FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS PRECIPITANTES PARA EL VIRUS DE LA LENGUA AZUL EN SUERO DE OVINOS DE LA PARTE ALTA Y BAJA DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA

Trabajo de Titulación presentado en conformidad a los requisitos establecidos para optar por el título de

Médico veterinario y zootecnista

Profesor Guía

Dr. Aníbal Mantilla

Autor

Cristian Xavier Merino Mena

Año

2011

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos para un adecuado desarrollo del tema escogido, y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación."

Anibal, Mantilla
Doctor
1300451901

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

"Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes"

Cristian, Merino
1714737473

AGRADECIMIENTO

Primero y antes que nada, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Agradecer hoy y siempre a mi familia por brindarme el apoyo, la alegría y la fortaleza necesaria para seguir adelante.

DEDICATORIA

A Dios, por darme la fuerza necesaria en los momentos en que más lo necesite, por darme sabiduría y entendimiento y por permitirme culminar mi carrera.

A mis padres y mi hermana por ser el apoyo incondicional durante toda mi vida, a mi sobrinita Mel por ser inspiración y alegría en mi hogar, y a mi novia por el amor, paciencia y compañía que me brinda día a día.

A ellos, con todo el amor del mundo.

RESUMEN

La lengua azul es una enfermedad infecciosa producida por un virus de la familia reoviridae género orbivirus que afecta a los ovinos y otros rumiantes. Es transmitido por mosquitos pertenecientes al género Culicoides, es en este vector que el virus desarrolla su ciclo biológico. Se tiene conocimiento de la ocurrencia de cambios patológicos en las glándulas salivales de Culicoides.

El virus de la lengua azul es muy estable y muy resistente a las influencias que destruyen a la gran mayoría de otros virus, pudiendo soportar un considerable grado de putrefacción. La sangre seca también es infecciosa pudiendo junto a la carne permanecer infecciosa durante varios meses. Se conocen más de 23 serotipos que aparecieron probablemente por un cambio antigénico.

La lengua azul es una enfermedad que ocurre principalmente en ovinos, y todas las razas de esa especie son susceptibles, aunque en diversos grados, siendo las razas europeas más susceptibles seguidas de los merinos. Las razas criollas son las menos susceptibles a la enfermedad.

La presente investigación se la realizó en la parte alta y baja de la provincia de Pichincha en las zonas de: Lloa, Beaterio, Machachi, valle de los Chillos, Guayllabamba, Pacto y Tandapi.

En total se tomaron 200 sueros sanguíneos ovinos. Las muestras fueron procesadas en los laboratorios del Instituto Nacional de Higiene (INH).

El método de diagnóstico utilizado es el de Inmuno difusión en gel Agar (IDGA) que identifica los anticuerpos producto de la enfermedad, usándose como reactivo un kit (antígeno y suero control positivo) procedente del Centro Panamericano de fiebre aftosa de Brasil.

Los resultados fueron: 2 reactores positivos de la zona del beaterio de 20 ovinos muestreados, de diferentes edades y de raza criolla.

En Machachi(Aloag), Lloa, Pacto (Noroccidente), Valle de los Chillos, Guayllabamba, 0/30, 0/50, 0/15, 0/30, 0/15, respectivamente.

En Tandapi se detectaron 14 animales con anticuerpos de un total de 40 testados.

En resumen, se ha detectado la presencia de reactores en 16/200, es decir el 8%.

La prevalencia de los anticuerpos precipitantes de la enfermedad nos da a conocer que el mosquito vector no tiene como hábitat la parte alta de Pichincha, lo que coincide con la literatura que hace referencia a múltiples estudios realizados en otras regiones del país y del mundo.

Se encontraron dos ovinos con anticuerpos precipitantes a la enfermedad en la zona del Beaterio, presumiblemente procedentes de áreas geográficas bajas, donde si existe circulación del virus de lengua azul como lo revelan estudios realizados en bovinos.

Es necesario trabajar en estudios de detección de antígenos en circulación de animales potencialmente infectados, para poder confirmar la presencia de una infección. Con el presente trabajo se concluye que es necesario investigar otras áreas geográficas del país., aumentando el número de animales a muestrear para no subestimar la presencia de la enfermedad.

SUMMARY

Bluetongue is an infectious disease caused by a virus Orbivirus genus within Reoviridae family, which affects ovines and other ruminants. It is transmitted by mosquitoes among Culicoide genus, in this vector the biological cycle of the virus can develop. There is knowledge that pathological changes occur in the Culicoide's salivary glands.

The bluetongue virus is extremely stable and resistant to the influences which destroy the majority of other viruses; it can withstand a considerable degree of putrefaction. Dried blood is also infectious and along with meat, has the capacity to remain infectious for several months. There are more than 23 serotypes, which likely developed due to a change in an antigenic action.

Bluetongue disease occurs mainly in sheep; consequently, all breeds of this species are susceptible. However, it can vary its pathogenicity, European breeds are the most susceptible followed by Merino freed, and the less susceptible are crossbreeds.

This research was conducted in both top and bottom parts of the Pichincha province, within the following areas: Lloa, Beaterio, Machachi, Valle de los Chillos, Guayllabamba, Pacto and Tandapi.

In total, 200 blood samples were taken, which were processed at the National Institute of Health (NIH) laboratories.

Agar gel immunodiffusion (AGID) was the diagnostic method used to identify antibodies from the disease using a reagent kit (antigen and positive control serum) originating from the Pan American Foot and Mouth Disease in Brazil.

The results obtained were: 2 positive reactors from 20 sheep sampled at the Beaterio, with different ages and all of them were crossbreed.

In Machachi (Aloag), Lloa, Pacto (Northwest), Valle de los Chillos, Guayllabamba, there were not found positives samples, 0/30, 0/50. 0/15, 0/30, 0/15, respectively.

In Tandapi, 14 out of 40 animals tested had positive results to the presence of antibodies.

In total, 16/200 (8%) samples were positive detected by the test applied.

The prevalence of the precipitating antibodies of the disease confirms that the habitat of this mosquito (vector) does not adapt at the top part of the Pichincha province, which is consistent with the data published in other studies.

It was assumed that the two positive sheep with precipitating antibodies of the disease at the Beaterio area have the origin from low geographical areas, where there is a higher circulation of the disease, confirmed in studies performed in bovine.

It is necessary to work in studies to identify antibodies from animals potentially infected, to confirm the infection. In conclusion, it is necessary to investigate other geographic areas in the country, and increase the number of sampled animals to avoid underestimating of the disease.

INDICE

Introducción 1

CAPITULO I

MARCO TEORICO LENGUA AZUL EN OVINOS

1.1. Etiología 5

1.1.1. Características del virus 5

1.1.1.1. Características físicas 5

1.1.1.2. Serotipos 6

1.1.1.3. Estabilidad 6

1.1.1.4. Susceptibilidad 7

1.2. Historia 8

1.3. Epidemiologia 10

1.3.1. Epidemiología mundial 12

1.3.2. Epidemiología en Latino América 12

1.3.3. Epidemiología en Ecuador 13

1.4. Transmisión 14

1.4.1. Epizootiología 14

1.4.2. Culicoides spp 14

1.4.3. Hospedadores 15

1.4.4. Portadores del virus 17

1.4.5. Áreas endémicas 18

1.4.6. Áreas epidémicas 18

1.5. Patología 18

1.5.1. Patología del feto 19

1.6. Diagnóstico 20

1.6.1. Diagnóstico clínico 20
1.6.2. Diagnóstico de laboratorio 21
1.6.2.1. Pruebas de laboratorio para identificación de virus 22
1.6.2.1.1. Pruebas de neutralización 22
1.6.2.1.2. Prueba de inmunodifusión en gel agar (IDGA) 24
1.6.2.1.3. Prueba de ELISA 26
1.6.2.1.4. Prueba de fijación de complemento (FCMD) 26
1.6.2.1.5. Prueba de inhibición por hemoaglutinación (IH) 27
1.6.2.1.6. Técnica de anticuerpo fluorescente 27
1.6.2.1.7. Prueba serológica de hemolisis en gel 27
1.6.2.1.8. Anticuerpos monoclonales 27
1.6.2.1.9. Pruebas serológicas usadas en los Estados Unidos 28
1.6.2.1.10. Electroforesis en gel de poliacrilamida 28
1.6.2.1.11. Laboratorios mundiales de referencia 28
1.6.3. Aislamiento de virus 29
1.6.3.1. Portadores 29
1.6.3.2. Aislamiento de virus de portadores por inoculación de ovinos, huevos embrionados o cultivos celulares 30
1.6.3.3. Método de eritrocitos lavados 31
1.6.3.4. Técnica de sangre auto inyectada en ovinos 31
1.6.3.5. Inoculación de huevos 32
1.6.3.6. Cultivo de tejido 32
1.6.3.7. Aislamiento primario de cepas de campo de VLA 33
1.6.3.8. Aislamiento de virus de semen 33
1.6.4. Producción de antígeno viral 33
1.6.5. Diagnostico diferencial 34
1.7. Tratamiento 36
1.8. Control y prevención 37
1.8.1. Normas importantes para animales vivos y productos de 37

origen animal

1.8.2. Vacunación 39

1.9.Erradicación 43

1.9.1. Control en áreas endémicas 44

1.9.2. Control de insectos 44

1.9.3. Medidas de prevención por manejo 45

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1 Materiales 47

2.2 Métodos 48

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Resultados 50

3.1.1 Cuadro sobre la población total 50

3.2 Discusión 53

CAPITULO IV

Conclusiones 56

Recomendaciones 57

Bibliografía 58

Anexos 65

INTRODUCCION

El estudio de las enfermedades virales ha tomado impulso en los últimos años, gracias al uso de la microscopia electrónica y de técnicas moleculares, lo que ha permitido la identificación de los mismos. El conocimiento de las variantes antigénicas ha permitido tener un conocimiento más amplio de las enfermedades. La lengua azul (L.A) es una enfermedad que se la identificó por primera vez en el África hace más de 100 años y poco a poco ha ido invadiendo el planeta, siendo originalmente una enfermedad especifica de los ovinos, se extiende a otras especies como bovinos y otros rumiantes.

En nuestro país hay poco conocimiento sobre la enfermedad, en razón de la falta de investigaciones que hayan permitido establecer un inventario epidemiológico, exceptuándose investigaciones realizadas por López William y colaboradores (1993) en la que encontró en la provincia de Esmeraldas 49.52% y en Guayas 43.63% de reactores a la enfermedad en la especie bovina. Estudios realizados en ovinos de las estaciones de cría de ANCO (Asociación nacional de criadores de ovejas) efectuados en la provincia de Pichincha por Mantilla Aníbal y colaboradores revelaron la no presencia de Anticuerpos anti lengua azul (MANTILLA, 1998), igualmente en un estudio sobre Frecuencia de fiebre aftosa, lengua azul y brucelosis en caprinos del cantón Montecristi provincia de Manabí, se determinó la presencia de anticuerpos anti lengua azul 7.4% de 363 animales examinados (MANTILLA, 1998)

La lengua azul es una enfermedad infecciosa aguda causada por un virus de la familia Reoviridae y género Orbivirus, transmitida por un insecto hematófago de presentación estacionaria en climas cálidos y húmedos que se caracterizan por erosiones en la mucosa bucal, pezuñas con desarrollo de ulceraciones.

Como se ha mencionado el vector transmisor de la enfermedad es un mosquito del género Culicoides. El mosquito hembra ataca al ganado y necesita por lo

menos una alimentación de sangre para complementar su ciclo en el ovario, numerosos factores determinan la intensidad de sus picadas pero generalmente se alimentan una vez cada tres o cuatro días, sin embargo, cuando el mosquito chupa sangre infectada permanece infectado durante toda la vida.

Condiciones ambientales óptimas para su actividad están entre 13 y 35 ℃. El Culicoides es activo desde poco antes del anochecer hasta poco después del amanecer y es transportado por el viento.

Los insectos pueden recorrer distancias de 40 a 700 Km en períodos de hasta 20 horas y pueden ser transportados hasta 1500 m.s.n.m. La transmisión transovariana de lengua azul en los Culicoides es poco probable. Es necesario un elevado titulo de virus para la transmisión.

Es casi imposible erradicar la enfermedad una vez que se ha establecido, los países libres de la enfermedad deben tomar todas las precauciones posibles para prevenir su introducción a través de la entrada de animales susceptibles o insectos vectores.

A nivel regional lo conveniente sería restringir el movimiento de animales al igual que la prohibición de importaciones de semen de áreas infectadas.

Como medidas de erradicación de la enfermedad se puede adoptar lo siguiente: cuarentena, sacrificio de ovejas infectadas.

Es importante el conocimiento de la presencia de esta enfermedad para evitar pérdidas directas e indirectas que se ocasionan, como son efectos sobre el aparato genital, recuperación muy lenta, reducción de la producción de leche en ovejas y vacas, abortos y producción de corderos débiles o mal formados.

ANTECEDENTES:

Las enfermedades vesiculares entre ellas la fiebre aftosa vienen afectando a la ganadería del país, y siendo la L.A una patología compatible con ella a más de la estomatitis vesicular Indiana y New jersey, diarrea viral bovina y rinotraqueitis infecciosa bovina, ameritan evaluar su presencia. Trabajos de investigaciones realizadas en el país han demostrado la presencia de la misma en bovinos en la costa ecuatoriana, no así en ovinos de la sierra, por la no presencia del vector transmisor, los mosquitos principalmente del género Culicoides, por las condiciones medio ambientales. Los sistemas de producción sumadas a lo anterior modifican los riesgos de mayor o menor posibilidad de contraer la enfermedad, además se debe tomar en cuenta que generalmente los sistemas empleados en ovinos son de tipo extensivo. Por lo cual se debe hacer un muestreo en ovinos que habiten en la parte alta y baja de la provincia Pichincha con el objeto de identificar anticuerpos precipitantes de la enfermedad.

OBJETIVOS:

GENERAL:

- Identificación de anticuerpos para el virus de la lengua azul en ovinos procedentes de la parte alta y baja de la provincia de Pichincha.

ESPECÍFICOS:

- Evaluar la presencia de anticuerpos lengua azul en poblaciones ovinas muestreadas en la provincia de Pichincha.

- Contribuir al registro de la situación epidemiológica de la enfermedad en las diferentes zonas de explotación.

- Difundir los resultados obtenidos en la presente investigación a las autoridades agropecuarias del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGAP).

JUSTIFICACIÓN:

La investigación obedece a que los posibles cambios medio ambientales, manejo y otros pudieron modificar el nicho ecológico del artrópodo transmisor de la enfermedad. Estudios realizados en años anteriores en el criadero de ANCO en Lloa provincia de Pichincha no revelaron la presencia de anticuerpos precipitantes al virus de la lengua azul probablemente a que en alturas superiores a 1500 m.s.n.m no existe el mosquito vector (SELLERS R. , 1975)

Dentro de los beneficios esperados en esta investigación está el de conocer si hay actividad viral en la parte alta y baja de la provincia de pichincha, también el de comprobar si por todos estos cambios medio ambientales que estamos viviendo actual mente como el calentamiento global el mosquito transmisor en este caso del género culicoides se adaptado a la parte alta de la provincia.

ALCANCE:

Las explotaciones ovinas en el sector son generalmente de tipo extensivo, una identificación oportuna de esta enfermedad pondría en alerta a las autoridades sanitarias para su debido control.

