámica poblacional de los Culicoides (diptera: ceratopogonidae). *Revista de Castilla-la Mancha, canales de biología*, 38, 37-61. doi: <http://dx.doi.org/10.6018/analesbio.38.04>
- Alarcón, P. (2015). Estudio de los dípteros mamófilos del género *Culicoides* Latreille, 1809 (diptera, ceratopogonidae) potenciales vectores de patógenos. Universidad de Zaragoza.
- Álava, R. (2017). Situación actual de la ganadería de Manabí. Unidad de proyectos de la dirección de fomento del Gobierno Provincial de Manabí. Obtenido de <https://es.slideshare.net/rafa8911/ganaderia-manabi>.
- Amador, C., Paipa, P., Salazar, M., & Triviño, L. (2015). *Culicoides*. Universidad de la Salle. Obtenido de <https://es.slideshare.net/paolapaipa9/culicoides-53256590>
- Ayala, M. (2019). Taxonomía molecular aplicada al estudio de *Culicoides insignis* Lutz (diptera:ceratopogonidae) en la provincia de Misiones. Universidad Nacional de Misiones. Obtenido de https://rid.unam.edu.ar/bitstream/handle/20.500.12219/2367/AYALA%20Mahia%20Mariel_2019_%20Taxonom%C3%ADa%20molecular%20aplicada%20al%20estudio%20de%20Culicoides....pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ayala, M., Díaz, F., Micieli, M., Spinelli, G., & Ronderos, M. (2022). Rapid and efficient detection by pcr of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae), the main vector of bluetongue virus (btv) in the neotropical region. *J Med Entomol*, 13;59(4), 1211-1216. doi:10.1093/jme/tjac06.
- Bhattacharya, B., Noad, R. J., & Roy, P. (2007). Interaction between bluetongue virus outer capsid protein vp2 and vimentin is necessary for virus egress. *Virology Journal*, 4(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1743-422x-4-7>
- Bonet, J. (2014). Determinación del complejo *Culicoides obsoletus*, vectores de la enfermedad de la lengua azul, mediante técnicas morfológicas y moleculares. Universidad de les Illes Balears.
- Borket, A. & Spinelli, R. (2007). *Neotropical Ceratopogonidae (Diptera:insecta)*. obtenido de: Pensoft.
- Bowman, D., Lynn, R., & Eberhard, M. (2004). *Parasitología para veterinarios* (Octava ed.). ELSEVIER. Obtenido de <http://www.fmvz.uat.edu.mx/Libros%20digitales/Parasitolog%C3%ADa%20para%20Veterinarios%20,%20p%C3%A1g.1-81%20-%20Dwight%20D.%20Bowman.pdf>.

- Da Silva, T.G.; Lima, M.S.; Spedicato, M.; Carmine, I.; Teodori, L.; Leone, A.; Martins, M.S.N.; Buchala, F.G.; Hellwig, K.S.; de Campos, A.H.; *et al.* (2017) Prevalence and risk factors for bluetongue in the State of Sao Paulo, Brazil. *Vet. Med. Sci.* 280–287.
- Da Trindade, R. (2010). (*Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides*), luego de la estación de lluvias, en la reserva de desarrollo sostenible itatupã-baquiá, gurupá, pará, brasil. Obtenido de: scielo; http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v1n2/es_v1n2a15.pdf.
- De la Torre, E., Moreira, N., Saegerman, C., De Clercq, K., Salinas, K., Maldonado, A., . . . Barrera, M. (2021). Bluetongue virus infections in cattle herds of manabí province of ecuador. *Pathogens*, 10(11). doi:10.3390/pathogens10111445
- Delgado, D., & Macías, R. (2020). Presencia de infecciones por el virus de la lengua azul en predios con elevada mortalidad en bovinos del cantón chone de la provincia Manabí. Universidad Técnica de Manabí.
- Diéguez, F. (2015). Análisis de riesgo de lengua azul en Galicia. Universidad de Santiago de Compostela.
- Diz, O. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Npunto*, 11(30), 88-111. Obtenido de <https://www.npunto.es/content/src/pdf-articulo/5f69a919884e7Art5.pdf>
- Elson-Harris, M. (1990). Keys to the immature stages of some Australian Ceratopogonidae (Diptera). En W. O. library., *Australian Journal of Entomology* (págs. 267-275).
- Escandón, A. (2011). Lengua azul en bovinos. Universidad de Cuenca. Obtenido de <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3058/1/mv174.pdf>
- Farias, E., Almeida, J., & Pessoa, F. (2016). List of Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from the state of Amazonas, Brazil, including new records. *Check List Luis Felipe Toledo*, 12(6), 2002. doi: <https://doi.org/10.15560/12.6.2002>
- Ferrer, L., & Ortín, A. (2020). Ectima contagioso ovino: estudio bibliográfico y análisis de la enfermedad. Universidad Zaragoza. Obtenido de <https://zaguan.unizar.es/record/96435/files/TAZ-TFG-2020-3780.pdf>
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2021). Lengua azul (fiebre catarral ovina). Elika. Obtenido de <https://ganaderia.elika.eus/fichas-de-enfermedades-animales/lengua-azul-fiebre-catarral-ovina/>
- Garros, C., Balenghien, T., Carpenter, S., Delécolle, J., Meiswinkel, R., Pédarrieu, A., . . . Cêtre-Sossah, C. (2014). Towards the PCR-based identification of Palaearctic Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): results from an international ring trial targeting four species of the subgenus Avaritia. *Parasites & Vectors*, 7(223), 1-9. Obtenido de <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/223>.
- Gerry, C., Mullens, A., MacLachlan, J., Mecham, J. (2001). Seasonal transmission of bluetongue virus by *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) at a southern California dairy and

