



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DETERMINACIÓN DEL STATUS SANITARIO DE LEUCOSIS BOVINA  
MEDIANTE LA SEROPREVALENCIA A TRAVÉS DE ELISA  
COMPETITIVO EN UN HATO LECHERO EN LA PROVINCIA DE CARCHI.

AUTOR

María Alejandra Orellana Vicuña

AÑO

2019



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DETERMINACIÓN DEL STATUS SANITARIO DE LEUCOSIS BOVINA  
MEDIANTE LA SEROPREVALENCIA A TRAVÉS DE ELISA COMPETITIVO  
EN UN HATO LECHERO EN LA PROVINCIA DE CARCHI.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Médico Veterinario y Zootecnista.

Profesor Guía

Cristian Fernando Cárdenas Aguilera

Autor

María Alejandra Orellana Vicuña

Año

2019

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Determinación del status sanitario de leucosis bovina mediante la seroprevalencia a través de ELISA competitivo en un hato lechero en la provincia de Carchi, a través de reuniones periódicas con la estudiante María Alejandra Orellana Vicuña, en el semestre 2019-10, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Cristian Fernando Cárdenas Aguilera

C.I.: 1718185778

## DECLARACIÓN PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Determinación del status sanitario de leucosis bovina mediante la seroprevalencia a través de ELISA competitivo en un hato lechero en la provincia de Carchi, de la estudiante María Alejandra Orellana Vicuña, en el semestre 2019-10, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Olga Alexandra Angulo Cruz

C.I.: 1714976295

## 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.”

---

María Alejandra Orellana Vicuña

C.I.: 0604851865

## AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen del Quinche por las bendiciones a lo largo de mi vida y por ser fortaleza en los momentos difíciles.

A mis padres, José Luis y Gina por confiar y creer en mí, por los sabios consejos y los valores que me inculcaron desde niña.

A mi tutor Cristian Cárdenas, por los conocimientos compartidos, por su valioso aporte para dirigir este trabajo y por ayudarme a culminarlo exitosamente.

A la hacienda “La Convalecencia”, por permitirme desarrollar este trabajo en sus instalaciones y en sus animales.

A mis amigas Andrea y Daysi, por su apoyo incondicional y sincero.

A mis ángeles Dahiana y Jefferson, que sé que desde el cielo guían cada paso que doy.

A todas las personas que de una u otra forma me ayudaron en la realización de este estudio.

## DEDICATORIA

A mi mamá por siempre ser un apoyo con sus consejos y palabras de motivación, que son las que me trajeron hasta aquí y serán por siempre mi guía.

A mi papá, por su incondicionalidad y amor, por enseñarme a ser perseverante y que la lucha por los sueños no se acaba hasta conseguirlos.

Sin ustedes no estaría aquí.

## RESUMEN

El presente estudio se realizó bajo el esquema de análisis de caso en el hato lechero “La Convalecencia” de la provincia del Carchi, en el cual se identificó como problemática el hecho de que nunca se ha realizado un diagnóstico de Leucosis Bovina en sus animales, por lo que los objetivos del estudio fueron: determinar anticuerpos contra Leucosis Bovina, calcular las seroprevalencias real y aparente de la enfermedad en el hato y la identificación de factores predisponentes. Como metodología se realizaron exámenes clínicos y se analizaron un total de 179 muestras de suero sanguíneo correspondientes a la población bovina total del hato con el kit Id Screen® BLV competition, un ELISA competitivo que detecta anticuerpos contra la glicoproteína gp51 del virus de la Leucosis Bovina; además se realizó una identificación de los factores predisponentes a la enfermedad mediante un check list. Los resultados del estudio demostraron que en el hato existe una prevalencia real del 14.7% (23 animales) y una prevalencia aparente del 12.8%. Mientras que de los 14 factores de riesgo incluidos en el check list, el 78.5% (11) están presentes, y de éstos, 4 corresponden a un nivel de alto riesgo por su involucración con inoculación de sangre. Como conclusión se obtuvo que el status sanitario del hato “La Convalecencia” es que la enfermedad de la Leucosis Bovina está presente de manera activa en 23 de 179 animales y que los factores de riesgos presentes están asociados a prácticas sanitarias no adecuadas.

Palabras clave: Leucosis Bovina, ELISA, seroprevalencia, factor de riesgo.

## ABSTRACT

The present study was carried out under the scheme of case report in the dairy herd "La Convalecencia" in the province of Carchi, in which it was identified as problematic the fact that a diagnosis of Bovine Leukosis has never been made in its animals, for which the objectives of the study arose, which were: to determine antibodies against bovine leukosis virus, to calculate the real and apparent seroprevalences of the disease in the herd and the identification of predisposing factors. As a methodology, clinical examinations were performed and a total of 179 blood serum samples corresponding to the total bovine population of the herd were tested with the Id Screen® BLV competition kit, a competitive ELISA that detects antibodies against the gp51 glycoprotein of the bovine leukosis virus; in addition, an identification of predisposing factors to the disease was carried out by the use of a check list. The results of the study showed a real prevalence of 14.7% (23 animals) and an apparent prevalence of 12.8%. As well, of the 14 factors included in the check list, 78.5% (11) were present, and of these, 4 of them correspond to a high risk level due to their involvement with blood inoculation. It was concluded that the sanitary status of the herd "La Convalescence" against Bovine Leukosis is that the disease is actively present in 23 of 179 animals and that the risk factors present are mostly associated with inadequate sanitary practices.

Key words: Bovine leukosis, ELISA, seroprevalence, risk factor.

# ÍNDICE

I. Introducción.....	1
1.1 Objetivos.....	2
1.1.1 Objetivo General.....	2
1.1.2 Objetivos Específicos .....	2
1.2 Pregunta de Investigación.....	2
II. Marco Teórico .....	3
2.1 Leucosis Bovina.....	3
2.1.1 Agente etiológico .....	4
2.1.2 Signología clínica.....	4
2.1.3 Transmisión del virus.....	5
2.1.4 Factores de riesgo .....	6
2.2 Técnicas de diagnóstico de la Leucosis Bovina.....	6
2.2.1 Detección del agente viral .....	6
2.2.2 Pruebas serológicas .....	7
2.2.3 Kit Id Screen® BLV Competition.....	8
III. Materiales y Métodos .....	10
3.1 Ubicación.....	10
3.2 Población y muestra .....	11
3.3 Información del paciente.....	12
3.4 Materiales.....	15
3.4.1 Examen físico .....	15
3.4.2 Toma de muestras sanguíneas .....	15

3.4.3	Procesamiento de muestras en laboratorio .....	17
3.4.4	Identificación de factores predisponentes.....	18
3.5	Metodología .....	18
3.5.1	Examen físico .....	19
3.5.2	Toma de muestras sanguíneas .....	19
3.5.3	Procesamiento de muestras en laboratorio .....	20
3.5.4	Identificación de factores predisponentes.....	21
3.6	Análisis estadístico.....	22
IV.	Resultados y Discusión .....	24
4.1	Resultados .....	24
4.1.1	Hallazgos Clínicos .....	24
4.1.2	Línea de tiempo.....	27
4.1.3	Evaluación diagnóstica .....	28
4.2	Discusión.....	37
4.3	Limitantes .....	39
V.	Conclusiones y Recomendaciones.....	40
5.1	Conclusiones.....	40
5.2	Recomendaciones.....	40
	REFERENCIAS .....	42
	ANEXOS .....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas UTM del predio “La Convalecencia” de la provincia De Carchi.....	10
Tabla 2. Distribución por categoría de los animales del predio “La Convalecencia” .....	11
Tabla 3. Categorización de animales del predio “La Convalecencia”.....	12
Tabla 4. Esquema Sanitario del predio “La Convalecencia”.....	13
Tabla 5. Materiales para el examen físico.....	14
Tabla 6. Materiales para la toma de muestras sanguíneas.....	15
Tabla 7. Materiales para el procesamiento de muestras en laboratorio.....	16
Tabla 8. Materiales para la identificación de factores predisponentes.....	17
Tabla 9. Niveles de riesgo con sus respectivos factores predisponentes.....	22
Tabla 10. Número de animales que presentaron frecuencias normales y fuera de rango en el examen físico.....	24
Tabla 11. Validación de los controles negativos de la Placa 1 y Placa 2.....	29
Tabla 12. Validación de los controles positivos de la Placa 1 y Placa 2.....	30
Tabla 13. Factores de riesgo presentes y ausentes en el hato “La Convalecencia” según su nivel de riesgo.....	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del hato lechero “La Convalecencia”, Vista Satélite.....	9
Figura 2. Categorización de los factores por nivel de riesgo: alto, medio y bajo.....	21
Figura 3. Distribución por categorías de los animales del hato “La Convalecencia”.....	23
Figura 4. Número de animales por categoría que presentaron frecuencias cardiacas normales y fuera de rango.....	24
Figura 5. Número de animales por categoría que presentaron frecuencias respiratorias normales y fuera de rango.....	25
Figura 6. Número de animales por categoría que presentaron temperaturas normales y fuera de rango.....	25
Figura 7. Línea de tiempo del estudio.....	26
Figura 8. Coloración de pocillos de la placa 1.....	27
Figura 9. Coloración de pocillos de la placa 2.....	28
Figura 10. Lectura de los pocillos de la placa 1 en el lector de ELISA.....	28
Figura 11. Lectura de los pocillos de la placa 2 en el lector de ELISA.....	29
Figura 12. Interpretación de resultados de la Placa 1.....	31
Figura 13. Interpretación de resultados de la Placa 2.....	31
Figura 14. Número de animales por categoría del hato “La Convalecencia” que resultaron negativos y positivos a LB.....	32
Figura 15. Resultados de la encuesta.....	33
Figura 16. Número de factores de riesgo presentes y ausentes en el hato “La Convalecencia”.....	33

## I. Introducción

La Leucosis Bovina (LB) es una enfermedad infecciosa que tiene por agente etiológico a un virus de la familia Retroviridae que afecta principalmente a los linfocitos B y en menor frecuencia a los linfocitos T y monocitos, siendo una de las características de la enfermedad el desarrollo de una respuesta humoral de por vida (Burny y Mammerickx, 1987) (Felmer, Zúñiga, y Recabal, 2006).

La reacción humoral que se produce gracias al sistema inmune del animal infectado se da contra las proteínas gp51 y p24 del virus (Portetelle, Couez, Bruck, Kettmann, Mammerickx, Van Der Maaten, Brasseur, y Burny, 1989), lo que genera las bases de que para su detección y control y/o erradicación son necesarias las pruebas serológicas como el enzimoimmunoanálisis (ELISA) y la inmunodifusión en gel de agar (AGID); aunque también existen pruebas directas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Felmer, Zúñiga, y Recabal, 2006).

La LB está presente en todo el mundo, predominando en el ganado lechero adulto debido al hacinamiento y prácticas de manejo constantes que incrementan la susceptibilidad de contagio; mediante su diagnóstico se puede determinar el status sanitario de la ganadería de todo un país (Giraudó, Bérghamo, Schneider, Magnano, Macías, Sticotti, y Mació, 2010), creando limitantes en la exportación de bovinos, pajuelas de semen y embriones, desencadenando una disminución de ingresos económicos y un retraso en el mejoramiento del ganado del mismo (Pineda y Romero, 2014).

En distintas zonas del Ecuador se han realizados estudios transversales de manera aislada acerca de la presencia de LB a nivel de hatos, obteniendo resultados que van desde el 3.13% al 18% de seroprevalencia (Pineda y Romero, 2014) (Puma y Ayanza, 2013) (Vásconez, Sandoval, Puga, y De la Cieva, 2017) (Veintimilla y Segundo, 2013).

La provincia del Carchi está dentro de las 10 más productoras de leche a nivel nacional y cuenta con aproximadamente 100.000 cabezas de ganado (INEC, 2016), sin embargo nunca antes se ha realizado un diagnóstico de LB en sus animales, lo que incrementa su susceptibilidad al contagio, por lo que el objetivo de este estudio es el de determinar el status sanitario de un hato lechero en dicha provincia mediante la seroprevalencia de LB a través de ELISA competitivo.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo General**

Determinar la seroprevalencia de LB a través del ELISA Competitivo Id Screen® BLV Competition en el hato lechero “La Convalecencia”, para determinar su status sanitario.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

Determinar la presencia de anticuerpos (Ac) contra LB en el suero sanguíneo de bovinos del hato lechero “La Convalecencia” en la provincia del Carchi, mediante un kit de ELISA Competitivo, para determinar la seroprevalencia.