CAPITULO I

MARCO TEORICO LENGUA AZUL EN OVINOS

1.1 Etiología

1.1.1 Características del virus

1.1.1.1 Características físicas

El virus de la LA pertenece a la familia Reoviridae y al genero orbivirus. (AFSHAR & KAYVANFAR, 1974)

Posee un acido ribonucleico (ARN) de cadena doble, la partícula viral es esférica y tiene un diámetro de aproximadamente 69 nm. El ARN de cadena doble tiene 10 segmentos en el genoma. Los determinantes antigénicos probablemente están localizados en una proteína para la cual solo uno de los segmentos provee el código. (AFSHAR & KAYVANFAR, 1974)

La partícula del núcleo de VLA contiene dos poli péptidos principales, P3 Y P7, y está rodeada por una membrana exterior de la cápside que está compuesta por dos poli péptidos principales P2 y P5. La proteína P2 produce anticuerpos tipo específicos (AWAD, 1978) y el segmento 8 del gene del VLA tipo 17 codifica para el polipeptido de especificidad inter grupo (BLUETONGUE., 1979)

La especificidad de grupo del VLA medida por la prueba de fijación de complemento (FC) o por la prueba de inmunodifusión en gel agar (IDGA) es determinada por el núcleo proteico. (BLUETONGUE., 1979)

1.1.1.2 Serotipos

Hay 23 o más serotipos (BLUETONGUE., 1979). Se desconoce como aparecieron los diferentes serotipos, pero probablemente aparecieron por un cambio antigénico. También han ocurrido un reagrupamiento. Durante este siglo, por lo menos, algunas cepas mostraron ser inmunológicamente estables.

Los orvivirus se caracterizan por interrelaciones serológicas complejas (BLUETONGUE., 1979)

1.1.1.3 Estabilidad

El VLA es muy estable y extraordinariamente resistente a las influencias que destruyen rápidamente la mayoría de los otros virus. Por ejemplo, soporta un considerable grado de putrefacción. Se ha recuperado virus sin modificación por filtración de sangre muy descompuesta (BOORMAN & MELLOR, 1982). La sangre y la carne pueden permanecer infecciosas durante meses. La sangre seca también es infecciosa (BOULANGER & FRANK, 1975). La sangre fresca, conservada en glicerina y mantenida en temperatura ambiente era todavía infectante después de 25 años (BOWEN, HOWARD, ELSDEN, & SEIDEL, 1983).

En eritrocitos lavados y almacenados a 4 grados centígrados durante 14 meses el virus aun causa una respuesta clínica retardada pero típica a la LA en ovinos re inoculados o auto inyectados (BOWEN & HOWARD, 1984)

El virus es comparativamente resistente al hidróxido de sodio, carbonato de sodio, etilalcohol (BOORMAN & MELLOR, 1982), éter y cloroformo, y es sensible a los asidos. Es inactivado a un pH 6.4 durante 10 minutos. Cuanto el pH en la carne está por encima de 6.4, el virus permanecerá infeccioso por largos periodos. El virus es inactivado cuando mantenido a 60 grados centígrados durante 30 minutos (CALLIS & DARDIRI, 1981).

La partícula viral es estable a 4 grados centígrados y menos a 70 grados centígrados pero pierde infecciocidad rápidamente cuando es congelada a menos de 20 grados centígrados (CSIRO, 1977 - 1978).

Los álcalis, asidos y yodoformos se incluyen entre los desinfectantes efectivos.

1.1.1.4 Susceptibilidad

La LA es una enfermedad que ocurre principalmente en ovinos, y todas las razas de esa especie son suseptibles, aunque en diversos grados. Las razas europeas de carneros con las más susceptibles, seguidas de los Merinos. El Dorset Horn, por ejemplo, es más susceptible que el Merino. Las razas indígenas (criollas) son las menos susceptibles. La mayoría, sino todos, de los ovinos africanos indígenas son resistentes a la LA (CUNHA, DE SOUZA, & TEIXEIRA, 1983).

Sin embargo, en Chipre las razas locales fueron muy afectadas. Se pueden esperar epizootias en razas europeas.

En infecciones experimentales en caprinos y ovinos, se comprobó que el titulo de virus en la sangre de caprinos fue 100 veces más bajo que el de ovinos (DELLA-PORTA, SELLERS, & HERNIMAN, 1983).

El virus no produce enfermedad clínica manifiesta en bovinos en Africa del Sur. Sin embargo, en comunicaciones de epizootias fuera de Africa, se observaron signos clínicos en bovinos en Israel, Palestina, Siria, Portugal y España. En los Estados Unidos, en algunos rebaños infectados, aproximadamente cinco por ciento de los bovinos presentaron la enfermedad entre benigna y severa (CUNHA, DE SOUZA, & TEIXEIRA, 1983).

En aéreas recientemente infectadas, los síntomas clínicos en bovinos son similares a los de ovinos susceptibles. (EPIZOOTIOLOGY, 1980).

La enfermedad no es transmisible al hombre. Los perros, gatos, conejos, comadrejas, cobayos y los uni-ungulados no son susceptibles a la LA.

1.2. Historia

La primera información de LA proviene de África del sur en 1976, y la primera descripción de la enfermedad fue hecha por Hutcheon, en 1881.

En 1907 la enfermedad fue diagnosticada en Egipto en la raza Merino, en 1909 en Kenia en ovinos de las tierras altas, y en 1927 en África Occidental en razas europeas importadas.

La enfermedad no fue identificada fuera de África hasta 1943, cuando el virus fue aislado en Chipre, aunque había sido observada en esa isla desde 1924. En 1977 ocurrió en Chipre otro brote severo (VLA tipo 4) y razas locales así como animales importados de Awassi y chios fueron igualmente afectados. (SELLERS R. , 1975)

En el periodo 1943 y 1949 el VLA estuvo activo en Palestina, Turquía y Siria. En Turquía e Israel la enfermedad fue observada en razas Merino y Europeas. En 1950 ocurrió en Israel un extenso brote en bovinos y ovinos.

En 1956 ovinos Merino locales fueron afectados en Marruecos, y en ese mismo año en España y Portugal ocurre una severa epidemia causada por el virus tipo 10; 81.000 animales enfermaron con una mortalidad del 6.3%. La enfermedad desapareció después de algunos años.

Culicoides imicola, el principal vector LA en África, fue identificado por primera vez en mayo de 1982 en España. Podría ser el vector que trajo el virus de África (Marruecos) a la Península Ibérica en 1956.

La enfermedad fue diagnosticada en los Estados Unidos 1907 (Texas), pero el primer aislamiento del virus solo se hizo en 1952. El virus se difundió de Texas a California y de allí en dirección al este (MELLOR, BOORMAN, WILKINSON, & MARTINEZ- GOMEZ, 1983).

En 1979 Brasil informo por primera vez evidencia serológica de infección de ganado.

En Chile, el primer informe de anticuerpos de LA data de 1982. La prueba de IDGA indicó una prevalencia de 20% de anticuerpos entre los bovinos de la región de los lagos. (TAMAYO, ALONSO, & SCHOEBITZ, 1993)

En Australia, los primeros aislamientos de virus fueron hechos en insectos en octubre de 1977, durante un estudio de rutina de virus transmitidos por insectos. Los bovinos de esa región presentaron anticuerpos contra el LA, pero nunca se reconoció la enfermedad clínica. Los ovinos fueron infectados experimentalmente con esta cepa y mostraron síntomas clínicos leves. Se presume que el virus entró al país atravesando el mar entre Papua, Nueva Guinea y Australia, cuya distancia es de solo 160 km. (CSIRO, 1977 - 1978)

Durante un estudio en todo l país en diciembre de 1978, se recolectaron 200.000 muestras de sangre de ovinos, bovinos y otros rumiantes. Los primeros resultados fueron negativos. Sin embargo, en los primeros siete meses de 1981, cuando siete rebaños centinelas en diferentes localidades del norte del territorio fueron examinados para detectar arbovirus, se encontraron anticuerpos de LA en seis rebaños. Posteriormente se hicieron cuatro aislamientos de virus de muestra de sangre de bovinos sanos en monocapas de células BHK-21. (GARD & BAINBRIDGE, 1981)

Publicaciones posteriores mencionan ceroconversión al VLA en la mayoría de los estados de Australia.

Lengua azul en bovinos: En 1934 por primera vez fue reconocida en África del Sur como una enfermedad en bovinos y posteriormente es informada en Israel, España, Portugal, Estados Unidos y probablemente en Chipre. (HENNING, 1988)

1.3 Epidemiología

Existe un importante reservorio animal en rumiantes africanos salvajes y domésticos, resistentes y que pueden ser portadores inaparentes; en ovinos y caprinos europeos en periodo de incubación, enfermedad o convalecencia; y en bovinos europeos, que sólo dan síntomas clínicos el 5-10% de los casos y que albergan el virus durante meses y en fase virémica lo pueden transmitir por coito y verticalmente; los embriones infectados también pueden transmitirlo mediante trasplante.

Los vectores son "beatillas" nocturnas del género Culicoides, Familia Ceratopogonidae. En España, como en todo el Sur de Europa, África y Oriente Medio, Culicoides obsoletus y Culicoides imicola, una especie termófila de origen afroasiático, frecuente en todo el sudoeste peninsular. En Australia, lo son C. fulvus, C. actoni y C. wadai; y en América, C. variipennis y C. insignis. C. imicola cría en el estiércol y el purín vacuno; los estercoleros y fosos de purín abiertos y no movidos son excelentes criaderos, mientras los excrementos en pleno campo suelen secarse con excesiva rapidez para sustentarlo.

Son estacionales de verano-otoño, muy dependientes de la humedad (el proceso se propaga a lo largo de los cursos de agua) y de hábitos nocturnos. Aunque son malos voladores, pueden ser fácilmente transportados a largas distancias por el viento (130-200 km). En biotopos subtropicales o en determinadas zonas templadas, los adultos pueden sobrevivir durante todo el invierno.

La beatilla nunca nace infectada, se infecta al picar a un animal virémico. Una vez producida la infección, el virus se multiplica intensamente en las células de

intestino y de las glándulas salivares, traXs lo que permanece infectante el resto de su vida. La contagiosidad es elevada aunque sólo por inoculación percutánea. Los brotes de la enfermedad se relacionan exclusivamente con la presencia de adultos activos infectantes. Estos Culicoides están presentes a lo largo de todo el año en las zonas enzoóticas, solapándose las distintas generaciones y asegurándose así la permanencia de la infección, mientras que en las zonas donde se registran brotes epizoóticos esta presencia está limitada a los meses más cálidos.

Aunque la garrapata también puede actuar como vector mecánico o biológico de la enfermedad, su importancia epidemiológica es muy escasa.

Son sensibles en orden decreciente, los ovinos, caprinos y bovinos, así como algunos rumiantes salvajes europeos y americanos, especialmente los ciervos de cola blanca.

La presentación es enzoótica en África, Oriente Medio y la India; epizoótica estacional en el Caribe, América (de Canadá a Paraguay), Japón, China y Mediterráneo Oriental; se ha aislado sin producir enfermedad en Sudeste Asiático y Australia. Europa ha estado libre un tiempo, pero ya hubo brotes en la Península Ibérica en 1959-60, en el 2000 se extendió desde Bulgaria por todo el Mediterráneo y reapareció en España en las Baleares; al parecer se ha acantonado en Córcega y Cerdeña, de donde ha vuelto a Menorca en octubre de 2003. En España en los últimos años (2004-2007) se han venido reproduciendo brotes cuyo origen probablemente haya sido Marruecos. Indices de morbilidad del 14-70 % en ovinos según la presentación en el área; y 5-10 % en bovinos. Mortalidad 20-50 %.(MIURA, 1992)

1.3.1 Epidemiología Mundial

Puesto que el vector y los huéspedes vertebrados existen prácticamente en todo el mundo, el virus es capaz de establecerse al norte y al sur del Ecuador, solo circunscrito por algunos climas temperados, tal vez debido algunas limitaciones climáticas cuantitativas en los vectores. (METCALF & LUEDKE, 1990)

Es hipotético que el virus no se replique en insectos donde la tasa metabólica es reducida por debajo de un cierto nivel al cual el insecto puede sobrevivir, pero no es capaz de producir VLA viable.

Es importante distinguir entre solo prevalencia de virus confirmada serológicamente (anticuerpos) o el diagnostico de la enfermedad clínica seguido de aislamiento de virus.

África.- virus y anticuerpos en la mayoría de los países. En África del sur se encuentra casi todos los serotipos; lo mismo que ocurre en África Occidental.

Europa.- Al final de 1979 ocurrió un brote e la Isla de Lesbos, Grecia (tipo 4) En Mayo de 1982 por primera vez se identificó C.Imicola en España, y su presencia puede ser informada actualmente en otros países de la comunidad económica europea, por los menos más allá de los 40 ºN.

Si mosquitos infectados llegasen a estos países transportados por el viento del norte de África, ellos podrías establecer ciclos de infección en las poblaciones locales de mosquitos. Entonces podrían ocurrir epidemias similares a las de España y Portugal (FAO, 1998).

1.3.2 Epidemiología en Latino América

Estados Unidos los tipos de virus diagnosticados son 2, 10, 11, 13 y 17. El 25 de mayo de 1983 se aisló el serotipo 2 de sangre recolectada de un rebaño bovino en

florida en Septiembre – Octubre de 1982. Sólo 5 de los 23 serotipos infectan la ganadería rumiante. En el país, todas las razas de ovinos parecen igualmente susceptibles.

El virus frecuentemente es aislado y se han encontrado anticuerpos en la mayoría de l

América Central, Caribe, América del Sur.- La enfermedad en sí nunca ha sido detectada o confirmada por aislamiento de virus de rumiantes ni de artrópodos. (FULTON, 1981)

Un elevado porcentaje de ovinos, bovinos y caprinos tienen anticuerpos precipitantes contra la LA. En el área del Caribe cerca del 70% de los animales de estas tres especies son positivos a la prueba de IDGA. (TAYLOR & GUMM, 1983)

En México, Colombia, Venezuela, Ecuador, Brasil, Perú, Paraguay, Guyana, Suriname y Guayana Francesa ya se han en contrató anticuerpos en las especies indicadas.

1.3.3 Epidemiología en Ecuador

Los primeros estudios en bovinos datan del año 1993 (LOPEZ, 1993) y de ovinos y caprinos en 1998 (MANTILLA, 1998).

El primer informe de anticuerpos de LA en Chile data de 1982, y en Brasil la primera evidencia serológica para el virus fue encontrada en 1979. Durante un estudio en el estado de Rio de janeiro, Brasil, 40% de 500 sueros de bovinos fueron positivos a la prueba de IDGA. (BLUETONGUE., 1979)

Además se encontraron anticuerpos en especies susceptibles de los estados de Amazonas, Pará, minas Gerais y Sao Paulo, y en los territorios de Roraima y Amapa.

Durante una encuesta serológica en Argentina (principalmente en la parte norte del país) no se encontraron muestras positivas. Se sabe que la Argentina está dentro de una zona ecológica donde el ciclo de la enfermedad puede existir. (SCHUDEL, 1984)

1.4 Transmisión

1.4.1 Epizootiología

Diferentes poblaciones geográficas de la misma especie de vector difieren en su competencia para actuar como vectores (BLUETONGUE., 1979).