evaluation of vectorial capacity as a predictor of bluetongue virus transmission. Obtenido de: Entomol.

Gibbs, E.P., Greiner, E.C., Alexander, F.C., King, T.H., Roach, C.J.(1983) Serological survey of ruminant livestock in some countries of the Caribbean region and South America for antibody to bluetongue virus. Vet Rec. 113, 446-448.

Givens MD. Review: Risks of disease transmission through semen in cattle. Animal. 2018 Jun;12(s1): s165-s171. doi: 10.1017/S1751731118000708. Epub 2018 Apr 18. PMID: 29665869.

Gonzalez, M. &. (2011). El género culicoide en el país Vasco. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco.

González, M. (2020). Los ceratopogónidos y su importancia en sanidad humana y animal. Universidad de Sevilla. Obtenido de <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/104111/GONZALEZ%20CARRASCO%20MARI%20JOSE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

González, M., & Goldarazena, A. (2011). El género culicoides en el país Vasco. Guía práctica para su identificación y control. Gobierno Vasco.

Gualapuro, M. (2013). Contribución al estudio de la fauna de Culicoides (*Diptera: Ceratopogonidae*) en la zona norte del Ecuador. Universidad San Francisco de Quito.

Guimaraes, L.L.B.; Rosa, J.C.C.; Matos, A.C.D.; Cruz, R.A.S.; Guedes, M.I.M.C.; Dorella, F.A.; Figueiredo, H.C.P.; Pavarini, S.P.; Sonne, L.; Lobato, Z.I.P. (2017) Identification of bluetongue virus serotypes 1, 4, and 17 co-infections in sheep flocks during outbreaks in Brazil. Res. Vet. Sci., 113, 87–93.

Greiner, C., Garris, G., Rollo, T., Knausenberger, W., Jones, E. (1984). Preliminary studies on the Culicoides spp. As potential vectors of bluetongue in the Caribbean region.

Greiner, E.C.; Alexander, F.; Roach, J.; John, S.T.; King, T.; Taylor, W.; Gibbs, E.P.J. (1990) Bluetongue epidemiology in the caribbean region: serological and entomological evidence from a pilot study in barbados. Med. Vet. Entomol. 4: 289-295.

Harrup, L., Miranda, M., & Carpenter, S. (2016). Advances in control techniques for Culicoides and future prospects. Veterinaria Italiana, 52(3-4), 247-264. doi:10.12834/VetIt.741.3602.3

Harrup, L., Purse, B., Golding, N., Mellor, P., & Carpenter, S. (2013). Larval development and emergence sites of farm-associated Culicoides in the United Kingdom. Medical and Veterinary Entomology, 27(4), 441- 449. doi:10.1111/mve.12006.

Homan, J., Lorbacher, H., Donato, A., Taylor, W., Yuill, T. (1985). Preliminary survey of the epidemiology of bluetongue in Costa Rica and northern Colombian.

- Ibatá, M., Londoño, L., & Echeverry, J. (2020). Estado actual de la lengua azul en el mundo. Universidad Tecnológica de Pereira. Obtenido de <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/8c034872-78f7-4de5-bf1c-146fec084251/content>
- INEC. (2021). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua 2020. Obtenido de cuadrencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Presentacion%20ESPAC%202020.pdf
- Joardar, S., Barkataki, B., Halder, A., Lodh, C., & Sarma, D. (2013). Seroprevalence of bluetongue in north eastern Indian state- Assam. *Veterinary World*, 6(3), 196. doi:<https://doi.org/10.5455/vetworld.2013.196-199>.
- Laender, O., Silva-Ribeiro, E., Guimarães, A., Lobato, Z., Felipe -Bauer, M. (2004). Levantamiento de las especies de Culicoides Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) encontradas al norte de Minas Jequitinhonha del valle Mucuri, Minas Gerais, Brasil.
- Lobato, Z., Maldonado, M., & Diniz, A. (2015). Bluetongue and other orbiviruses in South America:gaps and challenges. *Veterinaria Italiana*, 51(4), 253-262. Obtenido de file:///C:/Users/TwR./Downloads/BT_conference_2-with-cover-page-v2.pdf
- López, R. (2012). Estrategias de control y competencia vectorial de las especies de culicoides vectores del virus de la lengua azul en península ibérica y baleares. *Universitat de les Illes Balears*.
- López, W., Nicoletti, P., & Gibbs, E. (1985). Antibody to bluetongue virus in cattle in Ecuador. *Tropical Animal Health and Production*, 17(82). Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02360776>.
- Lucientes, J., Calvete, C., Estrada, R., Miranda, M., Del Rio, R., & Borrás, D. (2008). Los vectores de la lengua azul: conocimientos básicos de su bioecología. El programa nacional de vigilancia entomológica de la lengua azul en España. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón.
- MacLachlan, N., Barthold, S., Swayne, D., Winton, J., & Dubovi, E. (2017). *Fenner's Veterinary virology (fifth edition ed.)*. ELSEVIER.
- Maclachlan, N. J. (2011) Bluetongue: History, global epidemiology, and pathogenesis. *Preventive Veterinary Medicine*. 107-111.
- Martínez, N., Alfonso, A., Barrera, M. Primer reporte de bovinos seroreactores al virus lengua azul en Cuba. *Rev. Salud Anim.*, 2011, 33, 131-133.
- Ministerio de Agricultura. (2016). Ficha técnica lengua azul. Gobierno de Chile. Obtenido de https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/f_tecnica_lengua_azul_2016.pdf
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2015). El sector agropecuario ecuatoriano: análisis histórico y prospectiva a 2025. MAGAP. Obtenido de <http://www.competencias.gob.ec/wp-content/>

- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2019). Manual práctico de operaciones en la lucha contra la lengua azul. Secretaría general de agricultura y alimentación.
- Moreira, N. (2019). Estudio epidemiológico de lengua azul en bovinos con elevada mortalidad y presencia de anticuerpos adquiridos, en Chone, Ecuador. Universidad Técnica de Manabí.
- Mullo, B. (2014). Identificación de las preferencias alimenticias de la fauna del género ulicoides (Diptera: Ceratopogonidae) de la Estación de Biodiversidad Tiputini. Universidad San Francisco de Quito. Obtenido de <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/3796/1/112513.pdf>
- Navarro, D. (2017). Identificación de culicoides spp. como vectores del virus lengua azul en áreas ovinos seropositivos de Pucallpa, Ucayali. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Niedbalski, W. (2011). Evaluation of commercial ELISA kits for the detection of antibodies against bluetongue virus. Polish Journal of Veterinary Sciences, 14(4), 615-619. doi: <https://doi.org/10.2478/v10181-011-0091>
- OMSA. (2021). Código sanitario para los animales terrestres. Obtenido de https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_bluetongue.pdf
- Olvera, D. (2012). Lengua azul. Sanidad Animal. Obtenido de <https://www.sanidadanimal.info/es/103-enfermedades-emergentes/374-lengua-azulla>.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018). Infección por el virus de la Lengua Azul. Manuel Terrestre. Obtenido de <https://www.woah.org/es/que-hacemos/sanidad-y-bienestar-animal/enfermedades-animales/>
- Ortíz, I. & León, A. (1955). Los culicoides (*Diptera: Ceratopogonidae*) de la República del Ecuador. Quito. Obtenido de: Casa de la Cultura Ecuatoriana.
- Perruolo, G. (2009). Clave de las especies de culicoides (*Diptera: Ceratopogonidae*) asociadas con la ganadería en la Región Neotropical. Revista Científica, FCV-LUZ, XIX (2), 124-133. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/959/95911642004.pdf>
- Pino, M. (2017). Manabí provincia pionera del Ecuador en tenencia de ganado, no destaca en producción de leche. Contribuciones a las Ciencias Sociales. Obtenido de <https://www.eumed.net/rev/ccss/2017/01/manabi.html#:~:text=Manab%C3%AD%20es%20la%20provincia%20que,de%20leche%20a%20nivel%20nacional>.
- Purse, B., Carpenter, S., Venter, G., Bellis, G., & Mullens, B. (2015). Bionomics of temperate and tropical Culicoides Midges: Knowledge Gaps and Consequences for Transmission of Culicoides-Borne Viruses. Annual Review of Entomology, 60.