Determinar la prevalencia real y aparente de LB en el hato lechero “La Convalecencia” de la provincia de Carchi, mediante estadística descriptiva para determinar el status sanitario.

Identificar la presencia de factores predisponentes de la enfermedad de LB mediante un check list para presentar recomendaciones al hato.

## **1.2 Pregunta de Investigación**

¿Cuál es la seroprevalencia de LB en el hato “La Convalecencia”?

## II. Marco Teórico

### 2.1 Leucosis Bovina

La LB es una enfermedad de distribución mundial y de declaración obligatoria que tiene importancia tanto en el sector económico por diagnóstico y sacrificio de los animales positivos (Mohammadabadi, Soflaei, Mostafavi, y Honarmand, 2011), como en la determinación del status sanitario de un hato, lo que crea limitantes en la compra y venta de bovinos en el exterior y un retraso en el mejoramiento del ganado (Pineda y Romero, 2014).

Para su control, es necesaria la identificación y el descarte de animales seropositivos al virus ya que como muestra está que así lo han hecho 12 países de la Unión Europea que erradicaron la enfermedad mediante esta metodología (Florins, y otros, 2007).

En Ecuador no se han creado Programas Nacionales de Control de LB establecido por entidades reguladoras de enfermedades animales, como Agrocalidad (Agencia de Control y Regulación Fito y Zoosanitario) y el MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería) por lo que se desconoce el status sanitario del país frente a esta enfermedad (INEC, 2016).

Si bien las cifras por pérdidas económicas no han sido determinadas en Ecuador, se puede tener un acercamiento mediante datos de Estados Unidos donde la población bovina es de 93.6 millones de cabezas y en el que las pérdidas económicas se estiman desde \$86 millones de dólares anuales por diagnóstico y tratamientos de animales infectados (Mohammadabadi, Soflaei, Mostafavi, y Honarmand, 2011).

Se estima que en Estados Unidos existe una pérdida anual de \$525 millones de dólares del 89% de ganaderías lecheras por litro de leche que dejan de producir

los animales infectados (Kobayashi, Tsutsui, Yamamoto, Hayama, Kameyama, Konishi, y Murakami, 2010).

### **2.1.1 Agente etiológico**

La LB tiene como agente etiológico un virus ARN oncogénico de la familia Retroviridae que tiene la capacidad de infectar a animales de cualquier edad, incluyendo la fase embrionaria; las partículas del virus de la LB presentan un ARN monocatenario, una nucleoproteína p12, una glicoproteína transmembrana gp30, varias enzimas como la transcriptasa inversa, una proteína p24 que pertenece a la cápside y la glicoproteína gp51 de la envoltura, siendo éstas dos últimas las más detectadas por pruebas serológicas gracias a su aparición temprana (OIE, 2018).

Este virus tiene características linfotrópicas, siendo sus células diana los linfocitos, en especial los de la línea B, donde se aloja y donde los Ac no pueden neutralizarlo, por lo que el animal queda infectado toda su vida (Burny y Mammerickx, 1987).

Cualquier raza bovina es predisponente a la infección por LB, sin embargo, afecta principalmente a razas lecheras en los que se maneja un sistema intensivo (Giraud, y otros, 2010).

### **2.1.2 Signología clínica**

La mayoría de animales infectados por el virus de la LB son asintomáticos, sin embargo, del 30 al 70% presenta una linfocitosis persistente en edades de 3 años en adelante, lo que puede terminar en el desarrollo de un linfoma (Erskine, Byrem, Render, Febvay, y Houseman, 2012).

Otro grupo menor entre el 0.1 y 10% de animales infectados desarrolla linfosarcomas en varios órganos, muriendo de manera repentina después de la

manifestación clínica que dependerá de la zona en que se sitúe el tumor y el grado de afectación (Giraudo, y otros, 2010).

Autores han descrito una signología clínica caracterizada por disminución de la producción láctea, pérdida de peso, exoftalmo, anemia, decaimiento general, en ocasiones sintomatología nerviosa y con mayor frecuencia el agrandamiento bilateral de los nódulos linfáticos explorables bajo la piel o examen rectal (Baruta, Ardoino, Brandan, Sosa, Mariani, y Albretch, 2018).

### **2.1.3 Transmisión del virus**

El virus de la LB se transmite horizontal y verticalmente, siendo la primera la que predomina debido al traspaso de linfocitos infectados de animales positivos a negativos que se encuentran en sangre, secreciones nasales, saliva, calostro, leche y orina (Baruta, y otros, 2018).

La transmisión horizontal se da también por la ejecución inadecuada de prácticas de manejo en las que se usan materiales de manera repetida en los animales, como la inoculación de sangre mediante agujas e instrumentos quirúrgicos, y el uso de guantes rectales contaminados (Contreras, Cubillos, Ernst, y Saelzer, 1990).

La transmisión vertical sólo se da en la especie bovina, en búfalos y capibaras debido a la transferencia de células infectadas durante la gestación y el parto, mientras que especies como los ovinos pueden infectarse por inoculación (Sajiki, Konnai, Nishimori, Okagawa, Maekawa, Goto, Nagano, Kohara, Kitano, Takahashi, Tajima, Mekata, Horii, Murata, y Ohashi, 2017).

En regiones donde hay presencia de insectos hematófagos como las moscas o tábanos especialmente en épocas de verano, éstos se vuelven vectores en la transmisión mecánica del virus (Manet, Guilbert<sup>1</sup>, Roux, Vuillaume, y Parodi, 1989).

#### **2.1.4 Factores de riesgo**

Los factores de riesgo que predisponen la presentación de la enfermedad de LB se encuentran estrechamente relacionados con el hecho de que el virus se encuentra de por vida en los linfocitos de animales infectados, siendo uno de los principales problemas a nivel de hatos, la introducción de éstos a un hato limpio o libre de la enfermedad (OIE, 2018).

Los linfocitos se encuentran en secreciones biológicas como saliva, calostro, orina, semen, entre otras, las cuales al verse involucradas en el contacto de un animal sano con uno infectado por LB generan un factor de riesgo; sin embargo, la sangre es en donde se encuentra la mayor parte de linfocitos, de manera que una cantidad mínima de sangre como 0.1ml, es suficiente para transmitir la infección (Radostits, Blood, Clive, & Hinchcliff, 2002), por lo que el mayor riesgo de contagio se asocia a los factores que involucran el contacto con sangre y un riesgo menor se asocia al contacto con otro tipo de secreciones biológicas (Chamizo, 2005).

## **2.2 Técnicas de diagnóstico de la Leucosis Bovina**

### **2.2.1 Detección del agente viral**

El virus de la LB es detectado mediante cultivo in vitro del provirus integrado al ADN en células tumorales, en células mononucleares de sangre periférica o en la fracción celular de líquidos corporales como la leche, saliva y secreción nasal (OIE, 2018).

El aislamiento del virus mediante linfocitos de sangre periférica, la detección de ácidos nucleicos por PCR y la microscopía electrónica tienen la capacidad de realizar una detección temprana del antígeno (Ag) que a diferencia de las pruebas serológicas evitan los falsos positivos en animales menores de 6 meses debido al traspaso de Ac a través del calostro, y también tienen la ventaja de

detectar el Ag en animales inmunotolerantes (Fechner, Blankenstein, Cornelis, Elwert, Geue, Albrecht, Kurg, Beier, Marquard, y Ebner, 1997).

El PCR detecta el provirus de la LB, logrando codificar la glicoproteína gp51 que está presente en todos los animales infectados independientemente de la fase en que se encuentre la infección; además sirve para confirmar resultados que han demostrado positividad en pruebas serológicas (OIE, 2018)

### **2.2.2 Pruebas serológicas**

Las pruebas serológicas son capaces de detectar el Ac del virus de la LB tomando en cuenta que serán portadores del virus de por vida y por ende siempre mostrarán seropositividad (Chamizo, 2005).

Estas pruebas son incapaces de diferenciar los Ac maternos pasivos de una infección activa, que pueden estar presentes hasta los 6 a 7 meses de vida; además no detectan la infección en la fase temprana antes de la seroconversión, que puede tardar hasta la semana 14 posterior a la entrada del virus (Felmer, Zúñiga, y Recabal, 2006) (OIE, 2018).

Los primeros Ac que logran detectarse son los anti-p24 y anti-gp51, siendo este último el que más se detecta debido a su aparición temprana y a los métodos serológicos más frecuentemente utilizados que son el AGID y el ELISA que se realizan en el suero sanguíneo o muestras de leche de animales infectados, teniendo el ELISA una mayor sensibilidad que la prueba de AGID (Felmer, Zúñiga, y Recabal, 2006).

A diferencia de la p24, la gp51 evidencia la infección activa del virus de la LB en el tejido, puesto que se sintetiza durante la fase de encapsidación de su material genético, lo que sugiere que el virus se encuentra insertado en el genoma en forma de provirus y tiene la capacidad de producir proteínas estructurales como

se ha demostrado en un estudio acerca de la detección de este virus en el tejido mamario humano (Buehring, Shen, Jensen, y Choi, 2018).

Los animales que se encuentran en el periparto disminuyen la cantidad de Ac por el traspaso de estos al calostro, siendo en ocasiones indetectables para las pruebas serológicas, lo que indica que un animal en esta etapa, es decir, 2 a 6 semanas previo al parto o 1 a 2 semanas posterior al parto que resulta negativo a una prueba de AGID o ELISA, puede no ser un verdadero negativo, por lo que en ellos se debe repetir la prueba (OIE, 2018).

En la actualidad existen 2 tipos de ELISA, los no competitivos y los competitivos; dentro de los no competitivos están las técnicas directa, indirecta y sándwich, que contienen el Ag o Ac para formar inmunocomplejos en los cuales al agregar el conjugado, éste podrá reaccionar con el respectivo sustrato, generando así un color; por otro lado los ELISA de tipo competitivo, se basan en la detección de un Ag, en la que el Ac de la muestra compite con un conjugado por sitios de unión del Ag, por lo que en muestras positivas el color es ausente, ya que el sustrato no logrará hallar la enzima debido a que el conjugado se verá desplazado por el Ac contenido en la muestra (Flores y Jhenny, 2018).

### **2.2.3 Kit Id Screen® BLV Competition**

El Kit diagnóstico Id Screen® BLV competition pertenece al grupo de los ELISA competitivos capaz de detectar Ac anti-gp51, encontrándose aprobado por la OIE para el diagnóstico de la LB y que es especialmente útil para muestras con títulos de Ac bajos (OIE, 2018).

Esta kit posee placas con pocillos que se encuentran sensibilizados con la glicoproteína gp51 de la envoltura del virus de la LB, en las cuales se dará una reacción de complejo Ag-Ac en caso de haber Ac contra la LB (IDVET, 2018).

Esta prueba contiene además un conjugado contra la gp51 que está marcado a la peroxidasa (HRP) que se distribuye en los pocillos y se une a los epítomos libres del virus generando un complejo Ag-conjugado-HRP en la que mediante los lavados se eliminará el exceso de conjugado y la reacción se verá expuesta a través de una sustancia reveladora; la sensibilidad de esta prueba es del 99% mientras que su especificidad es del 98% (IDVET, 2018).

### III. Materiales y Métodos

#### 3.1 Ubicación

El presente estudio tuvo lugar en el hato lechero “La Convalecencia” que se muestra en la Figura 1, ubicado en la Parroquia Santa Martha de Cuba del cantón Tulcán en la provincia de Carchi en Ecuador. El predio cuenta con una temperatura que va desde los 3°C a los 22°C, una humedad del 70% y una altitud entre los 2956 m.s.n.m. y 3400 m.s.n.m. con precipitaciones de 37 a 120mm, existiendo una diferencia de 83 mm entre los meses más secos y los más húmedos (CLIMATE-DATA, 2018).



*Figura 1.* Mapa del hato lechero “La Convalecencia”, Vista Satélite. Tomado de (Google, s.f.).

El predio se encuentra en el kilómetro 35 de la carretera Panamericana E35 del cantón Tulcán y cuenta con una superficie total de 50.64 hectáreas destinadas en su totalidad a la producción de pasto que sirve de alimento para los bovinos.

Las coordenadas UTM del predio son las que se observan en la Tabla 1.