El VLA también ha sido encontrado en los siguientes insectos chupadores, que solo transmiten el virus mecánicamente: piojos de bovinos y ovinos, moscas picadoras y garrapatas.

La infección oral o por contacto no ocurre y la infección experimental se realiza principalmente por inoculación parenteral de sangre infecciosa o suspensiones de tejidos.

No ha sido posible determinar los factores que controlan la difusión del VLA en el Caribe , pero es importante destacar que los mismos tipos de virus se diseminaron en toda el área solo en el periodo de un año. Aun no se conoce el tiempo de inicio del virus en cada área (BLUETONGUE., 1979).

1.4.2 Culicoides spp.

El mosquito hembra ataca al ganado, y necesita por lo menos una alimentación de sangre para completar el ciclo ovariano (ERASMUS, 1975)

Numerosos factores determinan la intensidad de sus picadas pero generalmente se alimentan una vez cada 3-4 días. Sin embargo, cuando el mosquito chupa

sangre infectada, permanece infectado durante toda la vida, la que puede prolongarse hasta 70 días (CSIRO, 1977 - 1978).

Las condiciones ambientales óptimas para su actividad están entre 13 – 35grados centígrados. El Culicoides es activo desde poco antes del anochecer hasta poco después del amanecer, y es transportado por el viento. Los insectos pueden recorrer distancias de 40-700 km en periodos de hasta 20 hs, y pueden ser transportados hasta 1500 metros de altura. El mosquito se alimenta con 10-4-10-5 ml de sangre. También es necesario un titulo elevado de virus para la transmisión. El virus se multiplica en el mosquito y después de esta, cada mosquito puede contener de 10-5-106 partículas infecciosas. De siete a diez días después de alimentarse está capacitado para transmitir el virus (CSIRO, 1977 - 1978).

1.4.3 Hospedadores

Los datos disponibles sobre la persistencia del virus en el huésped no son claros: periodos de persistencia de solo 10 días en ovinos, (variable para cada cepa) , hasta 50 días en esta especie y 100 días o más en bovinos. Para esta determinación, el método de aislamiento parece ser muy importante y métodos más apropiados o sofisticados producen recuperación de virus por periodos más prolongados. (BOULANGER & FRANK, 1975)

En la literatura se mencionan diferentes posibilidades de localización de virus en la sangre. De acuerdo con algunos autores, el virus esta libre en la sangre (CALLIS & DARDIRI, 1981), mientras que otros autores encontraron que el virus persiste en lo glóbulos rojos o blancos. Parece ser que el virus está muy relacionado con los eritrocitos y/o glóbulos blancos en base a las siguientes pruebas: huevos embrionados pueden ser infectados por vía intravenosa, tanto con sangre completa, plasma y glóbulos blancos, y los eritrocitos lavados y almacenados a cuatro grados centígrados permanecen infecciosos durante 14 meses (BOWEN & HOWARD, 1984).

La sobrevivencia del VLA en una población también es posible por transmisión a través del semen o por infección transplacentaria del feto. Toros infectados pueden albergar el VLA en su semen, y se ha encontrado virus a los nueve días pos infección en semen de animales infectados por primera vez. En la literatura se ha mencionado que el periodo de detección del virus en el semen varía entre siete y 106 días pos infección. Aunque se ha demostrado la ocurrencia de VLA en semen, parece ser una situación ocasional (ERASMUS, 1975)

Se cree que el VLA se encuentra en el semen como consecuencia de infiltración de glóbulos de sangre infectados dentro de las secreciones genitales. En ciertos casos se puede encontrar en células germinativas o espermatozoides. Se han descrito anormalidades y partículas similares al virus en espermatozoides de toros infectados latentemente con VLA. Se ha demostrado la transmisión del virus a través del semen por servicio natural o por inseminación artificial. (ERASMUS, 1975)

El VLA puede atravesar el endometrio, así como también se demostró que el virus puede ser aislado de sangre de novillas infectadas experimentalmente por vía uterina (ERASMUS, 1975).

Además es posible la transmisión de virus por vía transplacentaria. La infección fetal aparentemente ocurre poco después del aparecimiento de viremia aguda en la hembra (BOWEN & HOWARD, 1984).

Se tiene poco conocimiento sobre la localización del virus en los embriones, pero posiblemente puede ser aislado de la sangre del feto. Se ha encontrado que el VLA infecta fácilmente embriones de bovinos tras su exposición in vitro . Sin embargo, la transferencia de embriones de vacas con viremia tiene un bajo riesgo de transmitir el VLA. (BLUETONGUE., 1979)

No es posible la transmisión vertical del virus durante los primeros ocho días de gestación por transferencia embrionaria, debido a que la zona pelúcida de los embriones previene su infección.

La recuperación de embriones por medio de métodos no quirúrgicos casi siempre está acompañada de algún grado de contaminación de la sangre, y si la vaca tiene viremia se puede aislar virus del flujo. Sin embargo, los procedimientos de lavado de rutina de los embriones antes de su transferencia elimina la transmisión del virus (BLUETONGUE., 1979)

1.4.4 Portadores del virus

El estado de portador no ha sido completamente definido y portadores latentes no siempre tienen anticuerpos detectables (ERASMUS, 1975).

Los bovinos que albergan virus deben ser serológicamente negativos a las pruebas estándar . Esta falta de anticuerpos y la presencia de VLA puede ser una característica de infección latente en ciertos bovinos, comparable con la enfermedad de la mucosa donde frecuentemente no se forman anticuerpos seroneutralizantes (BOWEN & HOWARD, 1984).

No se tiene conocimiento del sitio de replicación de VLA latente en bovinos infectados o en qué forma el virus se encuentra en el animal, a no ser que está en estrecha asociación con los eritrocitos (BOWEN, HOWARD, ELSDEN, & SEIDEL, 1983).

En bovinos infectados de forma latente, con frecuencia es difícil aislar del torrente Sanguíneo, pero cerca de una hora después de exposición experimental al Culicoides los animales desarrollaran una viremia detectable. Aun no se conoce el mecanismo de esta estimulación del virus (ERASMUS, 1975).

1.4.5 Áreas endémicas

En la región Amazónica y en las florestas tropicales de América central el vector se encuentra presente durante todo el año y se puede mantener un ciclo continuo de infección por VLA en culicoides y en rumiantes locales. Después de la perdida de los anticuerpos maternos los animales jóvenes son infectados, pero los animales locales no muestran signos de la enfermedad.

En otras regiones de América Central hay una estación húmeda y una seca. Durante la estación seca el número de culicoides disminuye pero aún restan insectos para mantener el virus durante este periodo. Los animales locales no muestran la enfermedad clínica, pero si los ovinos introducidos (SELLERS R. , 1981).

1.4.6 Áreas Epidémicas

En las áreas de los Estados Unidos donde el invierno es frío, el virus puede ser introducido por moscas transportadoras por el viento o por el movimiento de los animales.

Puede persistir durante uno o dos años, desaparecer y ser reintroducido nuevamente. La enfermedad generalmente se presenta en ovinos.

En Canadá la LA raramente es introducida. La enfermedad ocurre en ovinos y desaparece cuando los vectores disminuyen debido al invierno prolongado. (SELLERS R. , 1981)

1.5 Patología

Las lesiones más importantes del aparato digestivo son generalmente encontradas dentro y alrededor de la boca. Se puede encontrar ulceraciones en la nariz y ocurre hiperemia del esófago. Comúnmente se observa hiperemia de las papilas del rumen y de las dobladuras reticulares. En la mucosa del abomaso se presentan

hemorragias petequiales y la subserosa que circunda el píloro con frecuencia está difusamente hiperémica (ERASMUS, 1975).

Hemorragias nítidas, con un tamaño entre 2-15 mm se encuentran consistentemente en la túnica media en la base de la arteria pulmonar y generalmente son consideradas como patognómicas de LA. En los Estados Unidos, la necrosis del músculo papilar del ventrículo izquierdo del corazón es considerada como uno de los datos más importantes para el diagnóstico. En el examen para necrosis es necesario hacer una incisión transversal de ese músculo porque el área necrótica está localizada en su centro (KAHRS, 1992).

Los ganglios linfáticos, especialmente los que drenan tejidos de la cabeza, comúnmente están agrandados, edematosos y hemorrágicos.

El bazo puede estar ligeramente agrandado.

Las áreas rojizo-oscuras y gelatinosas pueden extenderse desde la subepidermis hacia el tejido conjuntivo intermuscular en toda la carcasa. Las lesiones en los músculos del esqueleto consisten de petequias o equimosis hemorrágicas (1-2 mm de diámetro). Es importante examinar cuidadosamente los músculos para no perder estas hemorragias. La mejor manera de observar estas hemorragias es sostener un corte fino de músculo contra la luz. La degeneración hialina causa un aspecto manchado de los músculos del esqueleto y se encuentra principalmente en los músculos del fémur, hombros, espalda y pescuezo (ERASMUS, 1975).

También ocurre degeneración del músculo cardíaco, lo que probablemente explicaría la muerte repentina de animales poco afectados clínicamente

1.5.1 Patología del feto

Se pueden encontrar los siguientes signos: edema y hemorragias del hígado, la médula suprarrenal y del corazón; una meningitis cerebral y en la médula. (KAHRS, 1992)

1.6 Diagnostico

1.6.1 Diagnóstico Clínico

- Anamnesis: ¿cómo ha sido el desarrollo de la enfermedad?
- Epidemiología.
- El área donde la enfermedad aparece.
- La estación del año.
- Síntomas clínicos: los más importantes son la totalidad de los que aparecen en un rebaño bovino u ovino (mala condición, pérdida de lana, lesiones características en las patas), o en un estado más agudo en un hato ovino (fiebre, edema de la cabeza y pescuezo, y membranas mucosas congestionadas tumefactas con ulceraciones). En bovinos la baja morbilidad característica hace que la enfermedad sea más difícil de diagnosticar.
  Generalmente, cuando la mayoría de los animales ya muestran lesiones en la boca, la leve elevación de la temperatura del cuerpo que puede ocurrir no es más importante para el diagnóstico.
- Necropsia: para el diagnóstico de campo es importante el descubrimiento de pete- quias en los músculos de la espalda.

  Además, no se ven hemorragias en la base de la arteria pulmonar.

  En los Estados Unidos es importante la necrosis del músculo papilar del ventrículo izquierdo del corazón. (METCALF & LUEDKE, 1990)

1.6.2 Diagnóstico de laboratorio

Para confirmar el diagnóstico se debe aislar e identificar el virus, o demostrar la elevación de los títulos de anticuerpos del estado agudo al convaleciente de la infección.

Los resultados seropositivos o seronegativos de una única prueba de anticuerpos del VLA infieren poco sobre lo reciente de la infección o sobre el estado virológico actual en el animal. Debido a estas dos razones, no es posible usar los resultados de animales individuales para indicar la prevalencia del virus.

Los anticuerpos neutralizantes cruzados producidos después de la infección con un determinado tipo de virus en un grupo de animales serán variables. Eso dependerá de la responsividad de los animales individuales. La elevada frecuencia de "grupos" encontrados contra uno o solo algunos tipos puede indicar infección real o que todas las respuestas de anticuerpos restantes son reacciones cruzadas.

La sangre fresca completa es la mejor muestra para aislamiento de VLA. La sangre debe ser recolectada de animales con fiebre pero aún libres de los síntomas típicos. Se debe recolectar 10-50 ml de sangre en heparina u otro anticoagulante como citrato de sodio. La sangre debe ser transportada al laboratorio en hielo seco. Si el embargue demora más de 48 horas, las muestras deben ser centrifugadas y los glóbulos rojos lavados pueden ser enviados al laboratorio en hielo seco. (KAHRS, 1992)

El procedimiento de lavado es el siguiente:

- remover el plasma después de centrifugar, re suspender los glóbulos rojos y la capa de glóbulos blancos en solución salina normal con uno por ciento de fenol y centrifugar,
- descartar el sobrenadante y re suspender los glóbulos rojos en solución salina fenolizada para obtener su volumen original.

El uso de una mezcla preservativa de glicerol oxalato fenol (OPG = oxalato de potasio 5 g, fenol *5* g, glicerina 500 mi, agua destilada 500 mi) es un excelente estabilizador para el virus y facilita su aislamiento .

Si se usan glóbulos rojos, la cuantificación del virus depende de la ruptura de las muestras de sangre por ultrasonido.

Después de la fase aguda de la enfermedad es posible retirar el bazo o la médula ósea de un animal muerto. Para recolectar muestras de médula ósea, se puede enviar al laboratorio en hielo seco todo el fémur de un novillo, o el esternón de un animal maduro (METCALF & LUEDKE, 1990).

1.6.2.1 Pruebas de laboratorio para identificación de virus

1.6.2.1.1 Prueba de neutralización

Con una prueba de neutralización de virus se puede identificar los anticuerpos específicos al serotipo. Bovinos, ovinos y caprinos muestran esta respuesta neutralizante tipo-específica.

Sueros pareados son ideales para identificar el tipo de virus infectante. A veces se pueden encontrar niveles bajos de anticuerpos neutralizantes cruzados para otros tipos diferentes al agente causante, aun después de la primera infección. Estos títulos serán bajos y no invalidarán el valor de la prueba de diagnóstico de anticuerpo neutralizante. Solo en bovinos se presentan algunas dificultades con respecto a esta prueba de diagnóstico:

- los bovinos producen con mayor frecuencia anticuerpos neutralizantes cruzados que los ovinos o caprinos,
- algunos animales pueden desarrollar niveles de anticuerpos que solo tienen valor para el diagnóstico durante un mes o dos después de la infección.

La exposición continua de animales al VLA en general aumenta el nivel, valencia y duración de anticuerpos neutralizantes cruzados. Finalmente, por esta prueba será imposible diagnosticar los tipos de virus existentes en una determinada área. En un área no conocida, el mejor método para un estudio de virus es recolectar

suero solo de animales jóvenes (hasta de 18 meses de edad) que no hayan tenido más de una o dos infecciones (TAYLOR & GUMM, 1983).

Modificaciones de la prueba: estimativa de títulos de anticuerpos en grupos. Con esta técnica de cálculo se analizan los títulos de anticuerpos neutralizantes de un grupo de animales. Se estima que los títulos de anticuerpos neutralizantes cruzados ocurren en bajos niveles y al azar. De esta forma es posible diferenciar títulos de anticuerpos neutralizantes cruzados de títulos de anticuerpos de tipo de virus infeccioso.

Prueba de neutralización por reducción de placa; Cuando se usan células L-929, las placas de LA aparecen en 48 horas y después de cuatro días pos inoculación el número de ellas se estabiliza (BOULANGER & FRANK, 1975). En el momento es la prueba serológica más sensible para detectar re accionantes.

Los novillos de vacas infectadas durante la preñez demostraron anticuerpos seroneutralizantes en sus sueros después de tomar el calostro. Los anticuerpos de VÍA adquiridos por vía materna solo son detectados durante 60 días, lo cual sin duda es una función de la sensibilidad de la prueba usada (BOORMAN & MELLOR, 1982).

Los anticuerpos neutralizantes son frecuentemente detectados tempranamente en el curso de la infección y por un período más largo que los anticuerpos de FC. Los anticuerpos neutralizantes pueden ser detectados entre 14-30 días después de la infección natural y persistirán por más de 12 meses, o tal vez durante toda la vida.