- Purse BV, Mellor PS, Rogers DJ, Samuel AR, Mertens PP, Baylis M. 2005. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat Rev Microbiol* 3: 171-181. doi: 10.1038/nrmicro1090.
- Reyes, P., Pinto, E., & Granados, J. (2021). Bluetongue virus: revision, current status and distribution of the vector. Universidad de Santander.
- Rodríguez, J. (2007). Las causas de la lengua azul. Adiveter. Obtenido de https://www.adiveter.com/ftp_public/A1071207.pdf
- Rossi, G., Mariluis, J., Schnack, J., & Spinelli, G. (2002). Dípteros vectores (culicidae y calliphoridae) de la provincia de Buenos Aires. *Probiota:Cabiota*.
- Sáenz, M.R.; Greiner, E.C. (1994). Culicoides aspirated from cattle in Costa Rica, Honduras, Panamá and Puerto Rico and their role as potential vectors of bluetongue viruses. *Med. Vet. Entomol.* 8 (1): 15-19.
- Sánchez Cordón, P., Rodríguez Sánchez, B., Pedrera, M., Risalde, M., Molina, V., Ruiz, E., . . . Gómez, J. (2008). El virus de la lengua azul como modelo para el estudio de los orbivirus. *Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 21(1), 52-61.
- Sánchez, A., Grande, A., Rodríguez, B., & Sánchez-Vizcaíno, J. (2008). Relación entre los serotipos de lengua azul y su vector, en Europa y cuenca mediterránea. *RCCV*, 2(2), 45-53.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2006). Manual de procedimientos lengua azul. Sitio Argentino de producción animal. Obtenido de https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/comun_varias_especies/61-Manual_Lengua_Azul.pdf
- Stephan, A., Clausen, P.-H., Bauer, B., & Steuber, S. (2009). PCR identification of *Culicoides dewulfi* midges (*Diptera: Ceratopogonidae*), potential vectors of bluetongue in Germany. *Parasitol Res*, 361-371. doi:10.1007/s00436-009-1407-z
- Terrestre, M. (2021). Enfermedad hemorrágica epizootica. Organización Mundial de la Sanidad Mundial. Obtenido de https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.07_EHD.pdf
- The Center for Food Security & Public Health. (2015). Bluetongue. CFSPH. Obtenido de <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bluetongue.pdf>
- del Torres, A. (2014). Identificación molecular de las preferencias tróficas de género *Culicoides* en cinco provincias Ecuador. Universidad San francisco de Quito.
- Thrusfield Michael. (2008). *Veterinary epidemiology*. Editorial Third 3ra edition, pag 238, cap 5.
- Vanbinst, BT, Vandenbussche F., Vandemeulebroucke E., De Leeuw I, Deblauwe I, De Deken G., Madder, M., Haubruge E., Losson B, De Clercq, K. (2009). Bluetongue Virus Detection by Real-Time RT-PCR in *Culicoides* Captured During the 2006 Epizootic in Belgium and Development of an Internal Control. *Transboundary and Emerging Diseases*. 56, 170–177

- Verdezoto, J., Breard, E., Viarouge, C., Quenault, H., Lucas, P., Sailleau, C., Zientara, S., Augot, D., Zapata, S. (2017) Novel serotype of bluetongue virus in South America and first report of epizootic haemorrhagic disease virus in Ecuador. *Transbound Emerg Dis.* 244-247.
- Verdezoto, V. (2016). Investigación de Orbivirus en ganado vacuno y sus posibles vectores. Universidad San Francisco de Quito. Obtenido de <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/5875/1/124754.pdf>
- Verdezoto, J.; Breard, E.; Viarouge, C.; Quenault, H.; Lucas, P.; Sailleau, C.; Zientara, S.; Augot, D.; Zapata, S. (2017) Novel serotype of bluetongue virus in South America and first report of epizootic haemorrhagic disease virus in Ecuador. *Transbound Emerg Dis.* 2017, 65, 244–247.
- Vinueza, R., Breard, E., Viarouge, C., & Zanella, G. (2019). Bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus survey in cattle of the Galapagos Islands. *J Vet Diagn Invest.*, 31(2), 271-275. doi:10.1177/1040638718824630

Anexo 3 Acta de consentimiento



DENTRO DE LAS ACTIVIDADES DEL PROYECTO ESTUDIO DE INFECCIONES POR EL VIRUS DE LENGUA AZUL DEL GANADO BOVINO EN PREDIOS GANADEROS DE LOS CANTONES SANTA ANA Y 24 MAYO, PROVINCIA DE MANABI, SE IMPLEMENTÓ UN ESTUDIO PARA EL MONITOREO Y CONTROL DEL VIRUS DE LENGUA AZUL EN EL GANADO BOVINO EN EL ECUADOR.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Le estamos solicitando participar en el muestreo del ganado bovino para el monitoreo de la situación de las infecciones del virus de lengua azul en el ganado bovino.

¿Cuál es el propósito de esta carta de consentimiento informado?
Esta carta de consentimiento informado se da a conocer a usted, de tal modo que pueda decidir voluntariamente si desea participar o no. Si luego de leer este documento tiene alguna duda, pida al personal del proyecto que le explique. Ellos le proporcionarán toda la información que necesite para que usted tenga un buen entendimiento del alcance del muestreo.

¿Cuál es el objetivo del muestreo?
Determinación de la presencia de infecciones por el virus de la lengua azul y cultivos infectados por los predios de los cantones Santa Ana y 24 de Mayo, Provincia de Manabí, lo que tiene un fuerte impacto en la economía local y nacional y en la salud pública.

¿Cuáles son los posibles riesgos?
Esta actividad no implica ningún riesgo físico o psicológico para usted. Sus respuestas no le ocasionarán ningún riesgo ni tendrán consecuencias para su situación financiera, su empleo o su reputación. Los datos serán únicamente utilizados para valorar la importancia de esta enfermedad a nivel productivo.