Tabla 1

*Coordenadas UTM del predio “La Convalecencia” de la provincia de Carchi.*

<b>Vértice</b>	<b>Este</b>	<b>Norte</b>
1	X: 192 380.2735	Y: 68 892.687
2	X: 192 690.1348	Y: 68 857.9909
3	X: 192 683.8400	Y: 68 719.8420
4	X: 192 759.3065	Y: 68 637.1765
5	X: 192 930.9880	Y: 68 569.8381
6	X: 192 770.8703	Y: 68 362.4347
7	X: 192 800.1387	Y: 68 146.7176
8	X: 192 716.7345	Y: 68 081.5252
9	X: 192 723.2175	Y: 68 914.2724
10	X: 192 525.4151	Y: 68 951.4859
11	X: 192 365.2527	Y: 68 998.5828
12	X: 192 322.2134	Y: 68 082.7565
13	X: 192 221.3666	Y: 68 060.6923
14	X: 192 133.6477	Y: 68 282.0788
15	X: 192 150.0559	Y: 68 509.6664
16	X: 192 257.0987	Y: 68 706.4333
17	X: 192 271.0188	Y: 68 777.1930

### 3.2 Población y muestra

La población total del hato “La Convalecencia” es de 179 animales de especie bovina que se encuentran distribuidos en distintas categorías como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

*Distribución por categoría de los animales del predio “La Convalecencia”.*

<b>Categoría</b>	<b>No. De animales</b>
Vacas Ordeño	83
Vacas Seco	20
Vaonas	30
Fierros	26
Ternereras	19
Toros	1
<b>TOTAL</b>	<b>179</b>

La muestra utilizada fue el total de los animales del predio con el fin de obtener una seroprevalencia real. Para su obtención no se realizó cálculo alguno, aplicándose únicamente los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

- **Criterios de Inclusión**

- Animales de especie bovina de producción lechera, de cualquier edad y categoría que pertenezcan al predio “La Convalecencia”.

- **Criterios de Exclusión**

- Animales de especie bovina ajenos al predio “La Convalecencia”.

### **3.3 Información del paciente**

El estudio se trabajó bajo el esquema de un estudio observacional, en el que el paciente fue el hato ganadero, es decir, que aunque se haya examinado individualmente a los animales, la información del paciente se trabajó de manera grupal ya que todos se encuentran bajo un mismo manejo.

En el predio predomina la raza Holstein con 132 animales, luego la raza Pizán con 39 y 8 de raza Normando lechero; los animales proceden de la misma hacienda ya que se maneja un sistema cerrado desde el año 2005 y se

encuentran distribuidos en 5 categorías que son vacas, vaconas, fierros, terneras y toros como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

*Categorización de animales del predio “La Convalecencia”.*

<b>Categoría</b>	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>
Vacas	24 meses en adelante con más de 1 parto	Hembra
Vaconas	10 meses en adelante	Hembra
Fierros	4 – 10 meses	Hembra
Terneras	0 – 4 meses	Hembra
Toros	10 meses en adelante	Macho

Los bovinos del predio se encuentran criados exclusivamente para la producción lechera bajo un sistema de pastoreo intensivo con una carga animal de 3 Unidades Bovinas Adultas (UBA) por hectárea.

La alimentación se maneja con pastos anuales (mezcla de pasto azul 70%, llantén forrajero 15% y trébol rojo 15%) y en las vacas del ordeño se combina con balanceado Súper Lechero de la marca Finca, del que se provee 1.5 kg por animal en cada ordeño, es decir 3kg al día por animal; el acceso al agua es a voluntad y proviene de una vertiente natural ubicada en la hacienda.

El sistema de ordeño es mecánico, contando con una sala tipo espina de pescado de 2 filas con capacidad para 8 animales cada una; la producción diaria de leche está alrededor de 1500 litros diarios que son vendidos a la empresa lechera “González”.

El sistema de reproducción es en base a Inseminación Artificial (IA) y monta natural cuando las vacas no logran quedar preñadas artificialmente. En cuanto a problemas reproductivos se han presentado el 1% de casos de abortos anuales

y retenciones placentarias por lo que se cuenta con chequeos ginecológicos trimestrales con el médico veterinario de planta.

En base a la anamnesis, el hato está regido a un control de vacunación y desparasitación descrito en la Tabla 4. En el año 2014 se obtuvo el certificado de libre de Brucelosis.

*Tabla 4*

Esquema Sanitario del predio “La Convalecencia”.

<b>Actividad</b>	<b>Producto</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Dosificación</b>	<b>Administración</b>
Fiebre Aftosa	Vacuna AFTOGÁN® (A24 Cruzeiro, O1 Campos)	Cada 6 meses	2ml	Intramuscular o Subcutánea
Brucelosis	Vacuna (C19)	Una vez en la vida (4 meses de edad)	5ml	Subcutánea
Control parásitos internos	Fenbendazol	Cada 3 meses	5ml/100kg	Oral
Vitaminas	AD3E	Cada 3 meses	Terneros: 0.5-2ml Adultos: 3-5ml	Intramuscular
Sales minerales	Somex	Diario	100-200 gr	Oral

En cuanto a enfermedades, los animales han presentado problemas de mastitis diagnosticados a tiempo debido a chequeos mensuales con la prueba de Californian Mastitis Test (CMT); además se han presentado casos de panadizo, tumores oculares y mal de altura.

En el pasado nunca se realizó una intervención diagnóstica con el fin de determinar si hay o no casos de LB en el hato, por lo que no se ha podido determinar el status sanitario frente a esta enfermedad.

### 3.4 Materiales

Los materiales utilizados fueron divididos por cada una de las actividades: examen físico, toma de muestras sanguíneas, procesamiento de muestras en laboratorio e identificación de factores predisponentes.

#### 3.4.1 Examen físico

En el examen físico se utilizaron los materiales detallados en la Tabla 5.

Tabla 5

*Materiales para el examen físico*

MATERIAL	CANTIDAD
Overol	1 unidad
Botas de caucho	1 par
Ficha clínica	179 unidades
Guantes de latex	1 caja de 100 unidades
Termómetro	1 unidad
Fonendoscopio	1 unidad
Papel desechable	1 caja de 100 unidades
Esferográfico azul	1 unidad
Manga para 10 animales	1 unidad
Cuerda de 5 m	2 unidades
Cuaderno	1 unidad

#### 3.4.2 Toma de muestras sanguíneas

En la toma de muestras sanguíneas se utilizaron los materiales detallados en la Tabla 6.

Tabla 6

*Materiales para la toma de muestras sanguíneas*

MATERIAL	CANTIDAD
Overol	1 unidad
Botas de caucho	1 par
Torundas con alcohol	200 unidades
Guantes de latex	1 caja de 100 unidades
Aguja vacutainer de caliber 21G x 1 y ½"	200 unidades
Tubo de tapa roja sin anticoagulante 10ml	200 unidades
Jeringa de 10ml	10 unidades
Jeringa de 5ml	30 unidades
Papel desechable	100 unidades
Cuerda de 5 m	2 unidades
Cooler capacidad 50 litros	1 unidad
Centrifugadora capacidad 6 tubos a 4000 revoluciones	1 unidad
Marcador permanente negro	1 unidad
Cuaderno	1 unidad
Contenedor de desechos cortopunzantes	1 unidad
Tubos eppendorf 2ml	200 unidades
Gradilla para tubos eppendorf	2 unidades
Bolsa roja para desechos	2 unidades
Capuchones	5 unidades
Pipetas desechables	200 unidades
Esferográfico azul	1 unidad
Gel refrigerante	8 unidades

### 3.4.3 Procesamiento de muestras en laboratorio

En el procesamiento de muestras se utilizaron los materiales detallados en la Tabla 7.

Tabla 7

*Materiales para el procesamiento de muestras en laboratorio*

MATERIAL	CANTIDAD
Mandil	1 unidad
Guantes de látex	1 par
Kit Id Screen® BLV Competition	1 unidad
Lector de microplacas de ELISA SEAC	1 unidad
Sirio S Nadim® (96 pocillos)	
Micropipeta monocanal 10ul	1 unidad
Micropipeta monocanal 100ul	1 unidad
Micropipeta monocanal 1000ul	1 unidad
Vaso de precipitación 250ml	1 unidad
Vaso de precipitación 50ml	1 unidad
Probeta volumétrica 100ml	1 unidad
Contenedor de desechos cortopunzantes	1 unidad
Puntas de micropipeta 1000ul	10 unidades
Puntas de micropipeta 100ul	400 unidades
Cuaderno	1 unidad
Esferográfico azul	1 unidad

El kit Id Screen® BLV competition incluye los siguientes reactivos:

- Microplacas fijadas con el antígeno de la LB
- Control positivo
- Control negativo
- Conjugado concentrado
- Diluyente 2

- Solución de lavado concentrada
- Solución de revelación
- Solución de parada

#### 3.4.4 Identificación de factores predisponentes

En la identificación de factores predisponentes a la LB se utilizaron los materiales detallados en la Tabla 8.

Tabla 8

*Materiales para la identificación de factores predisponentes*

MATERIAL	CANTIDAD
Check list	2 unidades
Esferográfico azul	1 unidad
Carpeta minipclip pinza	1 unidad

### 3.5 Metodología

La metodología utilizada en el estudio se basó en 4 fases: examen físico, toma de muestras sanguíneas, procesamiento de muestras en laboratorio e identificación de factores predisponentes. Para esto se tomaron en cuenta las variables mencionadas en el Anexo 1.

En el examen físico se midieron las constantes fisiológicas a todos los animales del hato, la toma de muestras sanguíneas se realizó por medio de la vena coxígea para luego centrifugarlas y obtener el suero de éstas, en el procesamiento de muestras en laboratorio se aplicó el kit Id Screen® BLV competition con los sueros sanguíneos para conocer la presencia o ausencia de Ac contra la LB y por último se realizó una encuesta tipo check list al trabajador del predio para identificar factores que predispongan la presentación de LB en el hato.

### **3.5.1 Examen físico**

El examen físico se lo realizó en todos los animales del hato mediante el uso de fichas clínicas (Anexo 2) en las que se anotaron el número de arete, la categoría y las constantes fisiológicas de cada animal, entre ellas frecuencia cardiaca (Fc), frecuencia respiratoria (Fr), temperatura ( $T^{\circ}$ ), movimientos ruminales (Mr), tiempo de llenado capilar (Tllc), color de mucosas, revisión de linfonodos palpables bajo la piel y anotación de anormalidades encontradas.

Para facilitar esta actividad se realizó restricción física de los animales; en las categorías de fierros, vaconas y vacas del seco se utilizó una manga con capacidad para 10 animales, en las vacas del ordeño se utilizaron las mangas de la sala de ordeño y en las terneras y el toro se utilizaron cuerdas ya que se encontraban en zonas libres del hato.

A todos los animales se les realizó el examen físico durante dos días y dos semanas antes de la toma de muestras sanguíneas.

### **3.5.2 Toma de muestras sanguíneas**

La toma de muestras sanguíneas se realizó dos semanas después de haber realizado el examen físico.

Para el muestreo primero se realizó la restricción física de los animales mediante el uso de mangas y cuerdas, y una vez inmovilizados se procedió a obtener las muestras sanguíneas de la vena coxígea usando el sistema de vacío mediante agujas vacutainer y tubos de recolección de sangre de tapa roja sin anticoagulante (Anexo 3).

Posterior a la recolección de las muestras sanguíneas, éstas fueron centrifugadas a 4000 revoluciones/minuto por 15 minutos con el fin de obtener un suero limpio y sin residuos de eritrocitos.

Finalmente, el suero fue recolectado en tubos eppendorf de 2ml y se transportó al laboratorio en coolers con geles refrigerantes, manteniéndolos en refrigeración a 2°C con el fin de que mantengan su integridad hasta ser analizadas.

### **3.5.3 Procesamiento de muestras en laboratorio**

El procesamiento de las muestras en laboratorio se lo realizó con el kit Id Screen® BLV competition, los sueros sanguíneos de cada animal y un lector de microplacas de ELISA con filtro de 450nm, tal y como se muestra en el Anexo 4.

Para agilizar el proceso primero se preparó la solución de lavado y el conjugado, y una vez preparadas se procedió a colocar 80ul del Diluyente 2 en cada pocillo.