1.6.2.1.2 Prueba de inmunodifusión en gel agar (IDGA)

Con la prueba del IDGA se puede determinar la prevalencia de anticuerpos para el antígeno común de grupo del VLA. Estos anticuerpos

generalmente pueden ser detectados entre 14-28 días pos infección y persistir por cerca de tres años. Los novillos de vacas infectadas durante la preñez presentan anticuerpos por IDGA en sus sueros después de tomar el calostro. No se encontraron anticuerpos en IDGA después de los 50 días de vida. Sin embargo, otros autores informan que anticuerpos de grupo específico de calostro en novillos desaparecen en algunas semanas y hasta en cuatro meses (IDGA). (BOORMAN & MELLOR, 1982)

La prueba de IDGA ha sido ampliamente usada para estudios serológicos en muchas partes del mundo. Se ha descrito un estudio serológico de 6.274 sueros usando esta prueba (TAYLOR & GUMM, 1983). La prueba (Ouchterlony modificada) también fue usada en un estudio en Irán en 1974 (AFSHAR & KAYVANFAR, 1974).

Desventajas de la prueba de IDGA:

- La prueba IDGA detecta anticuerpos de reacción cruzada para otros orbivirus además del VLA debido a interrelaciones serológicas complejas de los orbivirus. Aun con esta limitación, la prueba de IDGA fue usada con mucho éxito en Australia a pesar de la existencia de muchos orbivirus (TAYLOR & GUMM, 1983).
- La prueba de inmunodifusión (ID) de LA usada en los Estados Unidos frecuentemente es negativa en el momento de recuperación del virus. En un estudio epidemiológico en California, 43% de los bovinos y 23 por ciento de los ovinos de los cuales se aisló VLA fueron negativos a la prueba de IDGA .
- La prueba no da información sobre el título del suero.

La prueba de ID es más confiable, fácil y reproducible que la prueba de FC modificada directa (FCMD), pero menos sensible que el ensayo de inmunoabsorción ligada con enzimas (ELISA) (TAYLOR & GUMM, 1983).

El antígeno usado para la prueba puede ser un antígeno de cultivo celular (ver cromatoenfocado) o cuando el laboratorio no está equipado para cultivo celular un antígeno de cerebro de ratón recién nacido infectado con VLA.

NOTA: El antígeno por ID en cerebro de ratón es altamente eficiente en detectar anticuerpos de VLA en sueros ovinos, pero no tan eficaz como el antígeno de cultivo celular para examinar sueros bovinos (GRIMES, McCONNEL, & LIVINGSTON, 1989).

- La prueba da resultados generalmente dentro de las 18 horas, y no después de las 48 horas.
- IgG es la principal reaccionante en la prueba de IDGA.

Prueba de micro precipitación en creí de agar (IDGA) :

Los resultados son muy semejantes a la prueba de FCMD cuando se usa un antígeno de cultivo de tejido preparado por diálisis a presión. La cantidad relativamente grande de este antígeno que hay que preparar especialmente para la prueba es desventajosa. La prueba no se adapta para la titulación de anticuerpos en sueros. Esta prueba puede servir como un control adicional en un número limitado de muestras. (BOULANGER & FRANK, 1975)

Cromatoenfocado e isoelectroenfocado ;

El Instituto de Investigación de Tubingen, Alemania Occidental, desarrolló una técnica para aislar antígeno grupo especifico de LA por medio de cromatoenfocado. Mediante esta técnica la proteína inducida del VLA (proteína 7 = P7) es purificada a partir del sobrenadante de cultivos celulares. En las pruebas de ID esta P7 purificada siempre muestra solo una línea clara de precipitación. El antígeno P7 no infeccioso del antígeno de grupo de LA también puede ser obtenido por

cromatografía de exclusión y dos ciclos de isoelectroenfocado (GUMM & NEWMAN, 1992).

Este antígeno purificado puede ser usado como reactivo para diagnostico.

1.6.2.1.3 Prueba de ELISA

La prueba de ELISA es más sensible que la prueba de IDGA. El antígeno P7 preparado de acuerdo con la técnica de cromatoenfocado (ver prueba IDGA) es adecuado para ser usado en esta prueba. Anticuerpos grupo-específicos pueden ser detectados tan eficientemente por la prueba de ELISA cono por la FCMD. (TAYLOR & GUMM, 1983)

1.6.2.1.3 Prueba de fijación de complemento (FCMD)

Esta prueba no puede ser usada para serotipificar cepas de LA pues solo muestra la reacción del serogrupo.

Los niveles de anticuerpos circulantes permanecen detectables durante 1-3 años después de la prueba original en áreas endémicas (BOULANGER & FRANK, 1975).

La prueba de FCMD es menos sensible que la prueba de ID, y es válida para el diagnóstico de LA.

La prueba de FCMD ha sido aceptada como un requerimiento estándar por los países que solicitan pruebas serológicas de LA en bovinos. El suero para esta prueba es de preferencia recolectado de sangre fresco en vez de sangre completa en OPG.

Algunas desventajas de esta prueba son:

- a veces es difícil estimar los títulos de los sueros debido a la cantidad de variables de la prueba,

- frecuentemente es difícil obtener el factor modificante en novillos donantes adecuados.
- Sueros de algunos bovinos y ovinos tienden a actuar anti complementariamente.

En esta prueba reacciona principalmente la IgM. (HOURRIGAN & KLINGSPORN, 1985)

1.6.2.1.5 Prueba de inhibición por hemaglutinación (IH)

Esta prueba es recomendada como un nuevo método para identificar los diversos serotipos de VLA. El suero debe ser tratado para remover los inhibidores no específicos antes de ser usado en la prueba. Una gran variedad de eritrocitos puede ser usada para esta prueba, incluyendo los de ovinos, aves, cobayos, ratones.

1.6.2.1.6 Técnica de anticuerpo fluorescente

Por este método no es posible diferenciar las cepas del VLA, como con las pruebas de FCMD e IDGA. Es una buena prueba para diferenciar LA de la enfermedad epizoótica hemorrágica (BOULANGER & FRANK, 1975).

1.6.2.1.7 Prueba serológica de hemolisis en gel

Esta prueba ha sido desarrollada en los Estados Unidos, es sensible y se distinguen rápidamente los anticuerpos de VLA de los de la enfermedad epizoótica hemorrágica (TAYLOR & GUMM, 1983).

1.6.2.1.8 Anticuerpos monoclonales

El uso de anticuerpos monoclonales es actualmente importante para el diagnóstico (Callis, J.J. comunicación personal, noviembre 1983).

1.6.2.1.9 Pruebas serológicas usadas en los Estados Unidos

Las pruebas para anticuerpos usadas desde 1969 en los Estados Unidos son: IDGA, FCMD e ID.

1.6.2.1.10 Electroforesis en gel de poliacrilamida

El VLA aislado de muestras no puede ser identificado con referencia a su serotipo en base a su patrón de migración por electroforesis. Dentro de un serotipo existe una gran variación en algunos segmentos del genoma, revelada por PAGE (diferencias en electroferotipo).

La variación genética no parece estar relacionada con la localización geográfica del virus aislado, el año en que se hizo el aislamiento o la especie del animal del cual se obtuvo el aislamiento, y sugiere que esa variación del VLA se manifiesta constantemente.

Además, fingerprintings de oligonucleótidos probaron que una cepa aislada de una y la misma área pasan tanto por una recombinación de segmentos de ARN como por una desviación genética. Estas investigaciones se extendieron por un periodo de 12 años. Los subtipos recolectados en diferentes regiones, pero en el mismo año, también muestran diferencia en el fingerprinting. (TAYLOR & GUMM, 1983)

1.6.2.1.11 Laboratorios mundiales de referencia

- África del Sur: Laboratorio Mundial de Referencia para Lengua Azul, Onderstepoort.
- Reino Unido: Instituto de Investigación de Virus Animales (AVRI), Pirbright.
- EUA: Plum Island Animal Disease Center, Nueva York.
- Canadá: Instituto de Investigaciones de Enfermedades Animales, Ottawa (FAO, 1998).

1.6.3 Aislamiento de virus

1.6.3.1 Portadores

Un fenómeno interesante es la aparición muy temprana de anticuerpos neutralizantes en Ovinos infectados con LA y la coexistencia de títulos de virus y anticuerpos neutralizantes elevados. Esto parece indicar una firme adsorción del virus a la membrana del eritrocito o localización dentro o fuera de la membrana para proteger el virus del efecto neutralizante de los anticuerpos. Es de gran importancia práctica que el virus pueda frecuentemente ser aislado de eritrocitos lavados, cuando la sangre completa da resultados negativos (ERASMUS, 1975).

Se desconoce acerca de los sitios de multiplicación del VLA en bovinos infectados latentemente o en qué forma el virus se encuentra en el animal. Sin embargo, el virus está en estrecha asociación con los eritrocitos en presencia de anticuerpos virus específicos del suero. Subinoculación de sangre de casi todos, los bovinos clínicamente sanos durante los últimos meses de verano en África del Sur produjo LA en ovinos susceptibles, aunque en la misma muestra de sangre se encontraron anticuerpos neutralizantes específicos al virus (HOURRIGAN & KLINGSPORN, 1985).

El período de portador parece depender del tipo de virus.

En la literatura se registra un estado de portador de 16 semanas en bovinos, pero en muchos animales el virus persiste por un período más corto. Un toro, nacido de una vaca infectada, tuvo viremia durante tres años cuando fue mantenido en un área protegida de insectos. Novillos nacidos- de vacas infectadas, en ciertos períodos de la gestación, pueden permanecer constantemente infectados con VLA. Este tipo de viremia puede existir con o sin anticuerpos neutralizantes específicos de LA. (HOURRIGAN & KLINGSPORN, 1985)

Se sabe que en los ovinos circula virus en altas concentraciones y por un período de 31 días.

Sueros recolectados de caprinos en el 14° día después de la infección experimental contenían un elevado nivel de anticuerpos neutralizantes aunque el virus pudo aún ser aislada de sangre recolectada algunos días más tarde. Los caprinos pueden albergar el virus por periodos aún mayores que los ovinos (ERASMUS, 1975).

La técnica de aislamiento es importante para obtener un resultado positivo de un portador.

1.6.3.2 Aislamiento de virus de portadores por inoculación de ovinos, huevos embrionados o cultivos celulares

De acuerdo con la literatura, no es fácil concluir cuál es el método más sensible para aislar el VLA de portadores.

La mayoría de los autores opinan que la inoculación de eritrocitos lavados en ovinos susceptibles da la mayor tasa de VLA de los rumiantes domésticos sospechosos de estar infectados. Para detectar la viremia crónica de LA el método de eritrocitos lavados/ovino parece más adecuado que la inoculación de embriones de pollo, puesto que el VLA presumiblemente está primero asociado con la sangre. Por ejemplo, cuando el virus no pudo ser demostrado por más de 28 días usando huevos embrionados, fue posible aislarlo por el método de eritrocitos lavados/ovino por más de 100 días. (HOURRIGAN & KLINGSPORN, 1985).

Esta mayor sensibilidad podría ser explicada por el volumen más grande del inoculo usado en ovinos que en huevos y una mayor patogenicidad de cepas especiales para ovinos que para huevos embrionados.

En contradicción con lo anterior están las siguientes observaciones:

- Algunos autores informaron que la inoculaciónen la membrana corioalantoidea de huevos embrionados con incubación a 33,5℃ fue un sistema más

susceptible que los cultivos celulares u ovinos.

- Otros autores encontraron que huevos embrionados inoculados por vía intravenosa son tan sensibles como los ovinos para el primer aislamiento del VLA. Sin embargo, en un estudio de aislamiento solo un embrión en diez inoculados produjo virus detectable.

Conclusión: La combinación de los sistemas, huevos embrionados y ovinos, parece ser lo más adecuado debido a que tanto los huevos como los ovinos fallaron en demostrar virus en algunas ocasiones. Esta combinación de sistemas de prueba seria el método preferido para certificar animales destinados a exportación. (HOURRIGAN & KLINGSPORN, 1985)

1.6.3.3 Método de eritrocitos lavados

Eritrocitos lavados tres veces deben ser usados de inmediato para inocular huevos embrionados u ovinos o ser almacenados a 4℃. Luedke y col describieron una modificación de esta técnica por la cual el coágulo buffer no es removido porque contiene LA solo durante el estado agudo de la infección y la concentración del virus nunca es tan elevada como en la fracción del eritrocito. Solo un lavado de los eritrocitos es suficiente para remover el plasma. (LUEDKE, WALTON, & BRECKNON, 1990)

1.6.3.4 Técnica de sangre autoinyectada en ovinos

Cuando se utilizan ovinos como método de ensayo de VLA se inoculan eritrocitos lavados. En este procedimiento se utiliza sangre autoinyectada en lugar de pasajes seriados en ovinos.

A los 5, 6, 7 y 8 días pos inoculación la sangre de cada oveja inoculada es recolectada e inmediatamente se inyecta 10 ml por vía subcutánea en la misma oveja. La temperatura del cuerpo de los animales de prueba es registrada dos veces al día hasta el 28°día pos inoculación. A partir del 28°día, cada

animal es sometido a la prueba de FCMD. Se desconoce todavía el mecanismo del procedimiento de autoinyección de sangre.

1.6.3.5 Inoculación en huevos

Se realiza la inoculación de la membrana corioalantoidea o del saco vitelino. Después de 2-4 días el embrión morirá con una apariencia rojiza debido a hiperemia y hemorragias en las membranas. Frecuentemente son necesarios varios pasajes hasta que la muerte del embrión ocurra a los 2-4 días.

Se demostró que los embriones de pollo de 10-11 días de edad eran 100-1000 veces más sensibles a la LA cuando inoculados por vía intravenosa que los embriones de ocho días inoculados en el saco vitelino. Por ejemplo, cuando se realizaron 28 aislamientos primarios exitosos del tipo 16 del VÍA por inoculación intravenosa de huevos embrionados, solo un 70% fue positivo a la inoculación en el saco vitelino. (BOULANGER & FRANK, 1975)

1.6.3.6 Cultivo de tejido

Se pueden usar varias líneas celulares. Con frecuencia se usan cultivos en monocamadas de riñón de cordero, pero estos son infectados con menor rapidez y el efecto citopático es menos extenso (después de 1-8 días) que en otras líneas celulares.

El VLA también se desarrolla en células de riñón de feto bovino. Después de uno o más pasajes en huevos, el VLA se desarrolla en células BHK-21, VERO y cultivos celulares L-929. Otras células usadas para cultivo del virus son: células fibroblásticas de ratón, células de médula ósea de feto bovino, cultivos macrofágicos de bovino, cultivos orgánicos de anillos de la tráquea, testículo de novillo, C 6/36 (=línea celular de insecto) , IB-RS-2 (células cultivables en suspensión en tubos rolantes) , cultivos celulares estables de células de riñón de mono, línea celular de pulmón de feto ovino .

Las diferentes cepas de LA no crecen con la misma eficiencia.

Cuando el virus se multiplica, aparecen estructuras tubulares características de los orbivirus en el citoplasma de la célula. (LUEDKE, WALTON, & BRECKNON, 1990)

1.6.3.7 Aislamiento primario de cepas de campo de VIA

Los aislamientos primarios de cepas de campo de VÍA en cultivos de tejidos no son satisfactorios. El mejor método es hacer un pasaje del material de campo en huevos embrionados antes de introducirlo en el cultivo celular.