¿Cuáles son los posibles beneficios de participar?
El principal beneficio que usted recibirá de este estudio será la adquisición de conocimiento de la situación sanitaria de la finca en relación a las infecciones del virus de lengua azul en el ganado bovino, prácticas de manejo y control, recibirá información científica confiable que le permitirá promover el mejoramiento y posterior uso eficiente de la producción de su unidad ganadera reduciendo las pérdidas del sector ganadero.

Confidencialidad del participante.
Las únicas personas que sabrán que usted participó en el estudio, somos los miembros del equipo de investigación. Nosotros no divulgaremos ninguna información sobre usted o proporcionada por usted durante el desarrollo del proyecto. Cuando los resultados de la investigación se publiquen o se discutan en conferencias, no se incluirá información que pueda revelar su identidad. Nadie, fuera del equipo de investigación tendrá acceso a su información sin su autorización previa por escrito. Si en la etapa de la encuesta o posterior a ella, usted tiene alguna duda puede contactarse con el Dr. Maritza Barrera Valle Mg / +593 994391170, maritza.barrera@utm.edu.ec

Consentimiento del sujeto del estudio.
He leído y escuchado satisfactoriamente las explicaciones sobre el alcance de este estudio y he tenido la oportunidad de hacer preguntas con respuestas satisfactorias para mi entendimiento. Estoy enterado/a de los compromisos y beneficios potenciales de participar en esta encuesta y proyecto. Autorizo el uso de la información generada y estoy de acuerdo en participar en este proyecto.

CODIGO: BRUTRYP No. _____ Lugar y fecha: _____

Nombre del participante: _____

Cédula de identidad: _____ Firma: _____



ANÁLISIS DE MUESTRAS

Recolección y análisis de muestras sanguíneas

De cada animal se recolectará de 5 a 10 μ l de sangre de la vena cocigera de la base de la cola con anticoagulante EDTA y sin anticoagulante. Se utilizará una aguja calibre 20 o 21 tipo "vacutainer". Se registrará de cada animal datos zootécnicos, temperatura rectal y datos sintomáticos de la enfermedad, para determinar si son un factor de riesgo para las enfermedades.

Las muestras de sangre serán analizadas mediante la técnica molecular PCR-TR y ÉLISSA competitivo. De las muestras de sangre se extraerá el ARN de la sangre mediante el kit (Qiagen **SpinRit Blood RNA Kit**) y el kit (High Pure Viral RNA Kit).

Anexo 4 Kits de Elisa-c empleado

Validación

El ensayo es validado si:

- la densidad óptica media del control negativo (DO_{550}) es superior a 0.7
- la densidad óptica media del control positivo (DO_{550}) es inferior al 33 % del DO_{550}

$DO_{550} > 0.7$

$DO_{550} < DO_{550} \times 0.33$

Interpretación

Para cada muestra, calcular el porcentaje de competitividad (SN%).

$$SN\% = \frac{DO_{550}}{DO_{550}} \times 100$$

Muestras con un SN%:

- superior o igual al 40 % son consideradas como negativas;
- inferior al 40 % son consideradas como positivas.

Resultado	Estado
SN % < 40%	POSITIVO
SN % > 40%	NEGATIVO



Certified management system 

ID Screen®
Bluetongue Competition



Kit para la detección de anticuerpos anti-VP7 por ELISA de competición

Numero de autorización del Ministerio Español : 664-RD

Utilización in vivo

Anexo 5 *Protocolo para la elaboración de ELISA competitivo.*

Regular la temperatura de los reactivos $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ previo uso, homogenizado por medio de Vortex o por inversión.

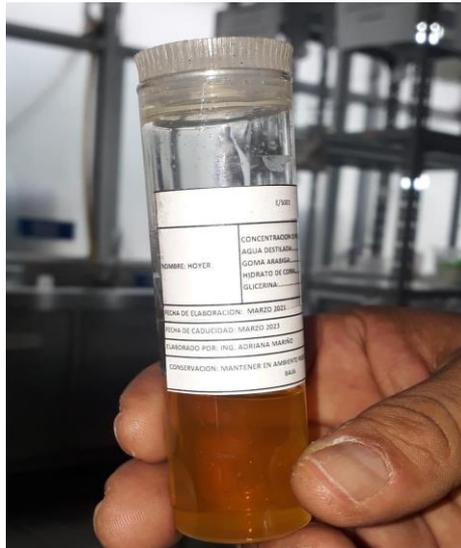
1. Distribuir
 - ✓ 50 μL de Diluyente 2 en todos los pocillos.
 - ✓ 50 μL del control positivo en los pocillos A1 y B1.
 - ✓ 50 μL del control negativo en los pocillos de C1 y D1.
 - ✓ 50 μL de cada muestra a valorar en los pocillos restantes.
2. Incubar 45 ± 4 minutos a $21^{\circ}\text{C} (\pm 5^{\circ}\text{C})$ (No se debe lavar antes de distribuir el conjugado).
3. Preparar Conjugado anti-Vp7-HRP (1 x) diluyendo el Conjugado anti-Vp7- HRP al 1:10 con el diluyente 2.
4. Distribuir 100 μL del Conjugado anti-Vp7-HRP 1x en todos los pocillos.
5. Incubar por 30 min ± 3 min a $21^{\circ}\text{C} (\pm 5^{\circ}\text{C})$.
6. Lavar los pocillos por 3 ocasiones con 300 μL de solución de lavado. Evitar que los pocillos se sequen entre lavados.
7. Distribuir 100 μL de solución de sustrato en todos los pocillos.
8. Incubar 15 minutos ± 2 minutos a $21^{\circ}\text{C} (\pm 5^{\circ}\text{C})$.
9. Distribuir 100 μL de solución de parada a los pocillos en su totalidad para detener la reacción.
10. Leer la densidad óptica a 480nm.