Una vez colocado el Diluyente 2 en cada pocillo se pasó a colocar 20ul de los controles positivos y negativos en los 4 primeros pocillos por separado, de manera que quedaran 2 controles positivos en el A1 y B1 y 2 controles negativos en C1 y D1, mientras que en el resto de pocillos se colocó 20ul de cada muestra de suero sanguíneo y se incubó por 45 minutos; una vez pasado este tiempo se vaciaron los pocillos y se lavaron 3 veces con 300ul de la solución de lavado.

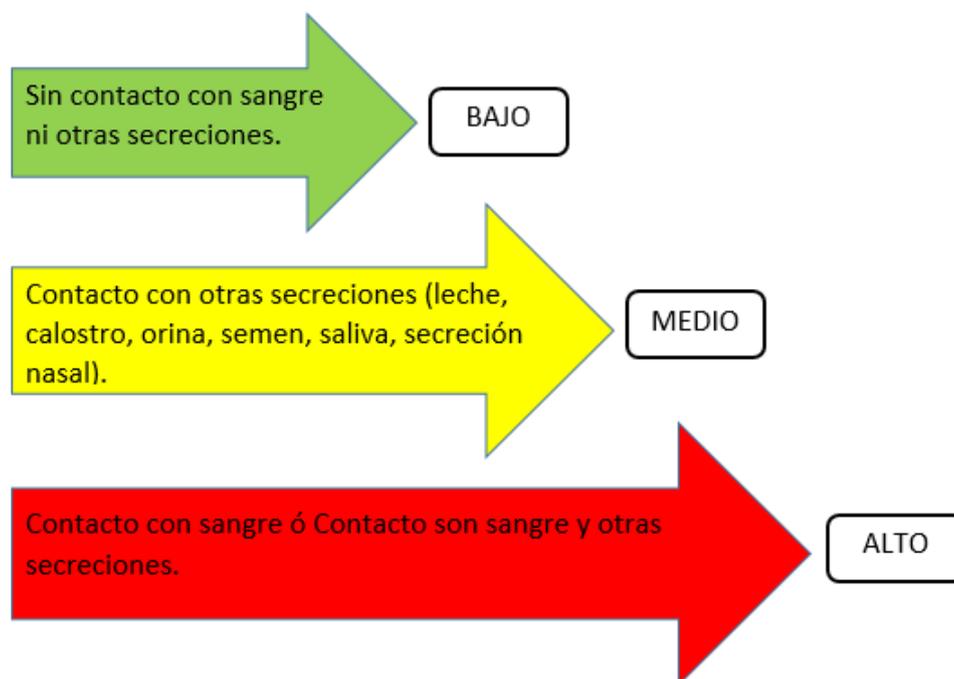
Posterior al lavado se añadió 100ul de la solución del conjugado a cada pocillo y se incubó por 30 minutos para después vaciarlos y volver a lavarlos 3 veces con 300ul de lavado.

Luego se añadió 100ul de la solución de revelación a cada pocillo y se incubó a 15 minutos en la oscuridad para luego colocar 100ul de la solución de parada a cada pocillo y detener la reacción.

Por último, las placas fueron leídas por un lector de placas de ELISA con filtro de 450nm, el cual arrojó resultados de la densidad óptica de cada uno de los pocillos que ayudaron a interpretar los resultados de cada una de las muestras.

### 3.5.4 Identificación de factores predisponentes

La identificación de los factores predisponentes se realizó mediante una encuesta tipo check list (Anexo 5) en la que se formularon preguntas al trabajador del hato en base a información tomada acerca de los factores de riesgo que predisponen a la infección por LB descritos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE); según esta información también se los dividió en 3 categorías según su nivel de riesgo, siendo estos: alto, medio y bajo, como se muestra en la Figura 2.



*Figura 2.* Categorización de los factores por nivel de riesgo: alto, medio y bajo.

En la Tabla 9 se puede ver qué factores se utilizaron en la encuesta y en qué nivel de riesgo se encuentra cada uno.

Tabla 9

*Niveles de riesgo con sus respectivos factores predisponentes.*

<b>ALTO</b>	<b>MEDIO</b>	<b>BAJO</b>
Falta de desinfección de material quirúrgico, descorne y chequeo ginecológico.	Carga animal alta	Desconocimiento de la enfermedad.
Utilización de una aguja en varios animales. Utilización de un guante rectal en varios animales.	Provisión de calostro no pasteurizado Monta natural	Desconocimiento de la transmisión de la enfermedad. Ingreso de animales nuevos al predio sin certificación libre de LB
Presencia de insectos hematófagos o murciélagos.	Pajuelas sin certificación libre de LB	Falta de Diagnóstico de LB en animales del predio.
Falta de control de insectos hematófagos o murciélagos.	Contenedores de agua y alimento compartidos	-

### 3.6 Análisis estadístico

En el estudio se utilizó un análisis estadístico de tipo univariado que sirve para describir las características de una variable a la vez (Del Carpio, 2018); para lo que se utilizaron las ecuaciones de la Prevalencia Real y Prevalencia Aparente.

La Prevalencia Aparente se calculó en función del número de casos positivos a la prueba de ELISA competitivo realizada (numerador) y del tamaño de la población total del hato “La Convalecencia” (denominador).

La Prevalencia Real se calculó en función de la Sensibilidad y Especificidad que poseía el kit de ELISA competitivo, que en este caso eran del 99% y 98% respectivamente.

Las ecuaciones utilizadas para cada prevalencia son las descritas a continuación:

$$\textit{Prevalencia Aparente} = \frac{\textit{Número de animales positivos}}{\textit{Número del total de la población}}$$

*Ecuación 1. Prevalencia Aparente (Acuña, 2017).*

$$\textit{Prevalencia Real} = \frac{\textit{Prevalencia aparente} + (\textit{Especificidad} - 1)}{\textit{Sensibilidad} + (\textit{Especificidad} - 1)}$$

*Ecuación 2. Prevalencia Real (Acuña, 2017).*

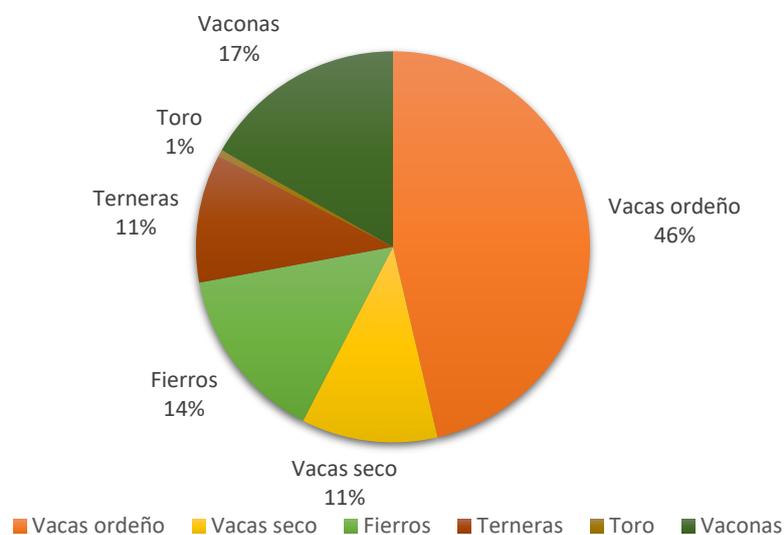
## IV. Resultados y Discusión

### 4.1 Resultados

#### 4.1.1 Hallazgos Clínicos

##### Examen Físico

Los 179 animales del hato “La Convalecencia” se encontraban distribuidos en categorías según su edad y sexo como se muestra en la Figura 3, contando con el 46.38% (83) en la categoría de vacas de ordeño, el 11.17% (20) en la categoría de vacas del seco, el 16.7% (30) en la categoría de vaconas, el 14.5% (26) en la categoría fierros, el 10.6% (19) en la categoría Terneras y el 0.55% (1) en la categoría de Toros.



*Figura 3.* Distribución por categorías de los animales del hato “La Convalecencia”.

Los resultados del examen físico son los que se muestran en la Tabla 10, según cada constante fisiológica medida y el número de animales que presentó frecuencias normales y fuera de rango.

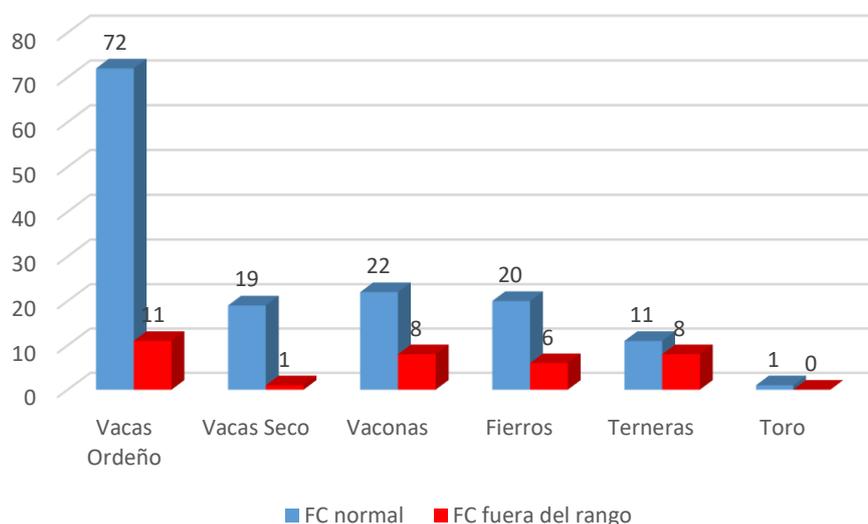
Tabla 10

*Número de animales que presentaron frecuencias normales y fuera de rango en el examen físico.*

	Fc	Fr	T°	Mr	Tllc	Color de mucosas	Linfonodos reactivos
Normal	145	130	161	179	179	179	176
Fuera del Rango	34	49	18	0	0	0	3
Total	179	179	179	179	179	179	179

Nota. Fc = Frecuencia Cardíaca; Fr = Frecuencia respiratoria; Mr = Movimientos ruminales; Tllc = Tiempo de llenado capilar.

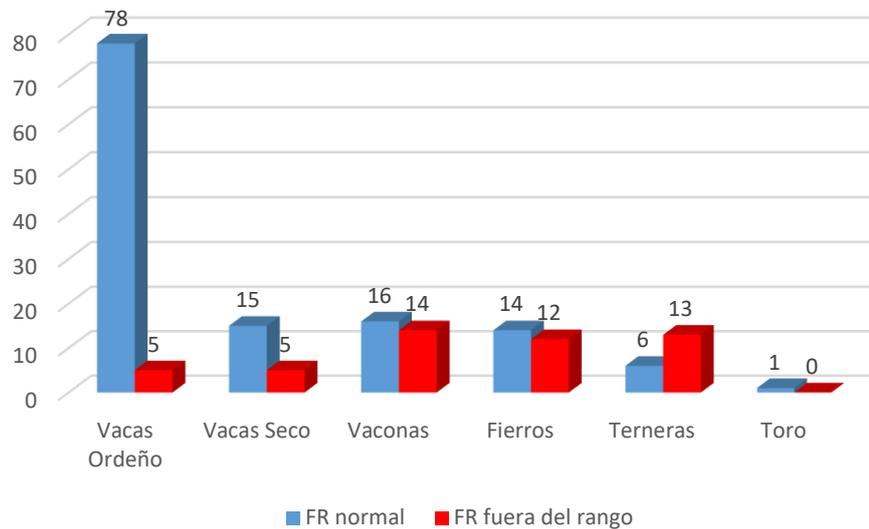
En la Figura 4 se muestra que el 81% (145 animales) del total de animales, presentó una frecuencia cardíaca dentro del rango normal, mientras que el 19% (34 animales) se encontró fuera del rango.



*Figura 4.* Número de animales por categoría que presentaron frecuencias cardíacas normales y fuera de rango.