Un hato con frecuencia puede estar infectado por más de una cepa del VIA. Más de un serotipo ha sido aislado de un único animal, aunque normalmente existen anticuerpos neutralizantes cruzados después de la primera infección. También ha sido posible demostrar experimentalmente la circulación simultánea de una cepa o más del VIA en animales infectados por inoculación intravenosa con vacuna polivalente.

El aislamiento y- tipificación de cepas de VIA se puede obtener en 10 días (BOORMAN & MELLOR, 1982).

1.6.3.8 Aislamiento de virus de semen

Durante la viremia, el VIA puede ser encontrado en el semen de toros. El semen puede ser examinado por inoculación intravenosa tanto de huevos embrionados como de ovinos (DELLA-PORTA, SELLERS, & HERNIMAN, 1983).

1.6.4 Producción de antígeno viral

Para obtener el antígeno del virus se infectan por vía intracerebral ratones recién nacidos con cepas adaptadas en huevos. El material de campo no es adecuado para este propósito.

Ratones lactantes de 1-4 días de edad son susceptibles cuando inoculados por vía intracerebral. Los ratones adultos producen cantidades menores de virus (ver también Prueba IDGA: cromatoenfocado) (ERASMUS, 1975).

1.6.5 Diagnostico diferencial

- Fiebre aftosa: La LA y la fiebre aftosa son difíciles de diferenciar entre sí. En ovinos, algunos estados avanzados de la fiebre aftosa son semejantes a LA. Esta es una enfermedad "necrótica" mientras que la fiebre aftosa es una enfermedad vesicular, pero después que las vesículas se rompen la apariencia de la mucosa en ambas enfermedades puede ser igual.

La distribución de las lesiones de LA en la mucosa en bovinos no tiene valor diagnóstico. En ovinos las úlceras lenticulares necróticas, que a veces se desarrollan en los lados laterales de la lengua, son patognómicas para LA.

Debido a que los signos clínicos no son muy diferentes entre fiebre aftosa y LA, el diagnóstico diferencial final solo puede realizarse en un laboratorio.

- Estomatitis vesicular; ver fiebre aftosa.
- Peste bovina; Las lesiones en la boca son parecidas a la LA. Las diferencias son: en la peste bovina el período de incubación y duración de la enfermedad es menor, puede ocurrir durante todo el año y, al contrario de la LA, su transmisión es fácil de ovino a bovino.
- Dermatitis pustular contagiosa; ver ectima contagioso.

Dos enfermedades con una rápida elevación de la temperatura

- Hidropericardio (a veces se presenta junto con la LA), el período febril es menor, hay síntomas nerviosos, el frotis del cerebro es positivo, y la enfermedad responde a las tetraciclinas.
- Encefalitis transmitida por artrópodos (Fiebre del Valle del Rift y virus Wessels-Bron); Sin necrosis focales o inclusión de cuerpos acidofílicos

en el hígado. En caso de duda será necesaria la confirmación de laboratorio.

- Enfermedades fáciles de confundir con estomatitis ulcerativa o infecciones secundarias
- Viruela ovina: La enfermedad no causa lesiones en las patas y las pústulas no se restringen solo a la boca.
- Ectima contagioso: En esta enfermedad se presentan pápulas y pústulas en vez de hiperemia, edema y ulceración como en la LA (ver Dermatitis pustular contagiosa).
- Enfermedades del bovino
- Mal del sudor: Tiene la misma ocurrencia estacional que la LA. Las diferencias son: afecta especialmente a bovinos jóvenes, ocurre solo en regiones más cálidas, en contraste con la LA el epitelio de la piel presenta excoriaciones mayores, y no es transmisible por la sangre.
- Fiebre efímera o de los tres días; Rigidez y parálisis se presentan en forma más notable. No hay hiperemia o necrosis de la mucosa de la boca; no ocurre en ovinos bajo condiciones normales y no es transmisible a ovinos susceptibles a la LA.
- Difteria en novillos: Presenta lesiones bien definidas y más severas en la boca y laringe. Se restringe a novillos y no es transmisible por la sangre.
- Diarrea viral bovina (DVB). Rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB). Fiebre catarral maligna. Enfermedad de las mucosas. - Fotosensibilidad .
- Y lógicamente, fiebre aftosa y estomatitis vesicular.

Se debe prestar especial atención a la estación.

Otras enfermedades

- Avitaminosis E en ovinos; Falta de vitamina E.
- Disturbio de la circulación sanguínea en las patas debido a fallas en el metabolismo.

- Enfermedad Ibaraki; En bovinos causa una severaenfermedad similar a LA pero no afecta los ovinos. Solo ha sido diagnosticada en el Japón.
- Enfermedad hemorrágica epizoótica del ciervo; La enfermedad es clínicamente idéntica en bovinos y ciervos. Se encuentra en Canadá, Estados Unidos, gran parte del área del Caribe, Australia y África Occidental.
- Neumonía; Cuando al final del verano o principio de otoño ocurre una elevada mortalidad debida a neumonía se debe considerar la LA (HOURRIGAN & KLINGSPORN, 1985).

1.7 Tratamiento

La terapia consiste solo en tratamiento sintomático. Debido a las lesiones en la boca solamente se recomiendan alimentos verdes suaves. La boca y la nariz deben ser rociadas varias veces con una solución a baja concentración de un desinfectante no irritante, como el permanganato de potasio, o líquidos con aluminio y glicerina.

Es muy importante examinar regularmente la motilidad del rumen de los animales en recuperación. En esta fase es imprescindible una alimentación de buena calidad.

Los animales infectados deben ser mantenidos a la sombra debido a que la luz solar deteriora los síntomas cuando hay lesiones en la piel. Las lesiones superficiales de la piel deben ser tratadas con soluciones que prevengan infecciones secundarias.

Se recomienda pequeñas cantidades de un laxante, por ejemplo azúcar. (CARROLL, 1990)

1.8 Control y prevención

1.8.1 Normas importantes para animales vivos y productos de origen animal

Debido al hecho de que es casi imposible erradicar la infección una vez que se ha establecido, los países libres de la enfermedad deben tomar todas las precauciones posibles para prevenir su introducción a través de la entrada de animales de pezuña hendida o insectos vectores.

Antiguamente en los Estados Unidos todos los rumiantes, incluyendo aquellos para los zoológicos -excepto los provenientes de México u otros países libres de la infección- eran examinados para detectar evidencias de VIA antes de la importación.

Una decisión reciente del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para permitir la importación de rumiantes con evidencia serológica de infección previa con tipos desconocidos de VLA ha ocasionado una gran preocupación entre los criadores de ovinos y bovinos, y los protectores de animales salvajes. La decisión fue tomada a pesar del hecho que solo cinco de los 23 tipos de VLA habían sido aislados en los Estados Unidos, y de la poca sensibilidad de las técnicas de diagnóstico conocidas para certificar que un rebaño está libre de la enfermedad. La decisión ha sido rebatida por la Asociación de Salud Animal de los Estados Unidos .

Los reglamentos anteriores de los Estados Unidos con referencia a la importación de rumiantes con relación al VLA eran los siguientes: de los animales seropositivos a la prueba de ID se recolectaban muestras de sangre para aislamiento de VLA. Si se aislaba virus de cualquier animal del grupo, todo el grupo era prohibido de entrar en los Estados Unidos. Si no se aislaba VLA en ninguno de los animales, todo el grupo podía entrar. Se debe notar que siempre existe el riesgo de importar portadores que son serológicamente negativos. Esto fue evidente cuando en febrero de 1980, 60 bovinos cebú provenientes de Brasil fueron admitidos en el Centro de

Importación de Animales Harry S. Truman, en Florida, Estados Unidos (Flemming Key, Key West, Fila.)- Estos bovinos fueron examinados exhaustivamente para varias enfermedades durante el período de cuarentena en Brasil y los animales positivos fueron desclasificados. Sin embargo, a la llegada al Centro de Cuarentena en Florida, cuatro animales presentaron anticuerpos positivos al VIA durante los 30 días después de la última prueba en Brasil. Durante el período de 150 días de cuarentena en los Estados Unidos, otros cuatro animales desarrollaron anticuerpos al VLA. De uno de los ocho animales positivos en las pruebas serológicas se aisló VLA tipo 4, exótico en los Estados Unidos.

La prueba oficial para exportar de Canadá para los Estados Unidos es la ID para LA.

No hay justificación para restringir el movimiento de animales en el área del Caribe.

El virus también puede ser transportado en el semen y óvulos y se debe evitar esas importaciones de áreas infectadas, aunque en la literatura se menciona que la transferencia de embriones no está asociada con la transmisión del VLA.

En los Estados Unidos se describe un procedimiento para certificar que los toros con anticuerpos de VLA están libres de infección viral activa. El protocolo incluye la inoculación de sangre de toros en huevos embrionados y en ovinos susceptibles, así como inoculación de semen en ovejas. (TAMAYO, ALONSO, & SCHOEBITZ, 1993)

El semen es almacenado en cuarentena durante doce meses antes de entrar en Australia. Este período permite comprobar cualquier enfermedad importante en los animales del país exportador. Entre estas enfermedades, el toro debe ser negativo a la prueba de FCMD durante el primer día de recolección del semen y cada 60 días de ahí en adelante durante el período de recolección, con una prueba final a

los 30 días después de la última recolección. No se permiten las importaciones de países donde la enfermedad es endémica. Los aviones de estos países deben ser rociados por dentro con un insecticida después del despegue. Las importaciones deben realizarse durante los meses de invierno y los animales deben ser examinados para la presencia de virus durante más de 30 días. Es importante evitar la importación de animales preñados. La carne, lana y cuero no transmiten la enfermedad y pueden ser importados sin ninguna restricción. Sin embargo, después que se descubrió el VLA en Australia, el país tuvo numerosos problemas para la exportación de los productos arriba mencionados (HOURRIGAN & KLINGSPORN, 1985).

1.8.2 Vacunación

La vacunación es el principal método de prevención.

Vacuna de virus vivo atenuado

Esta vacuna empíricamente es atenuada por una serie de pasajes en huevos y producida en cultivos de tejidos. Los pasajes seriados en huevos embrionados rápidamente reducen la virulencia del virus.

La vacuna monovalente da una buena protección. La administración de una única cepa potente es seguida por una inmunidad de larga duración. Con las vacunas polivalentes pueden ocurrir interferencias, y parece difícil obtener una inmunidad efectiva.

Los problemas ocurridos en África con la vacuna polivalente son: interferencia entre las cepas, diferencia en la capacidad inmuniza-dora, diferencias de la velocidad de crecimiento entre cepas modificadas, y respuesta inmunitaria diferente en cada animal.

En África del Sur, donde existen por lo menos 17 cepas, la vacuna viva es aplicada en tres inyecciones con tres cepas diferentes. La vacunación debe ser repetida anualmente. Investigadores en África del Sur también experimentaron con vacuna pentavalente aplicada a intervalos de por lo menos tres semanas. Ovinos vacunados de acuerdo con este protocolo desarrollan anticuerpos en una media de aproximadamente ocho de los serotipos.

Otros han informado sobre el uso de una vacuna polivalente que incluye los 16 serotipos principales y que da una protección de cerca de un año (ERASMUS, 1975).

Experimentos con una vacuna producida en cultivos de células de riñón de mono estables que contenían los serotipos 1-16 resultaron solo en títulos positivos para 3-8 de los serotipos (AWAD, 1978).

Debido a que cada año en los Estados Unidos hay cinco tipos activos sería necesaria una vacuna que incluya los cinco serotipos del VLA en actividad. Sin embargo, la vacuna americana es una vacuna viva modificada con 10 serotipos de VLA producida en células de feto bovino, solo está autorizada para ser usada en ovinos, no siendo aprobada para bovinos.

En España y Portugal se utiliza con éxito una vacuna con cuatro tipos (cepas atenuadas en huevos) contra la quinta cepa heteróloga.

Experimentalmente, la administración de dos tipos de VLA protege contra el desarrollo de viremia seguida a la inoculación de un tercer tipo de VLA; por ejemplo, la inoculación del tipo 4 resultó en anticuerpo neutralizante homólogo, y la inoculación siguiente del tipo 3 causó una amplia respuesta heterotípica. Sin embargo, en un experimento se observó que la administración en serie de dos o más VÍA indujo anticuerpos heterólogos, pero no ocurrió lo mismo con la inoculación simultánea de los mismos tipos de virus. Se cuestiona si es posible

producir vacunas mezcladas que consistan de un número pequeño de VLA, pero que den una amplia cobertura heterotípica.

La prevención de viremia cuando un tercer tipo de VLA es inoculado podría explicarse por el desarrollo de células con memoria, que bajo estimulación rápidamente desarrollan anticuerpos, seguido por la anulación de la viremia.

La importancia funcional de la respuesta inmunitaria humoral y celular en la protección y recuperación debe ser estudiada antes que una vacuna modificada pueda ser preparada con algunos tipos de VIA que puedan dar una amplia protección heterotípica.

Aún continúan los trabajos con vacunas inactivadas .

Fingerprinting del VLA reveló que el desvío antigénico ocurre con mucha frecuencia. Los determinantes antigénicos posiblemente se encuentran en una proteína, para los cuales solo uno de los segmentos provee el código.

Se está realizando un trabajo de investigación sobre el desarrollo de una vacuna LA inactivada potente para uso en ovejas preñadas, corderos jóvenes que aún poseen inmunidad pasiva residual, y en países no enzoóticos.

La inoculación del VLA inactivado parece dar alguna protección tras una prueba de desafío subsecuente, en vez de causar una condición sensible que provoque la enfermedad clínica. Sin embargo, después de dos inoculaciones con VLA inactivado, asociado con drogas inmunomodulatorias, la enfermedad provocada por desafío se asemeja mucho a LA clínica en bovinos. En este experimento, los animales control que solo recibieron la dosis de desafío no mostraron signos clínicos. Algunos investigadores informaron que la vacuna monovalente da una inmunidad en ovinos y bovinos por un año o por toda la vida, pero el animal puede estar sensible y desarrollar una respuesta más severa si es afectado con virus de otro tipo (METCALF & LUEDKE, 1990).

La vacuna inactivada induce en ovinos la producción de anticuerpos FC, precipitantes y una estimulación positiva de linfocitos pero no de anticuerpos neutralizantes. Esta reacción de estimulación linfocitaria así como la falta de anticuerpos neutralizantes puede diferenciar los ovinos vacunados de los no vacunados después de una infección natural.

El análisis de la importancia inmunogénica relativa de las proteínas virales de LA debe esperar a la purificación del virus. La inmunidad después de la infección natural parece ser por lo menos por un año.

El desarrollo de una vacuna para bovinos es importante en vista del papel que juega esta especie en la epizootiología de la LA. Aunque las pérdidas económicas que la enfermedad ocasiona en los bovinos son insignificantes comparadas con las de los ovinos, es posible que sean aún más importantes en un programa de erradicación para prevenir la diseminación de la infección en bovinos de lo que son en ovinos. La creación de una población bovina inmune sería de mucha importancia para el control de la enfermedad (ERASMUS, 1975).