Anexo 6 *Trampa CDC con luz ultravioleta*



Nota. Adaptado de *Trampa CDC con luz ultravioleta* por Centeno y Chiliquinga, 2022.

Anexo 7 Solución Hoyer



Nota. Adaptado de *Solución Hoyer*, por Centeno y Chiliquinga, 2022.

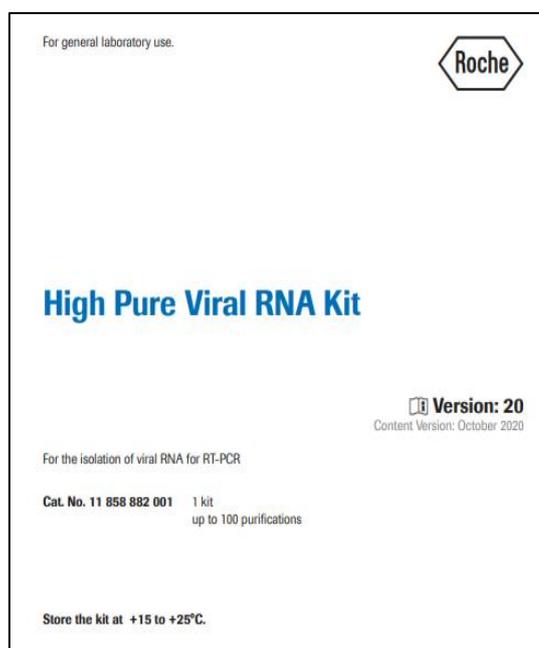
Anexo 8 Protocolo del laboratorio de biología molecular –diagnóstico animal para la toma de muestras

 AGROCALIDAD <small>AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO</small>	INSTRUCTIVO TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR-DIAGNÓSTICO ANIMAL	INT/BM/25 Rev. 4 Hoja 1 de 13	
 AGROCALIDAD <small>AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO</small>			
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR			
INSTRUCTIVO INT/BM/25 TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR-DIAGNÓSTICO ANIMAL			
Rev. 4			
 AGROCALIDAD <small>AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO</small> COPIA CONTROLADA N° <input type="text"/>	 AGROCALIDAD <small>AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO</small> VIGENTE		
ELABORADO  Responsable Técnico	REVISADO  Director de Diagnóstico	REVISADO  Responsable Calidad	APROBADO  Coordinador General de Laboratorios Fecha: 31 ENE 2013

Anexo 9 Protocolo para la ejecución de la q-PCR- RT

1. Se prepara la mezcla la de reacción.
2. Las muestras del ARN que van a ser analizadas deben mantenerse en hielo hasta que se coloquen en la microplaca de PCR en tiempo real.
3. Los reactivos para la PCR deben descongelarse y homogeneizarse, cuidadosamente.
4. Mantenerse sobre hielo y tapados para evitar que reciban la luz directa.
5. Se coloco 23 μL de la mezcla de reacción en cada tubo.
6. Agregar 2.0 μL del ARN problema a cada tubo.
7. Preparada la mezcla, centrifugar los tubos para eliminar burbujas que pudieran interferir con la lectura de la fluorecscencia y la solución quede en el fondo de los tubos.
8. Preparar el equipo y programar las condiciones para la amplificación.
9. Ejecutar el programa.

Anexo 10 Kit PCR-RT empleado.



Anexo 11 *Proceso de muestreo en bovinos*



Anexo 12 *Proceso de muestreo entomológico*



Anexo 13 *Proceso de montaje de los dípteros*



Anexo 14 *Placas listas para estudiar a 70°C en estufa*



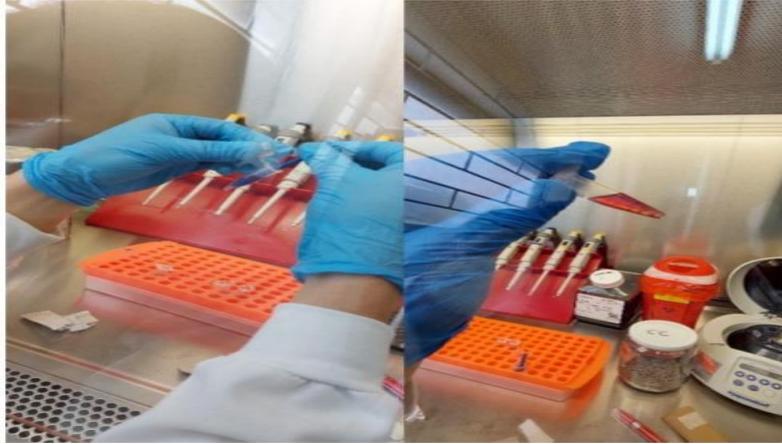
Anexo 15 *Vista desde el estereoscopio de culicoides insignis (Agrocalidad Manta)*



Anexo 16 *Muestra entomológica procesada para equipo cryo laser*



Anexo 17. Preparando el homogenizado de los insectos mediante trituración con un pistilo en método de trizol



Anexo 18 Extracción ARN



Anexo 19. Resultado completo Elisa competitiva.