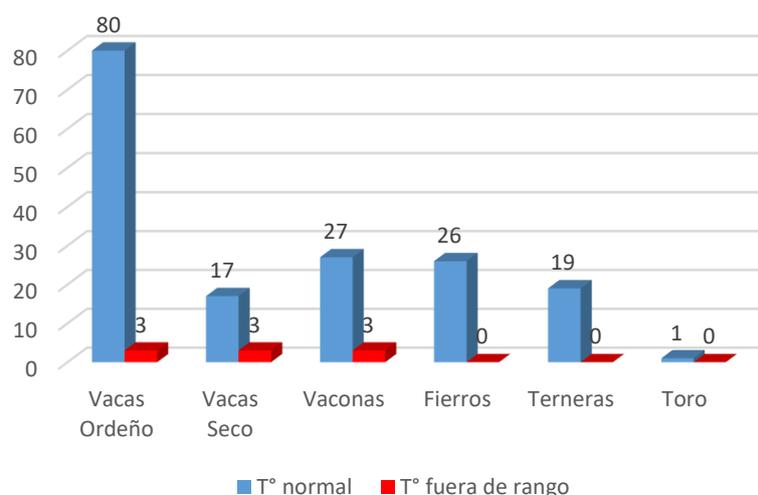
En la Figura 5 se puede observar que el 72.6% (130 animales) del total, presentó una frecuencia respiratoria normal, mientras que el 27.4% (49 animales) se

encontró fuera del rango; en la categoría de terneras el porcentaje que estuvo fuera del rango fue del 68.5% (13 animales), en este caso mayor al porcentaje de las que estuvieron dentro del rango normal que fue del 31.5% (6 animales).



*Figura 5.* Número de animales por categoría que presentaron frecuencias respiratorias normales y fuera de rango.

En la Figura 6 se muestra que del total de animales, el 95% (170 animales) presentó una temperatura dentro del rango normal y el 5% (9 animales) una temperatura fuera del rango.

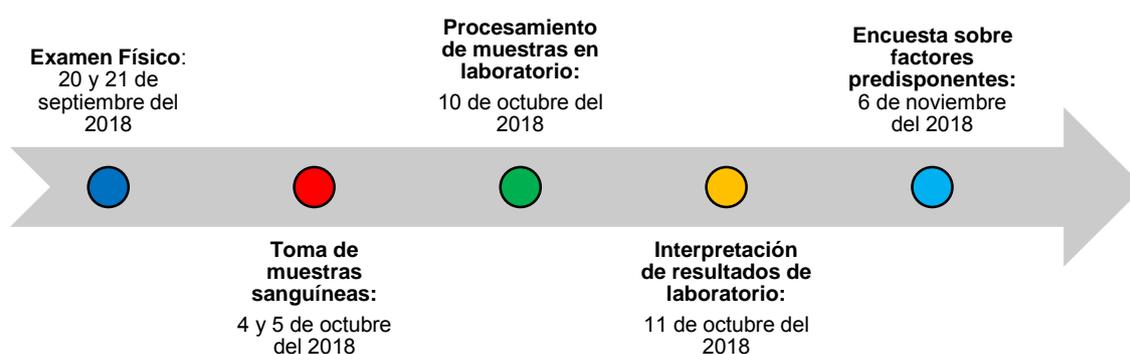


*Figura 6.* Número de animales por categoría que presentaron temperaturas normales y fuera de rango.

En lo que se refiere a las constantes fisiológicas de Mr, Tllc y color de mucosas, todos los animales se encontraron dentro del rango normal, y en cuanto a la revisión de linfonodos, 3 animales presentaron en común la reacción de los linfonodos precurales izquierdos, correspondiendo 2 animales a la categoría de fierros y 1 a la categoría de terneras.

#### 4.1.2 Línea de tiempo

La línea de tiempo del estudio se basó en 5 etapas, tal y como se muestra en la Figura 7, con el fin de cumplir con todos los objetivos del estudio.



*Figura 7.* Línea de tiempo del estudio.

Las actividades realizadas por cada fase, fueron:

- Examen Físico: medición de constantes fisiológicas.
- Toma de muestras sanguíneas: recolección de sangre a través de la vena coxígea para obtención del suero.
- Procesamiento de muestras en laboratorio e Interpretación de resultados: se aplicó el kit Id Screen® BLV competition para identificar animales positivos a LB en el hato.
- Identificación de factores predisponentes: se realizó una encuesta tipo check list al trabajador del predio.

### 4.1.3 Evaluación diagnóstica

#### a. Métodos de diagnóstico

Los métodos de diagnóstico aplicados en este estudio fueron: prueba de laboratorio con el Kit ID Screen® BLV competition y una encuesta tipo check list para identificar los factores de riesgo que predisponen la presentación de la enfermedad de la LB.

#### - Prueba de laboratorio: Kit ID Screen® BLV competition

La aplicación del Kit de ELISA competitivo se la realizó con 2 placas debido al número de animales y en lo que concierne a coloración se obtuvo los resultados que se muestran en la Figura 8 y Figura 9, sugiriendo que los pocillos de color amarillo son negativos y los que no presentan color, son positivos.

A	C+	107	117	125	133	141	149	157	165	173	181	189	
B	C+	109	118	126	134	142	150	158	166	174	182	190	
C	C-	110	119	127	135	143	151	159	167	175	183	191	
D	C-	111	120	128	136	144	152	160	168	176	184	192	
E		102	112	121	129	137	145	153	161	169	177	185	193
F		104	114	122	130	138	146	154	162	170	178	186	103
G		105	115	123	131	139	147	155	163	171	179	187	
H		106	116	124	132	140	148	156	164	172	180	188	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Figura 8. Coloración de pocillos de la placa 1.

<b>A</b>	C+	5	16	28	36	44	52	60	69	77	87	96	
<b>B</b>	C+	6	17	29	37	45	53	61	70	78	89	97	
<b>C</b>	C-	7	19	30	38	46	54	62	71	79	90	98	
<b>D</b>	C-	9	22	31	39	47	55	63	72	81	91	99	
<b>E</b>	1	10	24	32	40	48	56	64	73	82	92	100	
<b>F</b>	2	12	25	33	41	49	57	65	74	83	93		
<b>G</b>	3	13	26	34	42	50	58	67	75	84	94		
<b>H</b>	4	15	27	35	43	51	59	68	76	85	95		
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>

Figura 9. Coloración de pocillos de la placa 2.

La lectura de las placas del kit se realizó mediante un lector de ELISA con densidad óptica de 450nm, la cual arrojó los resultados que se muestran en la Figura 10 y Figura 11; los pocillos A1 y B1 representan los controles positivos y los pocillos C1 y D1 los controles negativos, esto en ambas placas.

<b>A</b>	0,068	0,984	0,099	0,984	0,977	0,949	0,977	1,001	0,977	0,961	1,016	0,957	
<b>B</b>	0,071	0,934	0,859	0,934	0,934	0,086	0,887	0,887	0,887	0,115	0,961	1,008	
<b>C</b>	0,984	0,961	0,887	0,844	0,099	0,102	0,992	0,910	0,914	0,091	0,859	0,934	
<b>D</b>	0,883	0,957	0,887	0,984	0,902	0,071	0,088	0,941	0,875	0,910	0,167	1,016	
<b>E</b>	0,887	0,930	0,852	0,115	0,895	0,809	0,867	0,895	0,883	0,875	0,895	0,977	
<b>F</b>	0,930	0,930	0,883	0,809	0,949	0,910	0,895	0,914	0,941	0,875	0,934		
<b>G</b>	0,875	0,699	0,856	0,856	0,969	0,883	0,856	0,063	0,848	0,887	0,977		
<b>H</b>	0,914	0,969	0,977	0,934	1,016	0,941	0,934	0,875	0,969	0,813	1,024		
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>

Nota. Celdas A1 y B1= Controles positivos; Celdas C1 y D1= Controles negativos.

Figura 10. Lectura de los pocillos de la placa 1 en el lector de ELISA.

A	0,112	0,922	0,941	0,969	0,910	0,867	0,852	0,738	0,930	0,883	0,068	0,949
B	0,125	0,816	0,895	0,910	0,883	0,813	0,910	0,902	0,914	0,867	0,820	0,941
C	0,652	0,060	0,844	0,895	0,065	0,816	0,883	0,852	0,086	0,071	0,867	0,801
D	0,887	0,859	0,844	0,856	0,887	0,848	0,867	0,910	0,902	0,887	0,941	1,141
E	0,941	0,809	0,856	0,867	0,742	0,801	0,083	0,887	0,941	0,895	0,088	0,099
F	0,867	0,859	0,539	0,852	0,867	0,875	0,793	0,902	0,875	0,068	0,914	
G	0,883	0,051	0,824	0,875	0,856	0,863	0,895	0,844	0,902	0,902	0,065	
H	0,957	0,941	0,063	0,520	0,867	0,699	0,969	0,957	0,977	0,902	0,934	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Nota. Celdas A1 y B1= Controles positivos; Celdas C1 y D1= Controles negativos.

Figura 11. Lectura de los pocillos de la placa 2 en el lector de ELISA.

Posterior a la lectura de las placas 1 y 2 se procedió a realizar la validación de los controles positivos y negativos como se muestra en la Tabla 11 y Tabla 12.

Validación Control Negativo: La densidad óptica media del control negativo es superior a 0.7.

$$DO_{CN} > 0.7$$

Ecuación 3. Validación del control negativo (IDVET, 2018).

Tabla 11

Validación de los controles negativos de la Placa 1 y Placa 2.

Placa 1		Placa 2	
Valor Control	0.984	Valor Control	0.652
Negativo C1		Negativo C1	
Valor Control	0.883	Valor Control	0.887
Negativo D1		Negativo D1	
Media	0.933	Media ( $DO_{CN}$ )	0.769
( $DO_{CN}$ )	0.993 > 0.7		0.769 > 0.7

Validación Control Positivo: El valor medio de la densidad óptica de los controles positivos es inferior a 30% de la  $DO_{CN}$ :

$$\frac{DO_{CP}}{DO_{CN}} < 0.3$$

Ecuación 4. Validación del control positivo (IDVET, 2018).

Tabla 12

*Validación de los controles positivos de la Placa 1 y Placa 2.*

<b>Placa 1</b>		<b>Placa 2</b>	
Valor Control	0.068	Valor Control	0.112
Positivo A1		Positivo A1	
Valor Control	0.071	Valor Control	0.125
Positivo B1		Positivo B1	
Media	0.139	Media	0.118
$\frac{DO_{CP}}{DO_{CN}} < 0.3$	$0.139 < 0.3$	$\frac{DO_{CP}}{DO_{CN}} < 0.3$	$0.118 < 0.3$

Con la validación de los controles realizada, se procedió a realizar la interpretación de los resultados calculando el porcentaje de competición para cada muestra con la siguiente fórmula:

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

Ecuación 5. Interpretación de resultados (IDVET, 2018)

Las muestras que presentaron un S/N%:

- $\leq 50\%$  son consideradas positivas
- $50\% < S/N < 60\%$  son consideradas dudosas
- $\geq 60\%$  son consideradas negativas

Los resultados de la interpretación fueron los que se muestran en la Figura 12 y Figura 13, demostrando que del total de animales, el 13% (23 animales)

presentaron un porcentaje de competición menor al 50%, lo que quiere decir que presentaron Ac anti-gp51.

<b>A</b>	<b>DO<sub>CP</sub></b>	105.4%	10.6%	105.4%	104.4%	101.6%	104.6%	107.2%	104.7%	102.9%	108.8%	102.5%	
<b>B</b>	<b>0.070</b>	100%	92%	100%	100%	92%	95%	95%	95%	95%	12.3%	107.9%	
<b>C</b>	<b>DO<sub>CN</sub></b>	102.9%	95%	90.4%	10.6%	10.9%	106.2%	97.4%	97.9%	9.7%	92%	100%	
<b>D</b>	<b>0.934</b>	102.5%	95%	105.4%	96.6%	7.6%	9.4%	100.8%	93.7%	97.4%	17.8%	108.8%	
<b>E</b>	95%	99.6%	91.2%	12.3%	95.8%	86.6%	92.8%	95.8%	94.5%	93.7%	95.8%	104.6%	
<b>F</b>	99.6%	99.6%	94.5%	86.6%	101.6%	97.4%	95.8%	97.9%	100.8%	93.7%	100%		
<b>G</b>	93.7%	74.8%	91.6%	91.6%	103.8%	94.5%	91.6%	6.7%	90.8%	95%	104.6%		
<b>H</b>	97.9%	103.8%	104.6%	100%	108.8%	100.8%	100%	93.7%	103.8%	87%	109.6%		
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>

Nota. Celdas A1 y B1= Controles positivos; Celdas C1 y D1= Controles negativos.

Figura 12. Interpretación de resultados de la Placa 1.