Esquema de vacunación para un área endémica

Vacunación temprana de todos los ovinos con una vacuna viva modificada polivalente, por lo menos un mes antes del inicio de la estación de lluvias. Las ovejas no preñadas deben ser vacunadas por lo menos tres semanas antes del inicio del período de cruzamiento pues la vacunación puede influir en el estro. Las ovejas preñadas no deben ser vacunadas en el inicio de la preñez debido al efecto teratogénico de la vacuna. La administración de vacuna viva atenuada anti-LA a ovejas al inicio de la preñez (5-10 semanas) puede provocar la muerte del feto con reabsorción y desarrollo de anormalidades congénitas tales como encefalopatía y deformidades del sistema óseo.

En investigaciones efectuadas, la revacunación de ovejas durante el sexto mes de preñez no causó daños al feto. Después de la primera vacunación el ovino macho puede quedar temporariamente estéril.

Los animales deben ser vacunados por primera vez después de trasquilados debido a que pueden ocurrir reacciones después de la vacunación (generalmente no son usuales) que damnifiquen la lana.

Los anticuerpos maternos de corderos pueden neutralizar el virus vacunal hasta los seis meses. Los animales recién nacidos son susceptibles a la infección natural aunque la infección generalmente no ocurre hasta que los anticuerpos precipitantes y neutralizantes derivados del virus de origen materno han desaparecido completamente. Entonces, anticuerpos precipitantes (IDGA) y niveles elevados de anticuerpos neutralizantes de virus contra un único tipo de VLA pueden ser encontrados después de un período variable, normalmente 1-2 meses. En un área endémica esto no excede seis meses (ERASMUS, 1975).

1.9 Erradicación

Después que la LA aparece, se deben hacer esfuerzos para minimizar las pérdidas lo máximo posible. España y Portugal son los únicos países donde el VLA fue erradicado con éxito. El brote se inició en 1956 en Portugal y se difundió por España en el período de un mes. La epizootia fue muy severa, con una mortalidad de 75 por ciento en los rebaños ovinos afectados. Las medidas tomadas para erradicar la enfermedad fueron: cuarentena, sacrificio de ovejas infectadas, y vacunación anual obligatoria de todos los ovinos. El último brote ocurrió en 1960. La vacunación cesó y la enfermedad clínica no ha ocurrido más en ninguno de los dos países. (GEERING, 1985)

NOTA: El vector Culícidas no fue erradicado en esta campaña

Las medidas de erradicación dependen de la situación económica del país y de la extensión del área donde el virus es activo.

Los planes de erradicación en Australia son los siguientes: sacrificio de todos los rumiantes en el área infectada, desinfección del área infectada, mantenimiento de una zona de cuarentena mayor en la cual se confinan los animales.

Se define como área infectada a la superficie dentro de un radio de 8 km de los rebaños infectados.

Una zona de cuarentena se puede extender por cerca de 80 km dentro del área infectada, dependiendo de los vientos prevalecientes, topografía, localización del ganado, etc. Estas medidas deben continuar hasta los ocho meses después del último caso clínico de la enfermedad (GEERING, 1985).

En realidad, cuando se encontraron vacas serológicamente positivas, el gobierno solo declaró el confinamiento de bovinos en ciertas áreas durante tres meses. Se estimó que ese período era suficiente debido a la ausencia de casos clínicos (GEERING, 1985) .

1.9.1 Control en áreas endémicas

Poco se puede hacer en las áreas endémicas, excepto restringir la importación de razas de ovinos exóticas o vacunar los animales que serán introducidos (SELLERS R. , 1975).

1.9.2 Control de insectos

La eliminación de focos de cría o rociando mosquitos adultos solo interrumpe el ciclo por 1-2 semanas. Rociar o sumergir los animales puede ser más efectivo.

Se debe notar que en la campaña de erradicación de España y Portugal no se tomaron medidas contra los insectos.

Los controles biológicos parecen ser un enfoque interesante.

La susceptibilidad oral de mosquitos hembras C. variipennis a la infección de VLA puede ser controlada genéticamente. Además, diferentes poblaciones de campo de C. variipennis parecen tener susceptibilidades variables a los diferentes serotipos de VLA. Si una colonia de Culicoides pudiese ser desarrollada para ser resistente a la infección oral con serotipos de VLA, entonces la liberación de mosquitos resistentes al VLA podría ser usada para interrumpir el ciclo de

transmisión de la enfermedad sin destruir la ecología de un área (TAYLOR & GUMM, 1983).

1.9.3 Medidas de prevención por manejo

Transferir el hato para áreas altas y secas donde el Culicoides no existe. La altura arriba del nivel del mar no es importante pero sí lo es la altura local de la pradera en relación con el valle.

- Mantener las ovejas en un establo sin luz durante la noche.
- Alejar los Culicoides durante la noche por medio de humo de hogueras.
- Sumergir las ovejas para eliminar el vector.
- Aplicar repelentes, especialmente en las razas de pelo corto.
- Las ovejas en las regiones enzoóticas deben ser esquiladas al inicio del verano para permitir el crecimiento de la lana antes del inicio de la época de aparecimiento de la LA, al final del verano. Las ovejas recién esquiladas se infectan más rápidamente y generalmente desarrollan una forma más severa de la enfermedad que las ovejas cubiertas con abundante lana (ERASMUS, 1975).
- Una medida de control que parece ser muy eficaz, por lo menos en África del Sur, es colocar bovinos próximos a los ovinos pues el vector Culicoides imicola prefiere al bovino como huésped.
- Los corderos de otoño son los mejores.
- Los nacidos en primavera pierden su inmunidad en el otoño, durante los meses pico de infección de LA. La inmunización es difícil debido a los anticuerpos maternos persistentes.

En un país libre de LA se deben mantener hatos de ovejas centinelas en puntos estratégicos para detectar la diseminación sub clínica entre bovinos antes que afecte grandes áreas sin descubrir la enfermedad. (ERASMUS, 1975).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1 Materiales

Campo

- 200 sueros ovinos de los cuales 100 son procedentes de Machachi, el Beaterio, Lloa de la parte alta, y los otros 100 son del Noroccidente (Pacto), Valle de los Chillos, Guayllabamba, Tandapi de la parte baja.
- 200 jeringuillas con sus respectivas agujas.
- 200 tubos de ensayo para colecta del suero sanguíneo.
- masquin
- libreta de campo

Laboratorio

- Horno eléctrico
- Pipetas automáticas monocanales de volumen graduable
- Pipetas de vidrio de 10 ml
- Porta objetos
- Sacabocado
- Estufa
- Cajas de incubación
- Cámara de luz
- lupa

Reactivos

- Acido bórico
- Hidróxido de sodio

- Agar noble especial
- Agua destilada estéril
- Antígeno y Suero control positivo (origen Centro Panamericano de Fiebre Aftosa)

2.2 Métodos

La técnica utilizada en la presente investigación es la de Inmuno difusión en gel agar (I.D.G.A) que consiste en:

- Preparación del agar:

Calentar hasta la ebullición 1gr de agar noble especial en 100ml de búfer borato hasta que se vea transparente. Colocar 4ml. Sobre un portaobjeto limpio y desengrasado. Dejar enfriar en un ambiente libre de polvo o tapado hasta que solidifique bien. Una vez solidificado conservar tapado y a 4ºC hasta su uso. Perforar usando el sacabocado convencional que indique el kit,de 7 bocas (una central y 6 periféricas). Extraer el agar de los pocillos con bomba de vacío.

- Procesamiento de las muestras.

Colocar el suero positivo de referencia en 3 de los pocillos periféricos en forma alternada. Colocar luego los sueros problema en los orificios restantes. Llenar los pocillos hasta la superficie, sin dejar menisco (aproximadamente 25 ul.).

Colocar el antígeno en el pocillo central de la misma manera.

Incubar a temperatura de (20 – 25℃), en cámara hú meda durante 72 horas.

- Interpretación de resultados

Usar una fuente de iluminación que provea y que incida en forma oblicua al plano inferior de la placa.

- Negativo (reacción de no identidad): La línea control continúa hasta el pocillo del suero problema.

- Positivo (reacción de identidad): La línea control se une en forma continúa con la línea producida por el suero problema.

- Inespecífico: La línea del suero problema se cruza con la línea control.

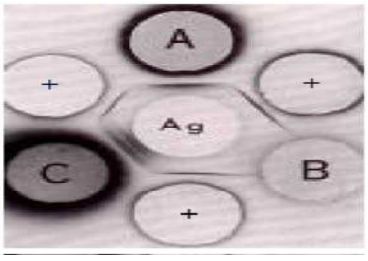
- Positivo o débil: La línea control se curva ligeramente pero no alcanza a formar una línea completa entre el suero problema y el antígeno. Morilla, A., Bautista, C., 1986. Manual de Inmunología pag. 51 - 62.

Para el efecto se preparara una solución búfer de cloruro de sodio y fosfatos, ajar noble especial en polvo; debiendo preparase en la proporción de cien ml de la solución búfer con un gramo de agar noble; se someterá a ebullición para depositarlo en volumen de 4ml en porta objeto estándar se deja enfriar hasta que se gelatinice la suspensión posteriormente con un saca bocado de siete agujeros de 4mm de diámetro y equidistantes entre uno y otro se perfora el agar, con una bomba al vacio se extrae la parte perforada quedando los huecos al vacio.

Se dispondrá de un antígeno específico de la enfermedad y un suero control positivo de un laboratorio de reconocimiento internacional.

Esquema:

Foto 2.1 Test de Anticuerpos precipitantes frente a antígeno de LA.



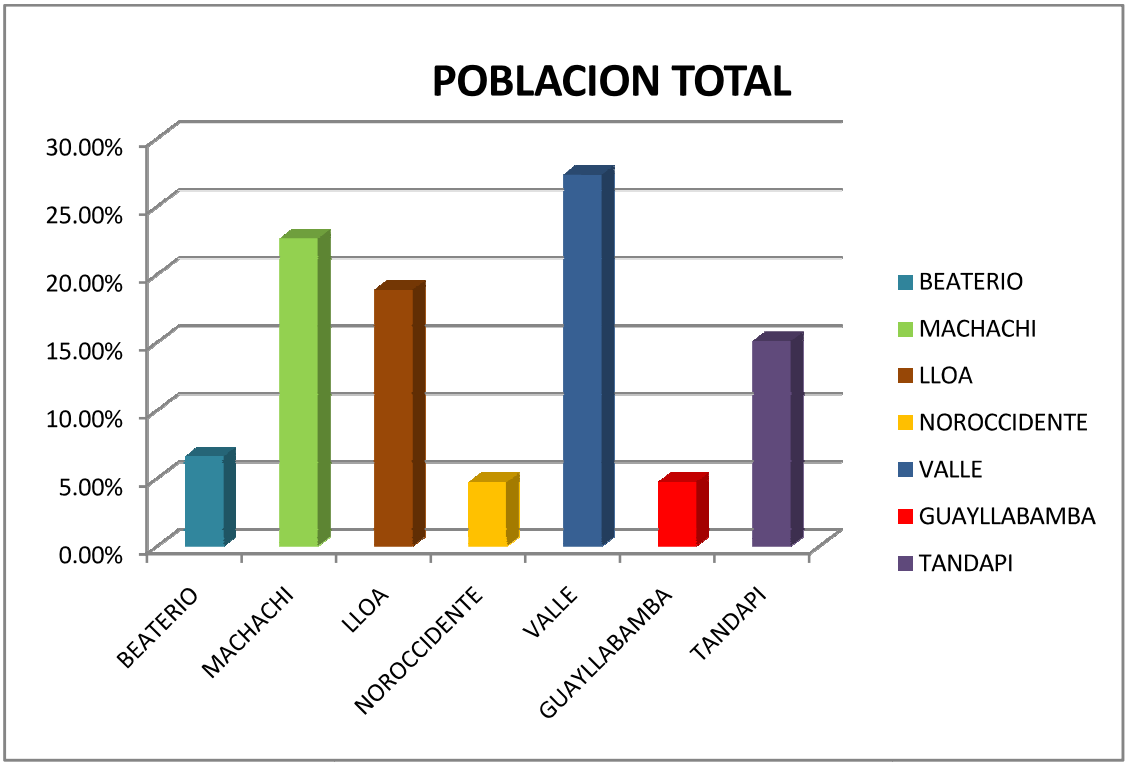
Fuente: OIE, (2009)

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUCIONES

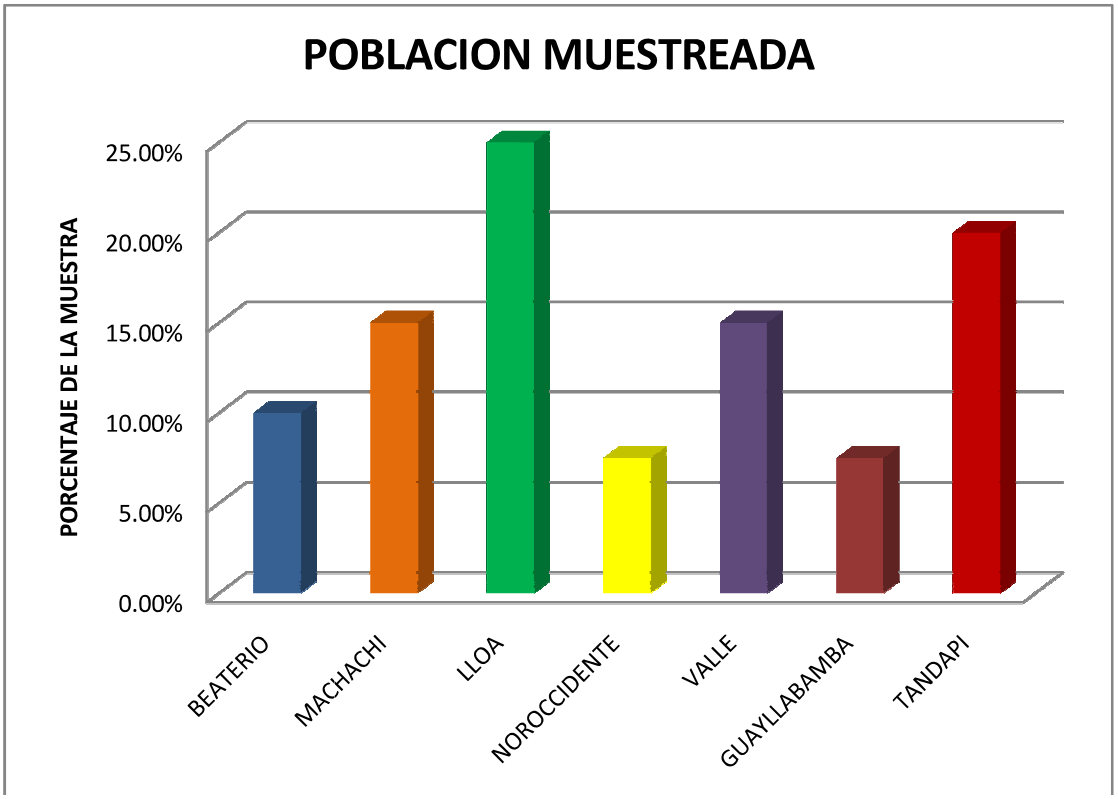
3.1 Resultados

3.1.1



Fuente: Cristian Merino.

Del universo de ovinos de la parte alta y baja de Pichincha podemos decir que el sector del beaterio representa el 6.61%, Machachi representa el 22.64%, Lloa representa el 18.86%, el noroccidente (Pacto) representa el 4.73%, el Valle de los Chillos representa el 27.35%, Guayllabamba representa el 4.72% y Tandapi el 15.09% restante.