Muestreos de bovinos de Santa Ana y 24 de mayo						Resultados ELISA (22 de abril de 2022)		
Enviado a Agrocalidad						Kit ID Screen Bluetongue Competition IDVET		
Fecha de muestreo	Predio	Código del predio	Cantón	Numero muestra	Nombre del bovino	MUESTRA	S/N%	RESULTADO
11-abr-22	Bonce	B	Santa Ana	1	Febrina	BONCE 1	6,34	POSITIVO
11-abr-22	Bonce	B		2	Paneso	BONCE 2	5,83	POSITIVO
11-abr-22	Bonce	B		3	Vieja Negra	BONCE 3	5,40	POSITIVO
11-abr-22	Bonce	B		4	Amarillita	BONCE 4	10,21	POSITIVO
11-abr-22	Bonce	B		5	Hijo de Amarilla	BONCE 5	7,59	POSITIVO
11-abr-22	Bonce	B		6	Nieta de Amarilla	BONCE 6	5,83	POSITIVO
12 de abril	Vía Olmedo San Pedro	O	Santa Ana	1	Pintada Cachuda	OLMEDO 1	5,99	POSITIVO
12 de abril	Vía Olmedo San Pedro	O		2	Ceniza Nuwva	OLMEDO 2	4,58	POSITIVO
12 de abril	Vía Olmedo San Pedro	O		3	Careto Ela	OLMEDO 3	6,36	POSITIVO
12 de abril	Vía Olmedo San Pedro	O		4	Ceniza Tuerta	OLMEDO 4	5,83	POSITIVO
12 de abril	Vía Olmedo San Pedro	O		5	Vacona Teta Fina	OLMEDO 5	5,06	POSITIVO
12 de abril	Vía Olmedo San Pedro	O		6	Melliza Gorda	OLMEDO 6	5,34	POSITIVO
12 de abril	Vía Olmedo San Pedro	O		7	Negra Tres Teta	OLMEDO 7	6,32	POSITIVO
12 de abril	Vía Olmedo San Pedro	O		8	Ciega	OLMEDO 8	5,69	POSITIVO

12 de abril	Vía Olmedo San Pedro	O		9	Grande Patuda	OLMEDO 9	4,70	POSITIVO
12 de abril	Vía Olmedo San Pedro	O		10	Trilliza Roja	OLMEDO 10	5,76	POSITIVO
12 de abril	Vía Olmedo San Pedro	O		11	Soledad	OLMEDO 11	6,89	POSITIVO
12 de abril	Vía Olmedo San Pedro	O		12	Vacona Mora	OLMEDO 12	4,94	POSITIVO
12 de abril	Vía Olmedo San Pedro	O		13	Rosa Gorda	OLMEDO 13	5,58	POSITIVO
12 de abril	Vía Olmedo San Pedro	O		14	Hija de Melliza Roja Inseminación	OLMEDO 14	5,95	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U	Santa Ana	1	Ternero	LA UNIÓN 1	14,76	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		2	Ternero	LA UNIÓN 2	10,22	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		3	Ternero	LA UNIÓN 3	4,89	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		4	Ternero	LA UNIÓN 4	8,37	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		5	Ternero	LA UNIÓN 5	7,51	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		6	Ternero	LA UNIÓN 6	5,56	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		7	Ternero	LA UNIÓN 7	5,64	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		8	Ternero	LA UNIÓN 8	10,37	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		9	Ternero	LA UNIÓN 9	6,99	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		10	Ternero	LA UNIÓN 10	5,92	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		11	vaca soltera	LA UNIÓN 11	7,27	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		12	vaca soltera	LA UNIÓN 12	5,37	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		13	vaca soltera	LA UNIÓN 13	5,89	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		14	vaca soltera	LA UNIÓN 14	5,22	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		15	vaca soltera	LA UNIÓN 15	6,02	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		16	vaca soltera	LA UNIÓN 16	5,50	POSITIVO