<b>A</b>	<b>DO<sub>CP</sub></b>	119.8%	122.2%	125.9%	118.2%	112.6%	110.7%	95.9%	120.8%	114.7%	8.8%	123.3%	
<b>B</b>	<b>0,119</b>	106%	116.3%	118.2%	114.7%	105.6%	118.2%	117.2%	118.7%	112.6%	106.5%	122.2%	
<b>C</b>	<b>DO<sub>CN</sub></b>	7.8%	109.6%	116.3%	8.4%	106%	114.7%	110.7%	11.1%	9.2%	112.6%	104%	
<b>D</b>	<b>0,770</b>	111.6%	109.6%	111.2%	115.2%	110.2%	112.6%	118.2%	117.2%	115.2%	122.2%	148.2%	
<b>E</b>	122.2%	105.1%	111.2%	112.6%	96.4%	104%	10.7%	115.2%	122.2%	116.3%	11.4%	12.8%	
<b>F</b>	112.6%	111.6%	70%	110.7%	112.6%	113.7%	103%	117.2%	113.7%	8.8%	118.7%		
<b>G</b>	114.7%	6.6%	107%	113.7%	111.2%	112.1%	116.3%	109.6%	117.2%	117.2%	8.4%		
<b>H</b>	124.3%	122.2%	8.1%	67.5%	112.6%	90.8%	125.9%	124.3%	126.9%	117.2%	121.3%		
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>

Nota. Celdas A1 y B1= Controles positivos; Celdas C1 y D1= Controles negativos.

Figura 13. Interpretación de resultados de la Placa 2.

Estos resultados demuestran que en todas las categorías a excepción del toro contienen animales positivos a LB, tal y como se muestra en la Figura 14.

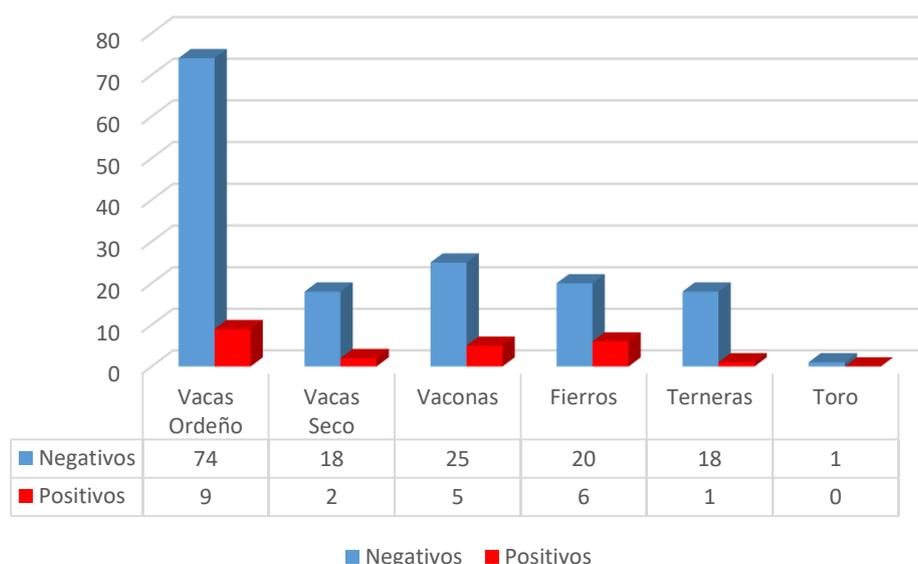


Figura 14. Número de animales por categoría del hato “La Convalecencia” que resultaron negativos y positivos a LB.

- **Cálculo de la seroprevalencia:**

Para el cálculo de las seroprevalencias se utilizaron los datos obtenidos con la prueba de laboratorio y las ecuaciones de la Prevalencia Real y Prevalencia Aparente:

Datos:

- Número de animales positivos: 23
- Número total de la población: 179
- Sensibilidad del kit de ELISA: 99% (0.99)
- Especificidad del kit de ELISA: 98% (0.98)

Prevalencia Aparente:

$$\text{Prevalencia Aparente de LB} = \frac{\text{Número de animales positivos}}{\text{Número del total de la población}} \times 100$$

$$\text{Prevalencia Aparente de LB} = 0.1284 \times 100$$

$$\text{Prevalencia Aparente de LB} = 12.8 \%$$

Prevalencia Real:

$$Prevalencia\ Real\ de\ LB = \frac{Prevalencia\ aparente + (Especificidad - 1)}{Sensibilidad + (Especificidad - 1)} \times 100$$

$$Prevalencia\ Real\ de\ LB = 0.147 \times 100$$

$$Prevalencia\ Real\ de\ LB = 14.7\ \%$$

- **Encuesta tipo check list para identificar factores que predisponen a la presentación de LB.**

La encuesta fue realizada al trabajador del predio puesto que es la persona que más conoce acerca del manejo de los animales, obteniendo los resultados que se muestran en la Figura 15, en la que se indica que del 100% (14) de los factores que predisponen la enfermedad de LB detallados en el check list, el 78.5% (11) están presentes y el 21.5% (3) ausentes.

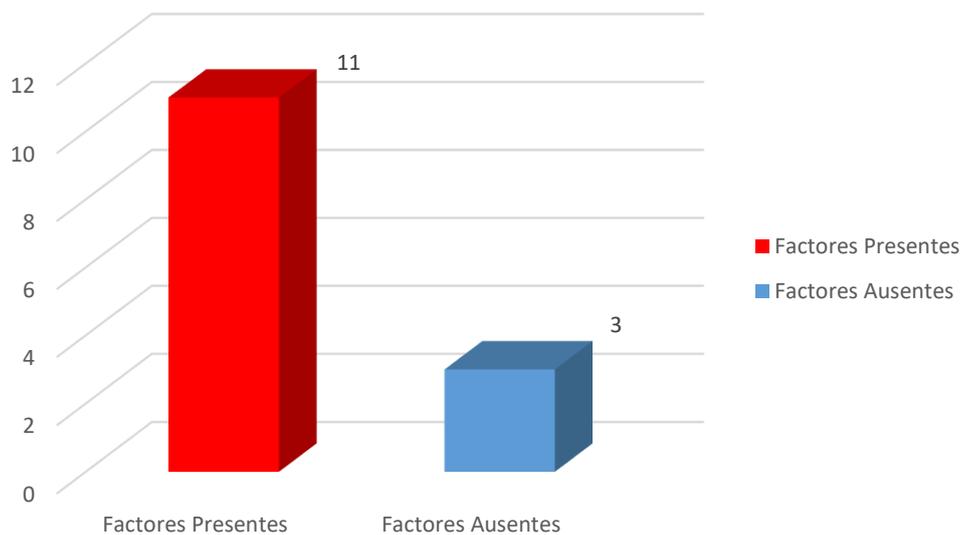
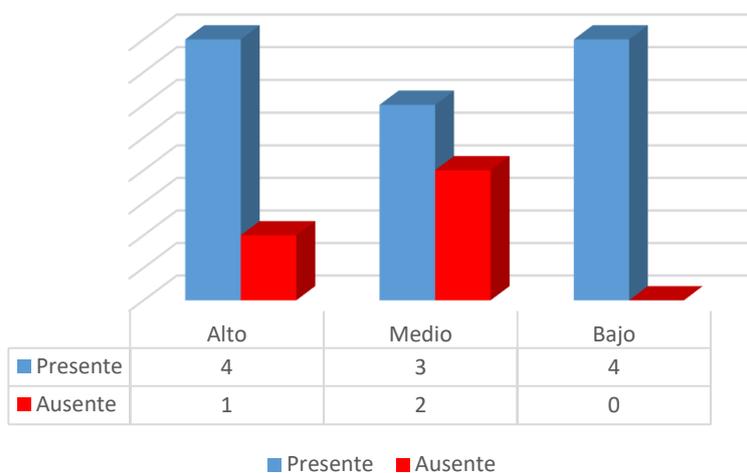


Figura 15. Resultados de la encuesta.

En la Figura 16 se puede observar la cantidad de factores existentes en el predio según el nivel de riesgo, encontrándose 4 en el nivel de alto riesgo, 3 en el medio y 4 en el bajo.



*Figura 16.* Número de factores de riesgo presentes y ausentes en el hato “La Convalecencia”.

En la Tabla 13 se puede observar cuáles son los factores presentes y ausentes en el hato según su nivel de riesgo.

Tabla 13

*Factores de riesgo presentes y ausentes en el hato “La Convalecencia” según su nivel de riesgo.*

Nivel de Riesgo	Factores de Riesgo	Presente/Ausente
Alto	1. No desinfección de material quirúrgico y de descorne.	Presente
	2. Utilización de una aguja en varios animales.	Presente
	3. Presencia de insectos hematófagos y/o murciélagos.	Presente
	4. Falta de control de insectos hematófagos y/o murciélagos.	Presente
	5. Utilización de un guante rectal en varios animales.	Ausente
Medio	1. Provisión de calostro no pasteurizado a terneros.	Presente
	2. Monta natural.	Presente
	3. Contenedores de alimento y agua compartidos.	Presente
	4. Carga animal alta.	Ausente
	5. Pajuelas sin certificación libre de leucosis bovina.	Ausente
Bajo	1. Desconocimiento de la enfermedad.	Presente
	2. Desconocimiento de la transmisión de la enfermedad.	Presente
	3. No se ha realizado un diagnóstico de Leucosis Bovina al hato.	Presente
	4. Se han ingresado animales nuevos al hato sin diagnóstico previo de leucosis bovina.	Presente

#### **b. Características pronósticas**

La infección vírica por LB no tiene una solución terapéutica; a medida que pase el tiempo los animales infectados podrán o no adquirir otro tipo de enfermedades

gracias a una respuesta inmune deficiente debida a la afección de los linfocitos de la línea B que caracteriza a la enfermedad, por lo que estos animales deben ser descartados o bien, ser identificados y separados del resto, manteniéndolos en cuarentena con el fin de evitar contacto alguno con los animales sanos y así disminuir significativamente su diseminación (OIE, 2018).

En el hato donde se realizó el estudio, no se descartarán a los animales positivos debido a las condiciones agropecuarias nacionales, por lo tanto, si los animales positivos a LB no son alejados de los animales sanos, muy probablemente la enfermedad seguirá diseminándose dentro del mismo, aumentando la prevalencia de la enfermedad.

## **4.2 Discusión**

El examen físico de los animales del hato arrojó resultados variables dependiendo de la constante fisiológica, siendo así que los hallados fuera del rango en cuanto a frecuencia cardiaca fue del 19% (34 animales), en frecuencia respiratoria el 27.4% (49 animales) y en temperatura el 5% (9 animales); sin embargo, estos valores no necesariamente se relacionan con la presencia o no de la infección por LB, ya que según Odeón y Romera (2017), “las respuestas al estrés pueden provocar alteraciones en las constantes fisiológicas dependiendo de la duración e intensidad del estímulo y de la experiencia de los animales”, justificando en este caso que terneras, fierros y vaconas pueden estresarse más fácilmente debido a que no están acostumbrados al manejo como una vaca, que es justamente lo que se ve en los resultados de este estudio, ya que son éstas las que más presentan alteraciones en relación al total de animales dentro de cada categoría.

Según Giraudo y otros (2010), el porcentaje de animales infectados por LB que presentan signología clínica está entre el 0.1 y el 10%, lo que concuerda con los resultados del examen físico en el que de 23 animales positivos a LB, sólo 1 animal de la categoría de vacas presentó agrandamiento del linfonodo precural

izquierdo, lo que equivale al 4.3% del total de infectados y puede relacionarse con la infección.

La infección por LB produce una respuesta inmune alta contra la glicoproteína gp51 que se sintetiza durante la infección activa del virus en el tejido (Buehring, y otros, 2018). La prueba de ELISA utilizada detecta la gp51, por lo que la presencia de resultados falsos positivos por consumo de calostro en terneras no es probable en este estudio, ya que el 4.3% de los resultados positivos corresponde a un animal de esta categoría.

La obtención de resultados falsos negativos en el estudio es una probabilidad, ya que como menciona la OIE (2018) “los animales en el periparto disminuyen la cantidad Ac por el traspaso de calostro”, por ende, los animales muestreados en esta etapa que resultaron negativos y que corresponden al 11.5% (18 animales) del total de negativos (156 animales), pueden haber presentado un título de Ac indetectable para la prueba.