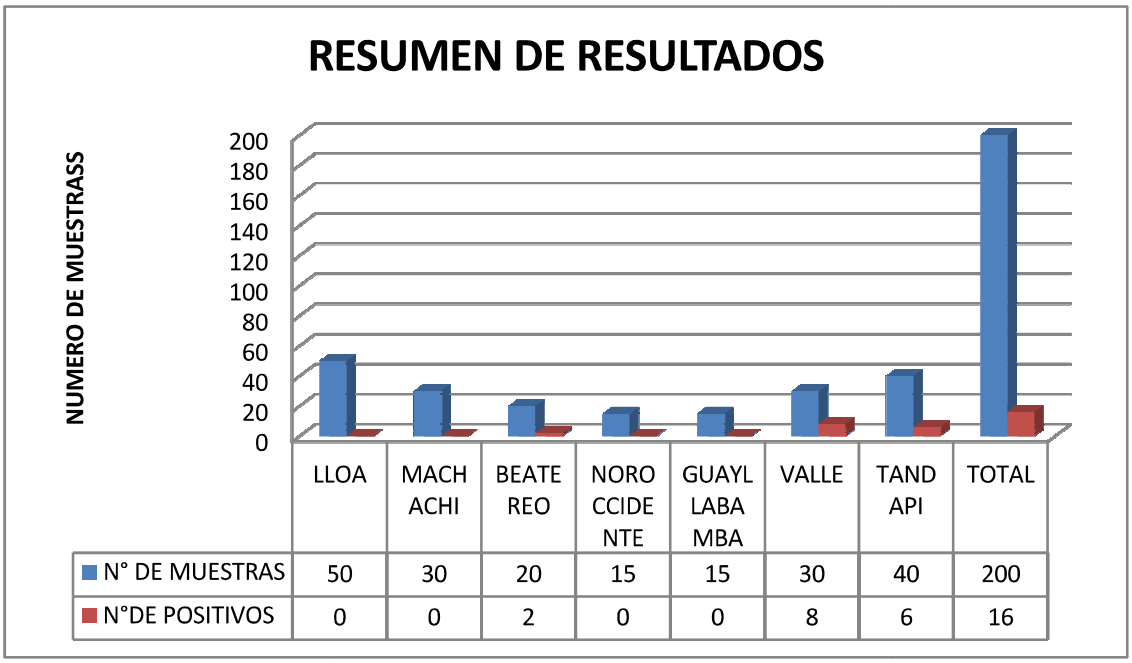


Fuente: Cristian Merino.

Del estudio realizado del 100% de las muestras el 10% corresponde a ovinos ubicados en el sector del beaterio, el 15% corresponde a muestras del sector de machachi, el 25% se refiere a sueros tomados en el sector de lloa, el 7.5% corresponde animales muestreados en el sector del noroccidente de la provincia de pichincha, el 15% se refiere a muestras tomadas en el sector del valle de los chillos, el 7.5% corresponde a sueros sanguíneos tomados en guayllabamba y el 20% restante se refiere a ovinos del sector de tandapi.

NÚMERO DE MUESTRAS PROCESADAS Y PORSENTAJE DE POSITIVIDAD

SECTOR	N°DE MUESTRAS	N°DE POSITIVOS	PORCENTAJE
LLOA	50	0	0,00%
MACHACHI	30	0	0,00%
BEATEREO	20	2	10,00%
NOROCCIDENTE	15	0	0,00%
GUAYLLABAMBA	15	0	0,00%
VALLE	30	8	26,67%
TANDAPI	40	6	15,00%
TOTAL	**200**	**16**	**8,00%**



3.2 Discusión

De los resultados obtenidos se puede decir que 16/200 animales fueron reactores a la presencia de anticuerpos de lengua azul siendo esto un 8% de la población total muestreada, estos se encuentran ubicados en partes bajas.

En bovinos.- estudios realizados en Provincias de la costa ecuatoriana confirman la presencia de anticuerpos, lo que quiere decir que en algún momento hubo circulación de virus de lengua azul, a mas de que las condiciones ecológicas sirven de nicho al agente transmisor.

En caprinos.- estudios realizados en cantón Montecristi de la provincia de Manabí revelaron la existencia de anticuerpos de LA.

De los 363 sueros examinados 27 fueron positivos con un porcentaje de 7.4%.(J.A.MANTILLA y colaboradores – 1994)

En el Ecuador.- estudios realizados en ovinos de la Asociación nacional de cria de ovinos en 670 sueros de esta especie no reveló la presencia de anticuerpos precipitantes a la enfermedad (J.A.MANTILLA y colaboradores – 1992)

Esta información confirma el hecho de que siendo los ovinos los más susceptibles a la enfermedad los bovinos también pude estar afectado, sin embargo el número de animales muestreados en estos estudios es muy bajo y no permite poder tener un panorama real de la prevalencia de la enfermedad.

La situación es diferente en otros países, así estudios epizootiológicos en Argentina señalan igualmente que los

bovinos son el reservorio del virus que a través de los mosquitos culicoides transmiten la enfermedad a otros rumiantes como los ovinos. (O.I.E -1996)

En Venezuela.- estudios realizados en el CENIAP (Centro nacional de investigaciones agropecuarias) (Enero- Junio 1998) revelan que el diagnóstico de la enfermedad en ovinos no es un problema, no así como la enfermedad en los bovinos porque se puede confundir con otras enfermedades como fiebre aftosa, diarrea viral bovina, rinotraqueitis infecciosa bovina que son enfermedades muy comunes en nuestro medio.

Al mismo tiempo se confirma que en zonas de clima húmedo y lluvioso la proliferación del vector aumenta, debido a las condiciones favorables en temperatura y humedad, el mosquito culicoides vive entre temperaturas de 13 a 35 grados centígrados, se alimenta una vez cada 3 a 4 días, es transportado por el viento, recorre distancias de 40 a 700 Km en periodos de hasta 20 hs y pueden ser transportados hasta 1500 metros de altura, este se alimenta con 10.4 a 10.5 ml de sangre (CSIRO, 1997)

La falta de datos al respecto puede estar relacionada a la falta de registros de los casos de la enfermedad, especialmente en las Américas, pese a que la enfermedad es de denuncia obligatoria.

Siendo la especie ovina más susceptible que los bovinos, son éstos últimos los que mayor índice de positividad revelan en estudios realizados en la Américas.

Igual comentario se puede hacer en el país, escasos estudios, revelan que las razas importadas son las de mayor prevalencia en la costa ecuatoriana.

Con estos antecedentes podría hacer un justificativo para que los programas sanitarios de muchos países latino americanos en la que se incluye el Ecuador no haya políticas de control de esta virosis.

La no convivencia de los bovinos con los ovinos hace que estos últimos no presenten anticuerpos precipitantes al virus de la enfermedad como lo demuestra (W. LOPEZ – 1993) en estudios realizados en las provincias de Esmeraldas con un 49.2% y en la provincia del guayas 43.63% en una población 1600 muestras procedentes de las provincias de Esmeraldas, Manabí, Guayas, los Ríos, Santo domingo y el Oro.

CONCLUSIONES

- Se identificó la existencia de anticuerpos precipitantes para lengua azul en ovinos de la parte baja de la provincia de Pichincha.

- A pesar de que el porcentaje de positividad es relativamente bajo, esto se debería probablemente que las condiciones medio ambientales de la parte baja de la provincia, son nichos para el desarrollo y supervivencia del mosquito transmisor de esta enfermedad.

- En la parte alta de provincia de Pichincha en el sector del Beaterio se obtuvieron dos animales reactores a la presencia de anticuerpos, los mismos que por referencia del dueño de la explotación fueron adquiridos en ferias agropecuarias de animales de origen desconocido.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda que para investigaciones posteriores se amplíe las áreas de estudio para obtener mayores y mejores datos de prevalencia

- Se recomienda hacer estudios serológicos en otras especies susceptibles al virus como bovinos y caprinos, para confirmar el hecho de que los bovinos son reservorios.

- Se recomienda que ante la presencia de síntomas compatibles con fiebre aftosa se denuncie a las autoridades competentes para que ellos tomen las debidas precauciones sanitarias para el caso, debido a su alto grado de contagiosidad.

- En el país no hay explotaciones de ovinos especializados en la producción de carne y lana, lo que recomendaría un programa específico para el control de la enfermedad, lo importante es el conocimiento de la circulación del virus.

BIBLIOGRAFIA

AFSHAR, A. & KAYVANFAR, H. Occurrence of precipitating antibodies to bluetongue virus in sera of fann animáis in Irán. Vet.Rec. 94_ (11): 233-235,1990

AWAD, F.I. *et al.* Neutralizing antibody response of sheep inoculated with bluetongue vaccines produced in monkey kidney stable (MS) cell cultures. EgyptianJ.Vet.Sci.j_5 (1/2): 67-75, 1978.

BLUETONGUE. Tijdschr. Diergeneesk. 104 (3): 145-146,1989.

BOORMAN, J.P.T. & MELLOR, P. Notes on *CuHcoides* from the Sudan in relation to the epidemiology of BTV disease. Rev.Elev.Med.Vet. Pays trop. 35 (2):173-178, 1982.

BOULANGER, P. & FRANK, J.F. Serological methods in the diagnosis of bluetongue. Australian Vet.J.51_: 165-189, April 1975.

BOWEN, R.A., HOWARD, T.H., ELSDEN, R.P., SEIDEL.G.E. Embryo transfer from cattle infected with bluetongue virus. Am.J.Vet.Res. 44_ (9): 1625-1628, 1983.

BOWEN, R.A. & HOWARD, T.H. Transmission of bluetongue virus by intrauterine inoculation or inserainationof virus-containing bovine semen. Aro.J.Vet.Res.45 (7): 1386-1388, 1984.

CALLIS, J.J., DARDIRI, A.H. *et al.* Illustratedmanual for the recognition and diagnosis of certain animal diseases. 5th ed., .Greenport, The Plum Island Animal Disease Center, U.S. Department of Agriculture, 1981, p.56-61.

CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization). Australia. 1997/1998.

CUNHA, R.G., De SOUZA, D.M., TEIXEIRA, A.C. Anticorpos precipitantes para o virus da língua azul em soros de bovinos do estado do Rio de Janeiro. Biológico, S.Paulo, 48(4):99-103, 1982. Informativo LAÑARA, IV (21): 29-33, 1983.

DELLA-PORTA, A.J., SELLERS, R.F., HERNIMAN, K.A.J. *et al.* Serological studies of Australian and Papua New Guiñean cattle and Australian sheep for thepresence of antibodies against bluetongue groupviruses. Vet.Microbiol. JJ (2): 147-162, 1993.

EPIZOOTIOLOGY, diagnosis and control of bluetongue in Turkey. Bull.Off.Int.Epiz. j)2 (7/8): 567-574, 1990.

ERASMUS, B.J. Bluetongue in sheep and goats. Australian Vet.J. 51: 165-170, April 1975.

ERASMUS, B.J. The epizootiology of bluetongue: the African situation. Australian Vet.J. 51; 196-198, April 1995.

ERASMUS, B.J. The control of bluetongue in an enzootic situation. Australian Vet.J. 51; 20"9-210, April, 1995.

ERASMUS, B.J. The epidemiology and control of bluetongue in South África. Bull.Off .Int.Epiz. 92 (7/8): 461-467, 1990.

FAO, publication, 1998.

FRANK, J.F. & WILLIS, N.G. Bluetongue-like disease of deer. Australian Vet.J. 51; 174-177,April 1989.

FULTON, R.W. a.o. Prevalence of bluetongue viral antibodies in Lousiana goats. Am.J.Vet.Res. 42 (11): 1985-1986, 1991.

GARD, G.P. & BAINBRIDGE, M.H. Arbovirus serology and isolations frora sentinel cattle in the Northern Territory of Australia, 1981. In Proc. 3rd Symp.: Arbovirus Research in Australia. Brisbane, St. George, T.D. & Kay, B.H., CSIRO, 1992, p.183-188.

GEERING, W.A. Control of bluetongue in an epizootic situation: Australian plans. Australian Vet.J. 51 : 220-224, April 1995.

GEERING, W.A. Bluetongue-related viruses in Australia. Bull.Off.Int.Epiz. 92 (7/8): 537-546, 1990.

St.GEORGE, T.D., CYBINSKI, D.H., DELLA-PORTA.A.J. *et al.* The isolation of two bluetongue viruses from healthy cattle in Australia. Australian Vet.J. 56 (11): 562-563, 1990.

GIBES, E.P.J. Bluetongue - An analysis of current problems with particular reference to importation of ruminants to the United States. JAVMA 182 (11): 1190-1194, 1993.

GIBES, E.P.J. A serplogical survey of ruminant livestock in the Caribbean Región and South America for antibody to bluetongue virus. TICA publication, 1993. 20p.

GIBES, E.P.J., GREINER, E.C., ALEXANDER, F.C.M., KING, T.H., ROACH, C.J. Serological survey of ruminant livestock in some countries of the Caribbean

Región and South America for antibody to BTV. Vet.Rec. 113: 446-448, 1993.

GIBBS, E.P.J., GREINER, E.C., TAYLOR, W.P., BARBER, T.L., HOUSE, J.A., PEARSON, J.E. Isolation of BTV serotype 2 from cattle in Florida: Serotype of BTV hitherto unrecognized in the Western Hemisphere. Am.J.Vet .Res. 44 (12): 2226-2228, 1993.

GILLESPIE, J.H. & TIMONEY, J.F. Hagan and Bruner's infectious diseases of domestic animáis. Seventh Ed., Ithaca, 1981, cap. 47, p.653-660.

GOLDSMIT, L., BARZILAI, E., TADMOR, A. The comparative sensitivity of sheep and chicken embryos to bluetongue virus and observations on viraemia in experimentally infected sheep. Australian Vet.J. 51: 190-196, April 1995.

GORMAN, B.M. Variation in Orbiviruses. J.Gen.Virol.44 (1): 1-15, 1989.

GRIMES, J.E., McCONNELL, S., LIVINGSTON, Ch.W.,UNGER, C.L. Immunodiffusión test antigen from BTVinfectednewborn mouse brains. Vet.Microbiol. J5:363-372, 1993.

GROOCOCK, C.M. & CAMPBELL, C.H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. Can.J.Comp.Med. 46; 160-164, 1992.

GROOCOCK, C.M., PARSONSON, I.M., CAMPBELL, C.H. Bluetongue virus serotype 20 infections in cattle of breeding age. Am.J.Vet.Res. 44 (9): 1765- 1768, 1993.

GRUBMAN, M.J., APPLETON, J.A., LETCHWORTH, G.H. III. Identification of bluetongue virus type 17 genome segments coding for polypeptides associated with virus neutralization and intergroup reactivity. Virology 131; 355-366, 1993.

GUMM, I.D. & NEWMAN, J.F.E. The preparation of purified- bluetongue virus group antigen for use as a diagnostic reagent. Arch.Virol. 72; 83-93, 1992.

GUMM, I.D., TAYLOR, W.P., ROACH, C.J., ALEXANDER, F.

C.M., GREINER, E.C., GIBBS, E.P.J. Serological survey of ruminants in some Caribbean and South American countries for type-specific antibody to bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses. Vet. Rec. 114; 635-638, 1994.