13 de abril	La Unión	U		17	vaca soltera	LA UNIÓN 17	7,35	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		18	vaca soltera	LA UNIÓN 18	9,99	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		19	vaca soltera	LA UNIÓN 19	5,50	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		20	vaca soltera	LA UNIÓN 20	7,00	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		21	vaca soltera	LA UNIÓN 21	6,41	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		22	vaca soltera	LA UNIÓN 22	6,10	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		23	vaca soltera	LA UNIÓN 23	5,01	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		24	vaca soltera	LA UNIÓN 24	5,28	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		25	vaca soltera	LA UNIÓN 25	5,46	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		26	vaca soltera	LA UNIÓN 26	6,64	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		27	vaca soltera	LA UNIÓN 27	5,95	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		28	vaca soltera	LA UNIÓN 28	5,60	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		29	vaca soltera	LA UNIÓN 29	5,01	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		30	vaca soltera	LA UNIÓN 30	6,15	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		31	vaca soltera	LA UNIÓN 31	5,06	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		32	vaca soltera	LA UNIÓN 32	5,84	POSITIVO
13 de abril	La Unión	U		33	vaca Juana	LA UNIÓN 33	7,34	POSITIVO
Enviado a AGROCALIDAD 19 de abril, Llegada 20 de abril								
Fecha de muestreo	Predio	Código del predio	Cantón	Numero muestra	Nombre del bovino			
18 de abril	TIERRA NEGRA	TN	24 de Mayo	1	Pintada vieja	TIERRAS NEGRAS 1	6,70	POSITIVO
18 de abril	TIERRA NEGRA	TN		2	Pintada alta	TIERRAS NEGRAS 2	5,42	POSITIVO
18 de abril	TIERRA NEGRA	TN		3	Hija de melliza	TIERRAS NEGRAS 3	39,97	POSITIVO
18 de abril	TIERRA NEGRA	TN		4	Mamá de melliza	TIERRAS NEGRAS 4	5,83	POSITIVO

18 de abril	TIERRA NEGRA	TN		5	Blandita Puerta	TIERRAS NEGRAS 5	6,04	POSITIVO
18 de abril	TIERRA NEGRA	TN		6	La verrugosa	TIERRAS NEGRAS 6	5,28	POSITIVO
18 de abril	TIERRA NEGRA	TN		7	La lechera	TIERRAS NEGRAS 7	5,70	POSITIVO
18 de abril	TIERRA NEGRA	TN		8	Abogado	TIERRAS NEGRAS 8	5,95	POSITIVO
18 de abril	TIERRA NEGRA	TN		9	Vieja Patona	TIERRAS NEGRAS 9	8,89	POSITIVO
18 de abril	Monte Oscuro	MO	24 de Mayo	1	Blanco manchado	MONTE OSCURO 1	4,92	POSITIVO
18 de abril	Monte Oscuro	MO		2	Negra lucero	MONTE OSCURO 2	4,86	POSITIVO
18 de abril	Monte Oscuro	MO		3	Negro	MONTE OSCURO 3	4,65	POSITIVO
18 de abril	Monte Oscuro	MO		4	La manchada	MONTE OSCURO 4	5,28	POSITIVO
18 de abril	Monte Oscuro	MO		5	El chorreado	MONTE OSCURO 5	5,33	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE	24 de Mayo	1	Litigio	BELLAVISTA 1	5,67	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		2	Marianela	BELLAVISTA 2	9,69	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		3	Patucha	BELLAVISTA 3	6,47	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		4	Desprecio	BELLAVISTA 4	5,11	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		5	Golondrina	BELLAVISTA 5	6,58	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		6	Toro Benito	BELLAVISTA 6	5,02	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		7	Mariella	BELLAVISTA 7	5,42	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		8	Samantha	BELLAVISTA 8	5,56	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		9	Corazon	BELLAVISTA 9	6,87	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		10	Hija de Patuda	BELLAVISTA 10	8,19	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		11	Hija de Desprecio	BELLAVISTA 11	6,33	POSITIVO

19 de abril	Bellavista	BE		12	Hija de Marianela	BELLAVISTA 12	21,95	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		13	Hija de corazon	BELLAVISTA 13	6,43	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		14	Hija de Golondrina	BELLAVISTA 14	27,66	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		15	Hija de Litigio	BELLAVISTA 15	7,30	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		16	Hija de Mariella	BELLAVISTA 16	21,06	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		17	Hija de Samantha	BELLAVISTA 17	6,15	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		18	Preciosa	BELLAVISTA 18	5,84	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		19	Mona	BELLAVISTA 19	6,82	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		20	Patucha 2	BELLAVISTA 20	7,06	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		21	Canela	BELLAVISTA 21	6,38	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		22	Paloma	BELLAVISTA 22	6,39	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		23	Canela Melliza	BELLAVISTA 23	5,48	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		24	Cara Sucia	BELLAVISTA 24	5,21	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		25	Toro Amador	BELLAVISTA 25	6,11	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		26	Bronn Suw	BELLAVISTA 26	17,37	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		27	Mirian	BELLAVISTA 27	10,79	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		28	Mascara	BELLAVISTA 28	7,46	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		29	Rabo de Plata	BELLAVISTA 29	11,32	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		30	Toro Corazon	BELLAVISTA 30	12,60	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		31	Hija de Preciosa	BELLAVISTA 31	7,70	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		32	Hija de Patucha 2	BELLAVISTA 32	8,65	POSITIVO
19 de abril	Bellavista	BE		33	Hija Rabo de plata	BELLAVISTA 33	21,36	POSITIVO