Según estudios la LB se presenta con mayor frecuencia en el ganado lechero adulto entre los 2 y 3 años de edad (Giraud, y otros, 2010); en este estudio se obtuvo que la categoría con más animales infectados fueron los fierros (animales entre los 4 y 10 meses de edad), que del total de animales en dicha categoría (20), están correspondiendo al 30% (6 animales) los positivos a LB. Estos dos resultados no concuerdan, sin embargo el estimado entre 2 a 3 años se debe a que ésta es la edad promedio en la mayoría de rebaños lecheros (Radostiits, Blood, Clive, y Hinchcliff, 2002), mas no por otras causas médicas conocidas; por otro lado, ésto puede deberse a que los fierros en esta edad ya han empezado a desarrollar una respuesta inmune activa propia (Chamizo, 2005), lo que significaría que puede haber un alto índice de animales positivos gracias a la transmisión vertical.

La presencia de LB en Ecuador se ha investigado a través de métodos serológicos como ELISA y AGID de manera transversal en varias zonas del país,

entre estas: Chimborazo, Pichincha, Loja, Zamora Chinchipe, Azuay y Cayambe (Vásconez, Sandoval, Puga, y De la Cieva, 2017) (Pineda y Romero, 2014) (Veintimilla y Segundo, 2013) (Puma y Ayanza, 2013) (Bonifaz y Ulcuango, 2012), en las que los resultados de las seroprevalencias iban desde el 3.13% al 18%, lo que concuerda con la prevalencia real obtenida en este estudio (14.7%).

Según Chamizo (2005), debido a que la sangre de animales infectados posee una mayor concentración de linfocitos, representa un mayor riesgo de infección que cualquier otra secreción. En el estudio se encontró que del total de factores predisponentes (14), el 78.5% (11) está presentes en el predio, y de éstos, el 36.3% (4) pertenecen al nivel de alto riesgo debido al contacto con la sangre, por tanto, se puede decir que en el predio ha existido por mucho tiempo una alta susceptibilidad de los animales negativos al contagio por LB.

### **4.3 Limitantes**

El kit diagnóstico utilizado no es una prueba fácil de aplicar en campo, debido a que el proceso requiere tener acceso a un lector de ELISA y la primera vez en aplicarlo requiere de un profesional que sepa del uso de la misma.

En el muestreo sanguíneo hubo animales que se encontraban cerca del parto o recién paridos, por lo que pudieron arrojar un resultado falso negativo debido al traspaso de anticuerpos al calostro y mostrar un título de anticuerpos bajo no detectable para la prueba de ELISA competitivo aplicada.

Se desconoce por falta de registros si la ternera que dio positiva a LB es hija de una vaca positiva o negativa, por lo que no se puede discutir o confirmar si fue un caso positivo por traspaso de anticuerpos maternos durante el calostro o si ésta posee la enfermedad.

## **V. Conclusiones y Recomendaciones**

### **5.1 Conclusiones**

El status sanitario del hato “La Convalecencia” para este estudio, es que la LB se encuentra presente en el hato con una prevalencia real de 14.7% y una prevalencia aparente de 12.8%.

Los animales positivos a LB mediante el kit de ELISA Id Screen® BLV competition, presentan anticuerpos contra la glicoproteína gp51, lo que demuestra una infección activa en dichos animales debido al tiempo en que esta glicoproteína es sintetizada.

El 78.5% (11) de los factores de riesgo presentados en la encuesta están presentes en el hato, encontrándose 4 de éstos en un nivel de riesgo alto por su involucración con la inoculación de sangre de animales infectados en animales no infectados.

El kit de ELISA Id Screen® BLV competition es un método sensible y capaz de detectar animales verdaderamente positivos a LB, sin embargo, no se la considera fácil de aplicar en campo por los equipos y el tiempo que requiere su desarrollo.

La falta de información acerca de la enfermedad de LB en los trabajadores del sector ganadero hace que los factores de riesgo asociados a su transmisión y diseminación sigan apareciendo y dando paso a nuevos animales infectados.

### **5.2 Recomendaciones**

Los animales que resultaron positivos a LB dentro del hato, deberían ser: identificados, alejados del ganado no infectado, y no provisionar calostro de

animales positivos a negativos, puesto que como se ha revisado en esta tesis, muchas secreciones biológicas de animales infectados son una fuente de contagio para el resto.

Eliminar o reducir al mínimo los factores predisponentes a LB existentes en el hato, ayudará a minimizar el riesgo y la susceptibilidad de contagio de animales no infectados.

Realizar un diagnóstico de LB cada 3 meses en el hato ayudará a identificar los animales positivos y negativos en su totalidad, puesto que siempre habrán animales que por ser testeados en periodo como el periparto, no mostrarán un resultado certero debido a que el título de anticuerpos disminuye por su traspaso hacia el calostro.

Incluir en las charlas que se impartan por las autoridades sanitarias nacionales, la capacitación de los trabajadores y dueños de ganaderías acerca de las enfermedades víricas como la LB, sobre su etiología, transmisión y diagnóstico con el fin de promover su importancia y controlar su diseminación.

## REFERENCIAS

- Acuña, P. (2017). *Determinación de la prevalencia de Dirofilaria Immitis en los distritos de San Martín de Porres*. Lima. Obtenido de [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtual/Tesis/Salud/Acu%C3%B1a\\_U\\_P/mat\\_m%C3%A9t.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtual/Tesis/Salud/Acu%C3%B1a_U_P/mat_m%C3%A9t.htm)
- Baruta, D., Ardoino, S., Brandan, J., Sosa, R., Mariani, E., & Albretch, E. (2018). *Universidad Nacional de la Pampa*. Recuperado el 7 de Octubre de 2018, de <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/v13a02baruta.pdf>
- Buehring, G., Shen, H. M., Jensen, H., & Choi, Y. (2018). *Center for Disease Control and Prevention*. Obtenido de <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/5/pdfs/13-1298.pdf>
- Burny, A., & Mammerrickx, M. (1987). *Enzootic Bovine Leukosis*. Glembox, Belgium: Kluwer. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=XyJA-PAICXgC&printsec=frontcover&dq=burny+enzotic+leukemia+virus&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjnh6vhz8baAhVQmlkKHZA2CqMQ6AEIKDAA#v=onepage&q=burny%20enzotic%20leukemia%20virus&f=false>
- Chamizo, E. (2005). Leucosis Bovina Enzootica: Revisión. *REDVET*. Recuperado el 14 de Octubre de 2018, de <http://www.redalyc.org/pdf/636/63612652016.pdf>
- CLIMATE-DATA. (2018). Obtenido de <https://es.climate-data.org/america-del-sur/ecuador/provincia-del-carchi/tulcan-2978/>
- Contreras, P., Cubillos, V., Ernst, S., & Saelzer, P. (1990). *Resúmenes de trabajos del VII Congreso de Medicina Veterinaria*. Chile: Comité Ejecutivo VII Congreso de Medicina Veterinaria. Obtenido de [https://books.google.com.ec/books?id=Xg\\_Lp1I7vgIC&pg=PA19&dq=LEUCOSIS+BOVINA&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjw7Mfwj\\_XdAhUMuVMKHwT9DR0Q6AEIOzAF#v=onepage&q=LEUCOSIS%20BOVINA&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=Xg_Lp1I7vgIC&pg=PA19&dq=LEUCOSIS+BOVINA&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjw7Mfwj_XdAhUMuVMKHwT9DR0Q6AEIOzAF#v=onepage&q=LEUCOSIS%20BOVINA&f=false)
- Del Carpio, A. (2018). *Universidad Ricardo Palma*. Obtenido de [http://www.urp.edu.pe/pdf/clase\\_AnalisisEstadistico.13Feb.pdf](http://www.urp.edu.pe/pdf/clase_AnalisisEstadistico.13Feb.pdf)

- Erskine, R., 1, B. P., Byrem, T., Render, C., Febvay, C., & Houseman, J. (2012). Using a Herd Profile to Determine Age-Specific Prevalence of Bovine Leukemia Virus in Michigan Dairy Herds. *National Center for Biotechnology Information*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3329709/>
- Fechner, H., Blankenstein, P., Cornelis, A., Elwert, J., Geue, L., Albrecht, C., . . . Ebner, D. (1997). Provirus variantes del virus de la leucemia bovina y su relación con el estado serológico de ganado infectado naturalmente. *ELSEVIER*, 261-269. doi:<https://doi.org/10.1006/viro.1997.8784>
- Felmer, R., Zúñiga, J., & Recabal, M. (2006). Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. *Scielo*. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2006000200007>
- Flores, T., & Jhenny, F. (2018). *Google Scholar*. Obtenido de <http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v44/v44a04.pdf>
- Florins, A., Gillet, N., Asquith, B., Boxus, M., Burteau, C., Twizere, J., & Urbain, P. (2007). Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Front Biosci*. doi:10.2741/2165
- Giraudó, J., Bérnago, E., Schneider, M., Magnano, G., Macías, A., Sticotti, E., & Mació, M. (2010). *LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA*. Universidad Nacional del Río Cuarto, Córdoba. Obtenido de [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/infecciosas/bovinos\\_en\\_general/24-leucosis\\_enzootica.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_en_general/24-leucosis_enzootica.pdf)
- Google. (s.f.). [*Mapa del hato "La Convalecencia" de Tulcán, Ecuador en Google maps*]. Recuperado el 27 de Septiembre de 2018, de <https://www.google.com/maps/d/viewer?ll=0.766705712356213%2C-77.73203303968984&spn=23.875%2C57.630033&t=h&msa=0&source=embed&ie=UTF8&mid=1pFMZyH1aut3nTDdgkw2U9c3jtxY&z=16>
- IDVET. (2018). *ID Screen BLV Competition*. Vet Diagnostics, Reino Unido.
- INEC. (2016). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria continua*. Obtenido de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web->

- inec/Estadisticas\_agropecuarias/espac/espac-2016/Presentacion%20ESPAC%202016.pdf
- Kobayashi, S., Tsutsui, T., Yamamoto, T., Hayama, Y., Kameyama, K.-i., Konishi, M., & Murakami, K. (2010). Factores de riesgo asociados con la transmisión dentro del rebaño del virus de la leucemia bovina en granjas lecheras en Japón. *National Center for Biotechnology Information*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835688/>
- Manet, G., Guilbert<sup>1</sup>, A., Roux, A., Vuillaume, A., & Parodi, L. (October de 1989). Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (*Tabanus* spp.). *ELSEVIER*, 22, 255-263. doi:[https://doi.org/10.1016/0165-2427\(89\)90012-3](https://doi.org/10.1016/0165-2427(89)90012-3)
- Mohammadabadi, M., Soflaei, M., Mostafavi, H., & Honarmand, M. (2011). Using PCR for early diagnosis of bovine leukemia virus infection in some native cattle. *National Center for Biotechnology Information*. Obtenido de <https://www.geneticsmr.com/articles/using-pcr-for-early-diagnosis-of-bovine-leukemia-virus-infection-in-some-native-cattle.pdf>
- Odeón, M., & Romera, S. (2017). Estrés en ganado: causas y consecuencias. *Scielo*. Obtenido de <http://www.scielo.org.ar/pdf/revet/v28n1/v28n1a14.pdf>
- OIE. (2018). *Leucosis Bovina enzoótica*. Obtenido de [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.04.10\\_L\\_eucosis\\_bovina\\_enzo%F3tica.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.10_L_eucosis_bovina_enzo%F3tica.pdf)
- Pineda, M., & Romero, R. (2014). *Determinación de la Prevalencia de Leucosis Bovina enzoótica del cantón Chambo en la provincia de Chimorazo*. Universidad de las Américas. Obtenido de <http://dspace.udla.edu.ec/jspui/bitstream/33000/2923/8/UDLA-EC-TMVZ-2014-02.pdf>
- Portetelle, D., Couez, D., Bruck, C., Kettmann, R., Mammerickx, M., Van Der Maaten, M., . . . Burny, A. (1989). Las variantes antigénicas del virus de la leucemia bovina (BLV) se definen por las sustituciones de aminoácidos en la parte de NH 2 de la glicoproteína de la cubierta gp51. *ELSEVIER*, 27-33. doi:[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90037-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90037-8)