HANDBOOK on animal diseases in the tropics. 3rd. ed. , London, British Vet. Assoc., 1996, p.5-7.

HENNING. M.W. Animal diseases in South África. 3rd. ed., Onderstepoort, 1986, p.809-827.

HERNIMAN, K.A.J., BOORMAN, J.P.T., TAYLOR, W.P. Bluetongue virus in a Nigerian dairy cattle herd. 1 . Serological studies and correlation of virus activity to vector population. J.Hyg. 90 (2): 177- 193, 1993.

HOURRIGAN, J.L. & KLINGSPORN, A.L. Bluetongue: the disease in cattle. Australian Vet. J. 51: 170-174, April 1995.

HOURRIGAN, J.K. & KLINGSPORN, A.L. Epizootiology of bluetongue: the situation in the U.S.A. Australian Ver. J. 51: 203-208, April 1995.

HOURRIGAN, J.L. & KLINGSPORN, A.L. Certification of rutninants, semen and ova for freedom from bluetongue virus. Australian Vet. J. 51: 211-212, April 1995.

HOWELL, P.O. & VERWOERD, D.W. Bluetongue virus. Virology monograph No. 9: Ed. Springer-Verlag, New York 1971, p.35-74.

HUBSCHLE, O.J.B. Bluetongue virus hemagglutination and its inhibition by specific sera. Arch. Virol. 64> (2): 133-140, 1980.

HUBSCHLE, O.J.B. & CHENCYN YANG. Immunodiffusión studies with bluetongue virus usiñg an isolated core protein. In: Proc. of the Third Intern.Symp. of the World Vet. Lab. Diagnost. V.2, Ames, 1983, p.725-729.

HUBSCHLE, O.J.B., LORENZ, R.J., MATHEKA, H.D. Enzymelinked immunosorbent assay for detection of bluetongue virus antibodies. Am.J.Vet .Res. 42 (1): 61-65, 1991.

HUISMANS, H. & ERASMUS, B.J. Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus. Onderstepoort J.Vet.Res. 48 (2): 51-58, 1991.

INSTIT. v. VIROLOGIE. De belangrijkste Virüsziekten bij Zoogdierejp en Pluimvee (lecture manual). Vet. Faculty, Utrecht, 1986.

JEGGO, M.H., WARDLEY, R.C., TAYLOR, W.P. Host response to bluetongue virus. "Double stranded RNA viruses", Elsevier Science Publishing Co., 1993.

JEGGO, M.H., WARDLEY, R.C., TAYLOR, W.P. Clinical and serological outcome following the simultaneous inoculation *of* three bluetongue virus types into sheep. Res.Vet.Sci. 37 (3): 368-370, 1994.

JOHNSTON, J.H. Exotic animal disease emergencies in the Australian Grazing Sector - An economic study - Appendix E: Some observations on the effects of discovering virus serotype 20 in northern Australia, p.111-123, 1992.

KING, T.H. Bluetongue studies in the Caribbean, Guyana and Suriname. In: Proc. First Meeting of the Interamerican Commission on Animal Health, México, 19-23 Sep., 1983, doc.2A, 8p.

KNUDSON, D.L. & SHOPE, R.E. Overview of the Orbiviruses. In: Bluetongue and Related Orbiviruses. Proc. of an International Symp. Monterey, 16-20 Jan., Alan R. Liss Inc., New York, 1994.

KOCAN, A., CASTRO, A.E., ESPE, B., DOYLE, R.T..OLSEN, S.K. Inapparent bluetongue in free-ranging whitetailed deer. J.Am.Vet.Med.Assoc. 181 (11): 1415-1416, 1992.

LEFEVRE, P.C. Current epidemiological situation of bluetongue and risks of its occurrence in Europe. Rec.Med.Vet. 158 (6): 537-542, 1992.

LOPEZ, A. (1993). *Estudios serologicos y aislamiento de agentes causales de enfermedades virales de bovinos en el litoral ecuatoriano*

LUEDKE, A.J., JOCHIM, M.M., JONES, R.H. Bluetongue in cattle: effects of *Culico-ides variipenni-s*transmitted bluetongue virus on pregnant heifers and their calves. Am.J.Vet.Res. ^8 (11): 1687- 1695, 1997.

LUEDKE, A.J., JOCHIM, M.M., JONES, R.H. Bluetongue in cattle: effects of vector-transmitted bluetongue virus on calves previously infected in útero. Am.J.Vet.Res. 38 (11): 1697-1700, 1997.

LUEDKE, A.J., WALTON, T.E., BRECKON, R.D. Blood autograft in sheep for isolation of bluetongue virus from latently infected cattle. Proc. U.S. Animal Health Assoc. 84, 1980, p.203-214.

LUEDKE, A.J. *et al.* Observations on latent bluetonguevirus infection in cattle. JAVMA 156: 1871-1879, 1990.

MANTILLA, A. (1998). Anticuerpos del virus de la LA en ovinos de cría en ANCO. *Instituto Nacional de Higiene* .

MELLOR, P.S., BOORMAN, J.P.T., WILKINSON, P.J., MARTINEZ-

GOMEZ, F. Potential vectors of bluetongue and African horse sickness viruses in Spain. Vet.Rec.

112: 229-230, 1993.

METCALF, H.E., LOMME.J., BEAL Jr., V.C. Estimate of incidence and direct economic losses due to bluetongue in Mississippi cattle.during 1989. Proc. U.S. Animal Health Assoc. JJ4, 1990, p.186-202.

METCALF, H.E. & LUEDKE, A.J. Bluetongue and related diseases. Proc. of the Vet.Prev.Med. and Epidem. World Conf., National Animal Disease Center, Ames, Iowa, June 27-29, 1988.

METCALF, H.E. & LUEDKE, A.J. Epizootiology of bluetongue in the United States of America. Bull.Off. Int.Epiz. 92 (7/8): 507-513, 1990.

METCALF, H.E., PEARSON, J.E., KLINGSPORN, A.L. Bluetongue in cattle: A serologic survey of slaughter cattle in the United States. Am.J.Vet.Res 42 (6): 1057-1061, 1991.

MIURA, Y. *et al.* Seroepizootiological survey on bluetongue virus infection in cattle in Japan. National Institute of Animal Health Quarterly, Japan, 22 (4): 154-158, 1992.

MURRAY, M.D. Potential vectors of bluetongue in Australia. Australian Vet.J. 5J_: 216-220, April 1995.

NAZLIOGLU, M. Distribution, diagnosis and control of bluetongue in Turkey. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitusu Dergisi 13 (1): 46-52, 1991.

OSBURN, B.I., STOTT, J.L., BOSWELL, E.J. A procedure for certifying germplasm and animáis free of bluetongue virus infection. Proc.U.S. Animal Health Assoc. 187, 1983, p.105-110.

OZAWA, Y. & GRIFFITHS, R.B. Bluetongue - A silently spreading disease. Bull.Off.Int.Epiz. 92 (7/8): 593-600, 1990.

PARKER, J., HERNIMAN, K.A.J., GIBES, E.P.S., SELLERS, R.F. An experimental inactivated vaccine against bluetongue. Vet.Rec. 96: 284-287, 1995.

PARSONSON, I.M., DELLA-PORTA, A.J. McPHEE, D.A., CYBINSKI, D.H. et ai. Isolation of bluetongue virus serotype 20 from the semen of an experimentallyinfectad bull. Australian Vet.J. *57^* (5): 252- 253, 1991.

McPHEE, D.A., PARSONSON, I.M., DELLA-PORTA, A.J. Comparative studies on the growth of Australian bluetongue virus serotypes in continuous cell lines and embryonated chicken eggs. Vet.Microbiol. *]_* (5): 401-410, 1992.

PROCEEDINGS of the United States Animal Health Associatioñ 84, 1990: Report of Bluetongue-Bovine Leukosis Committee, p.215-219.

PROCEEDINGS of the United States Animal Health Associatioñ JJ5, 1991: Report of the Committee on Bluetongue-Bovine Leukosis. p.181-187.

PROCEEDINGS of the United States Animal Health Associatioñ 86, 1992: Report of the Committee on Bluetongue-Bovine Leukosis. p.132-135.

SELLERS, R.F. Bluetongue in Cyprus. Australian Vet. J. 5_[: 198-203, April 1995.

SELLERS, R.F. Bluetongue and related Diseases. In; Gibbs, E.P.J.: Virus diseases of Food Animáis, V.II, London, 1981, p.567-582.

SELLERS, R.F. Transmission of viruses by artificial breeding techniques: A review. J. Royal Society Medicine, 76 (9): 772-775, 1993.

SELLERS, R.F. Bluetongue in África, the Mediterranean región and Near East-disease, virus and vectors. Prev.Vet.Med. *2:* 371-378, 1994.

SELLERS, R.F. & TAYLOR, W.P. Epidemiology of bluetongue and the import and export of livestock, semen and embryos. Bull.Off.Int.Epiz. 92 (7/8): 587-592, 1990.

SERGUÉIEV, V.A. Cell culture of bluetongue virus. Veterinariya, Moscow, *5i* 26-27, 1991.

SERGUÉIEV, V.A., MÉTÉLEVA, R.I., KOZLOVA, D.I. La fievre catarrhale du mouton (bluetongue) : quelques aspects de l'epizootiologie du diagnostic et des mesures de lutte. Bull.Off.Int.Epiz. 92 (7/8): 575-580, 1990.

SHIMSHONY, A., GOLDSMIT, L., BARZILAI, E. Bluetongue in Israel. Bull.Off .Int.Epiz. 92 (7/8): 525-534, 1990.

SQUIRE, K.R.E., OSBURN, B.I., CHUANG, R.Y., DOI,R.H. A survey of electropherotype relationships of bluetongue virus isolates from the Western United States. J.gen.Virol. J54: 2103-2115, 1993

STANDFAST, H.A., DYCE, A.L., MULLER, M.J. Vectors of bluetongue virus in Australia. In; Bluetongue and Related Orbiviruses. Proc. of an International

Symp. Monterey, 16-20 Jan., Alan R. Liss Inc., New York, 1994.

STOTT, J.L., ANDERSON, O.A., JOCHIM, M.M., BARBER, T.L., OSBURN, B.I. Clinical expression of bluetongue disease in cattle. Proc. U.S. Animal Health Assoc.

86, 1992, p.126-131.

STOTT, J.L., ELSE, K.C., McGOWAN, B., WILSON, L.K. , OSBURN, B.I. Epizootiology of bluetongue virus in western United States. Proc. U.S. Animal Health Assoc. JJ5, 1991, p.170-180.

STOTT, J.L., OSBURN, B.I., BARBER, T.L. Recovery of dual serotypes of bluetongue virus from infected sheep and cattle. Vet.Microbiol. 7^ (3): 197-207, 1992.

SÜGIYAMA, K., BISHOP, D.H.L., ROY, P. Analysis of the genomes of bluetongue viruses recovered from different states of the United States and át different times (1953-1975). Am.J.Epidem. 115 (3): 332-347, 1982.

TAMAYO, R., ALONSO, O., SCHOEBITZ, R. Anticuerpos de lengua azul (Bluetongue) en bovinos: primer informe en Chile. Arch.Med.Vet. 15 (1): 49, 1993.

TAYLOR, W.P. & GUMM, I.D. Bluetongue studies in the Caribbean: neutralizing antibody studies at AVRI, Pirbright, England, 1993, 4p.

THOMAS, F.C., SKINNER, D.J., SAMAGH, B.S. Evidence for bluetongue virus in Canadá: 1976-1979. Cana— dian J.Comp.Med. 46 (4): 350-353, 1992.

TONGAONKAR, S.S. *et al.* Seroprevalence of bluetongue virus in Indian buffalo. Vet.Rec. 112 (14): 326, 1993.

TOT dusver onbekende stam van Bluetongue virus in Australie. Tijdschr. Diergeneesk. j 03 (1): 73-74, 1998.

VAKGROEP Tropische Diergeneesk. en Protozoologie: Tropical and Protozoal Diseases, (lecture manual, Dutch), Vet.Faculty, ütrecht, 1987, p.228-231.

VASSALOS, M. Cas de fiévre catarrhale du mouton dans l'Ile de Lesbos (Crece). Bull.Off.Int.Epiz. *92_* (7/8): 547-555, 1990.

WALTON, T.E. The diagnosis and control of bluetongue. Bull.Off.Int.Epiz. £2 (7/8): 515-523, 1990.

YUJI INABA. Ibaraki disease and its relationships to bluetongue. Australian Vet.J. 51: 178-185, April 1995.

ZWART, D. Enkele epidemiologische aspecten van Bluetongue. Tijdschr. Diergeneesk. 108 (24): 970-971, 979, 1993.

ANEXOS

Anexo1: manejo del ovino

Fuente: Cristian Merino.

Anexo 2: posición para sacar muestra de sangre de yugular

Fuente: Cristian Merino.

Anexo3: tomando la muestra

Fuente: Cristian Merino.

Anexo 4: rebaño

Fuente: Cristian Merino.

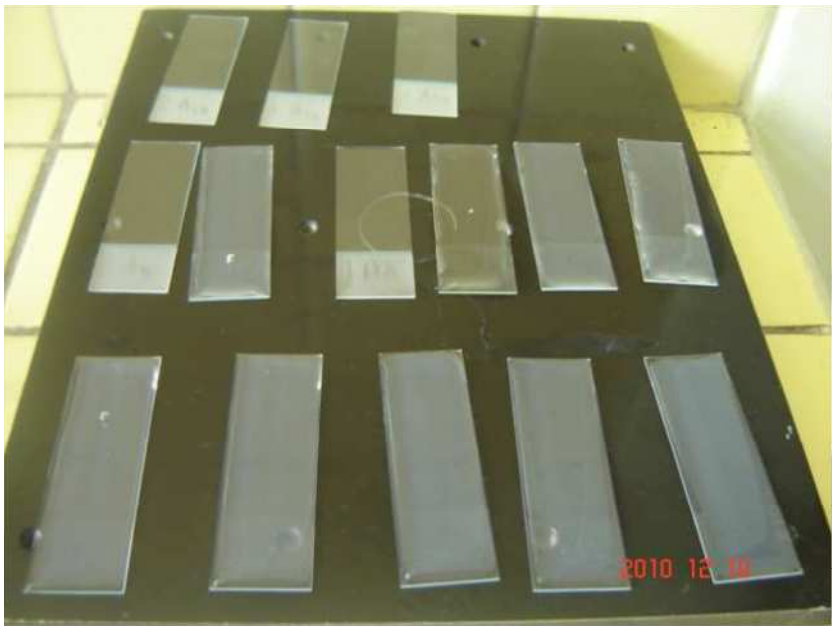
Anexo 5: muestras de sangre

Fuente: Cristian Merino.

Anexo 6: materiales de laboratorio

Fuente: Cristian Merino.

Anexo7: placas listas para la prueba



Fuente: Cristian Merino.

Anexo8: Procesando las muestras

Fuente: Cristian Merino.

Anexo9: Placas con sueros control, problema y antígeno

Fuente: Cristian Merino.

Anexo10: placas lista para incubación

Fuente: Cristian Merino.

Anexo11: Incubadora

Fuente: Cristian Merino.

Anexo12: cámara de luz para la lectura.

Fuente: Cristian Merino.

Anexo13: leyendo los resultados

Fuente: Cristian Merino.