- Puma, M., & Yanza, M. (2013). *Prevalencia de Leucosis Bovina en las parroquias Orientales del Cantón Paute de la provincia del Azuay*. Universidad de Cuenca. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/361/1/tesis.pdf.pdf>
- Radostits, O., Blood, D., Clive, G., & Hinchcliff, K. (2002). *Medicina Veterinaria* (Vol. II). Londres: Interamericana McGraw Hill.
- Sajiki, Y., Konnai, S., Nishimori, A., Okagawa, T., Maekawa, N., Goto, S., . . . Ohashi, K. (2017). Intrauterine infection with bovine leukemia virus in pregnant dam with high viral load. *Journal of Veterinary Medical Science*. doi:[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/79/12/79\\_17-0391/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/79/12/79_17-0391/_article)
- Vásconez, A., Sandoval, P., Puga, B., & De la Cieva, F. (2017). *SEROPREVALENCIA DE LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA EN ANIMALES ENTRE 6 A 24 MESES EN LAS PROVINCIAS DE MANABÍ, PICHINCHA Y CHIMBORAZO - ECUADOR*. Universidad Politécnica Salesiana. Obtenido de <file:///C:/Users/Alejandra%20Orellana/Downloads/1868-Texto%20del%20art%C3%ADculo-10589-2-10-20170908.pdf>
- Veintimilla, A., & Segundo, F. (2013). *DIAGNÓSTICO DE LEUCOSIS BOVINA POR EL MÉTODO DE AGAR EN GEL DIFUSIÓN (IDGA) Y CUENTA DE LEUCOCITOS EN BOVINOS FAENADOS EN EL CAMAL FRIGORIFICO DE LOJA*. Universidad Nacional de Loja. Obtenido de <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/5379>

# **ANEXOS**

# ANEXO 1

## VARIABLES DEL ESTUDIO

<b>Variables</b>	<b>Definición</b>	<b>Unidad de medida-</b>
<b>Categoría de los Animales</b>	Edad del animal y estado fisiológico	-
<b>Sexo</b>	Género al que pertenece el animal	-
<b>Prevalencia Real</b>	Animales verdaderamente infectados según la sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica.	Porcentual
<b>Prevalencia Aparente</b>	Animales positivos divididos para la población total muestreada.	Porcentual



## ANEXO 3

### PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

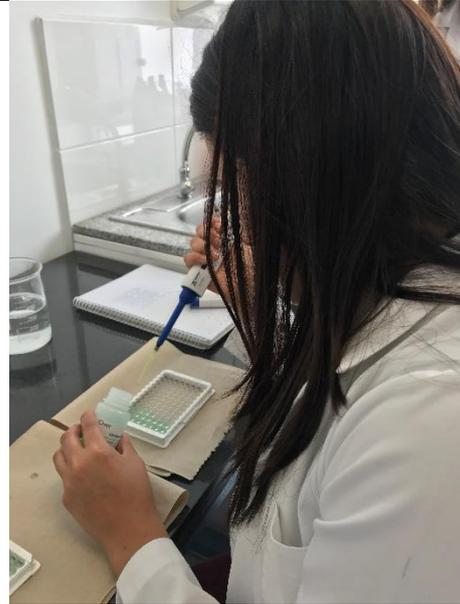
<b>Objetivo:</b> Tomar muestras de sangre manteniendo la asepsia y seguridad de los bovinos.	<b>Grado de Invasividad:</b> Bajo
<p><b>Procedimiento:</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Rotular el tubo.</li><li>2. Introducir a los animales de 10 en 10 a la manga con el fin de que no puedan moverse.</li><li>3. Colocarse los guantes desechables.</li><li>4. Levantar la cola del animal de manera que esté vertical sujetándola con una mano como se muestra en la imagen.</li></ol>  <ol style="list-style-type: none"><li>5. Retirar y limpiar con una torunda de alcohol las heces que se encuentran en la zona a puncionar con 10cm de diámetro alrededor.</li><li>6. Con la mano desocupada se debe ubicar la vena coxígea en el espacio medio del espacio intervertebral de dos vértebras coxígeas.</li><li>7. Colocar la aguja en el capuchón.</li><li>8. Insertar el tubo de tapa roja en el capuchón sin perforarlo.</li><li>9. Realizar la punción insertando la aguja en un ángulo recto en el espacio donde se ubicó la vena coxígea a unos 8 o 12 mm.</li><li>10. Estabilizar la aguja con la mano e introducir la aguja del capuchón en el tubo para que la sangre sea expulsada.</li><li>11. Mantener el capuchón estable para que se consuma el vacío hasta llenar el tubo y luego retirarlo.</li><li>12. Retirar la aguja y presionar la zona puncionada con una torunda de alcohol por unos segundos.</li><li>13. Desechar la aguja utilizada en el contenedor de objetos cortopunzantes y los demás desechos en una funda de material infeccioso.</li><li>14. Retirarse los guantes.</li></ol>	

## ANEXO 4

### PASOS PARA EL PROCESAMIENTO DE SUEROS SANGUÍNEOS EN LABORATORIO.



Paso 1. Preparación de solución de lavado.



Paso 2. Adición del Diluyente 2 y de controles positivos y negativos.



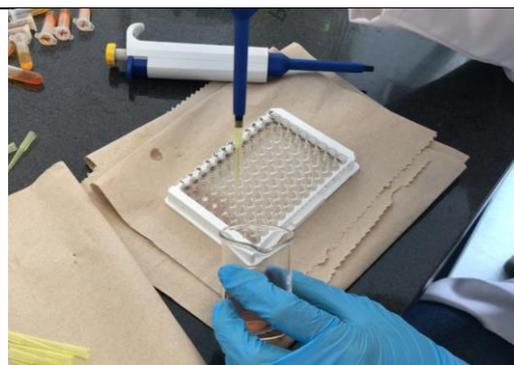
Paso 3. Adición de 20ul de cada muestra en los pocillos para luego incubar las placas por 45 minutos.



Paso 4. Vaciado de pocillos



Paso 5. Primer lavado de los pocillos con Solución de lavado.



Paso 6. Adición del Conjugado 1x a cada pocillo para luego incubar por 30 minutos.



Paso 7. Vaciado y Segundo lavado de los pocillos.



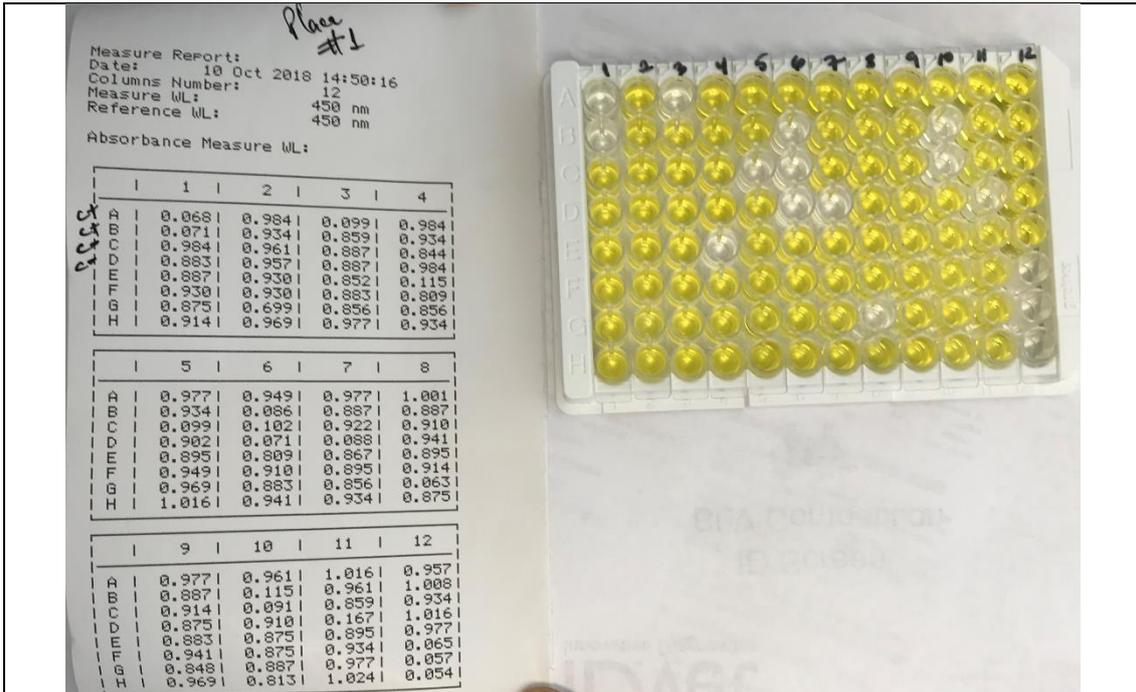
Paso 8. Adición del de 100ul de Solución de revelación a cada pocillo para posterior incubación por 15 minutos en la oscuridad.



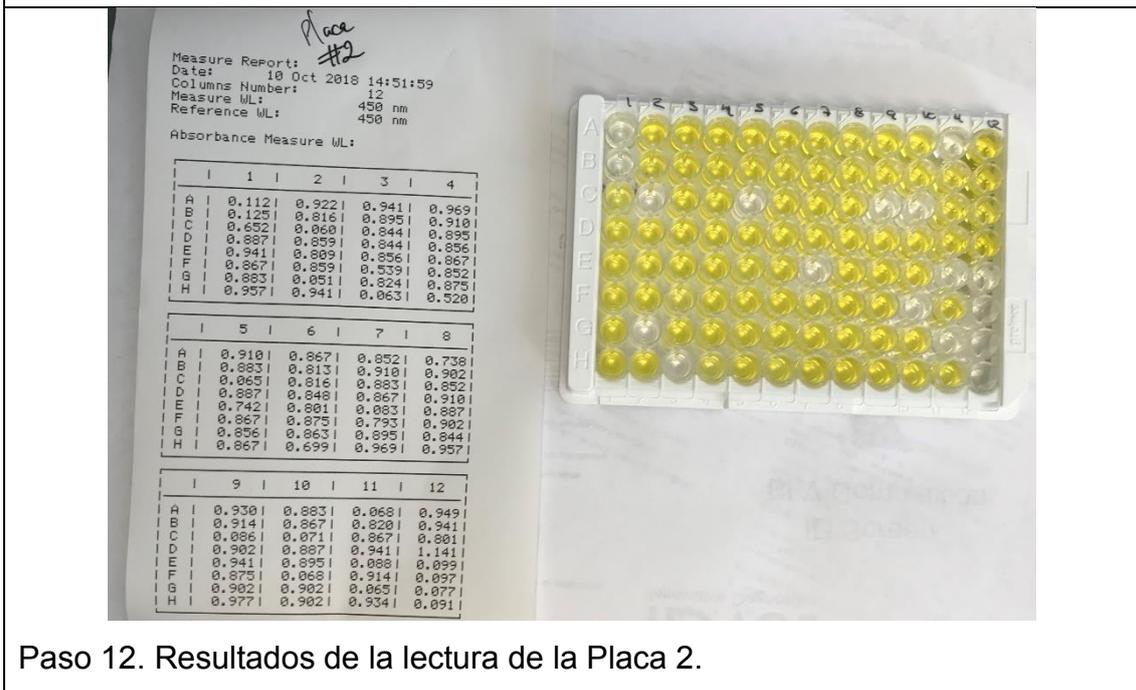
Paso 9. Adición de Solución de parada posterior a la incubación.



Paso 10. Configuración del lector de ELISA para leer las placas a una Densidad Óptica de 450nm.



Paso 11. Resultados de la lectura de la Placa 1.



Paso 12. Resultados de la lectura de la Placa 2.

## ANEXO 5

### ENCUESTA TIPO CHECK LIST PARA DETERMINAR FACTORES PREDISPONENTES A LB EN EL HATO "LA CONVALECENCIA".

BANCO DE PREGUNTAS	SÍ	NO
¿Ha escuchado Ud. sobre la enfermedad de la Leucosis Bovina (LB)?		✓
¿Sabe cómo se transmite la LB?		X
¿Considera que la carga animal por hectárea es alta?		X
¿Se ha realizado un diagnóstico de LB en el hato?		✓
¿En los últimos años se ha ingresado animales nuevos al hato que provengan de otros predios?	✓	
¿Los animales comparten contenedores de alimento o agua?	X	
¿Se realiza desinfección de materiales quirúrgicos, descorne o areteo entre un animal y otro?		X
¿Para la inoculación de medicamentos se utiliza una aguja por animal?		X
¿Se provee calostro a los animales del hato?	X	
¿Se practica la monta natural en los animales del hato?	✓	
¿Las pajuelas utilizadas para I.A. tienen certificación de libres de LB?	X	
¿En los chequeos ginecológicos de los animales se utiliza un guante por animal?	X	
¿Ha observado la presencia de moscas o tábanos en el predio?	X	
¿Existe un control de moscas o murciélagos en el predio?		X

