

no/a.

AUTOR

AÑO



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DETERMINACIÓN DEL STATUS SANITARIO DE LEUCOSIS EN UN HATO BOVINO
MEDIANTE LA APLICACIÓN DE UN KIT RÁPIDO DE ELISA COMPETITIVO EN EL
CANTÓN PEDRO VICENTE MALDONADO

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

Profesor Guía
MVZ. Cristian Fernando Cárdenas Aguilera

Autor
Karla Cristina Moreta Granja

Año
2018

DECLARACIÓN PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Determinación del status sanitario de Leucosis en un hato bovino mediante la aplicación de un kit rápido de ELISA indirecto en el Cantón Pedro Vicente Maldonado, a través de reuniones periódicas con el estudiante Karla Cristina Moreta Granja, en el semestre 2018-2, 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

Médico Veterinario Zootecnista

C.I: 1718185778

DECLARACIÓN PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Determinación del status sanitario de Leucosis en un hato bovino mediante la aplicación de un kit rápido de ELISA indirecto en el Cantón Pedro Vicente Maldonado, del Karla Cristina Moreta Granja, en el semestre 2018-2, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Joar Marcelino García Flores
Médico Veterinario Zootecnista
C.I: 1708655475

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.

Karla Cristina Moreta Granja

C.I:1723164313

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por ser siempre un apoyo incondicional.

A mi tutor, Cristian Cárdenas, por guiarme durante este proceso.

A todos los buenos amigos que conocí en esta carrera, sin ustedes no hubiera llegado hasta aquí.

A mi tío Enrique por permitirme realizar este estudio en su predio.

A Inventagri por facilitarme los kits y sus instalaciones para poder realizar la investigación.

DEDICATORIA

A mis dos ángeles en el cielo, Segundo y Teresa, que con su ejemplo me enseñaron como ser mejor.

A mis padres, Carlos y Sandra, quienes son pilar fundamental en mi formación personal y profesional.

A mis hermanos, Paola y David, y a mis abuelitos, Cecilia y Guillermo, por siempre apoyarme en todo.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia de Leucosis Bovina Enzoótica en un predio dedicado a la producción lechera, ubicado en el cantón de Pedro Vicente Maldonado. Se realizó un examen clínico y muestreo sanguíneo, a todos los animales del predio, en días diferentes. Las muestras sanguíneas fueron procesadas para obtener suero y poder analizarlas con un kit rápido de Elisa competitivo, ID Screen® BLV Competition, que posee una sensibilidad del 99%. Alcanzando como resultado una prevalencia aparente de 1,75% de Leucosis Bovina Enzoótica lo cual representa 1 animal del total de 57 animales en el hato. Asociándose esta prevalencia con los factores de riesgo del predio en estudio: la reproducción se realiza mediante monta directa y compra de animales sin registros sanitarios.

Palabras Clave: Leucosis Bovina Enzoótica, prevalencia, ELISA, subtrópico.

ABSTRACT

The objective of the study was to determine the prevalence of Enzootic Bovine Leukosis in a farm dedicated to dairy production, located in the canton of Pedro Vicente Maldonado. A clinical examination and blood sampling was carried out on all the animals on the farm, on different days. The blood samples were processed to obtain serum and to be able to analyze them with a fast kit of competitive Elisa, ID Screen® BLV Competition, which has a sensitivity of 99%. Reaching as a result an apparent prevalence of 1.75% of Enzootic Bovine Leukosis which represents 1 animal of the total of 57 animals in the herd. Associating this prevalence with the risk factors of the property under study: the reproduction is done by direct mounting and purchase of animals without health records.

Key Words: Enzootic Bovine Leukosis, prevalence, ELISA, subtropical.

ÍNDICE

I	Introducción	1
1.1	Objetivo General.....	2
1.2	Objetivos Específicos	2
1.3	Pregunta de investigación	3
II	Marco Teórico.....	4
2.1	Leucosis Bovina Enzoótica	4
2.1.1	Etiología	4
2.1.2	Patogenia	4
2.1.3	Epidemiología.....	5
2.1.4	Transmisión	6
2.1.5	Identificación del agente	7
2.2	Kit diagnóstico.....	8
2.2.1	Fundamento Técnico	8
2.2.2	Sensibilidad	9
2.2.3	Especificidad	9
2.3	Impacto Económico de la Leucosis Bovina Enzoótica.....	9
III	Materiales y Métodos.....	11
3.1	Ubicación.....	11
3.2	Población y muestra	11
3.2.1	Información del Paciente	12
3.3	Materiales.....	13
3.3.1	Diagnóstico clínico.....	13
3.3.2	Toma de muestras.....	14
3.3.3	Laboratorio e interpretación de resultados	15
3.3.4	Determinación de factores de riesgo	15
3.4	Metodología	16
3.4.1	Diagnóstico clínico.....	16
3.4.2	Toma de muestras.....	16
3.4.3	Procesamiento de las muestras en laboratorio.	17

3.4.4	Determinación de factores de riesgo	17
3.5	Análisis estadístico.....	18
IV	Resultados y Discusión.....	19
4.1	Hallazgos Clínicos.....	19
4.2	Línea de tiempo	22
4.3	Evaluación Diagnóstica.....	23
4.4	Factores de Riesgo.....	23
4.5	Discusión.....	24
V	Conclusiones y Recomendaciones.....	27
5.1	Conclusiones.....	27
5.2	Recomendaciones	27
	REFERENCIAS	28
	ANEXOS.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución de Leucosis Bovina. Adaptada de (OIE, 2017).	6
Figura 2. Distribución por categorías.....	19
Figura 3. Distribución de los cruces del hato	20
Figura 4. Distribución de machos y hembras.....	20
Figura 5. Línea de tiempo del estudio.	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Distribución del hato</i>	11
Tabla 2. <i>Materiales de Diagnóstico clínico</i>	13
Tabla 3. <i>Materiales para toma de muestra sanguínea</i>	14
Tabla 4. <i>Materiales de laboratorio</i>	15
Tabla 5. <i>Constantes fisiológicas</i>	21
Tabla 6. <i>Resultados obtenidos de Elisa</i>	21

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Prevalencia aparente (INTA, 2006).....	18
Ecuación 2. Prevalencia real (INTA, 2006).....	18
Ecuación 3. Prevalencia aparente de LBE en el hato.....	22
Ecuación 4. Prevalencia real de LBE en el hato.....	22

I Introducción

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) en la última década ha sido una enfermedad que se ha dejado de lado tanto en estudios como en programas de control, ya que no existen datos oficiales de prevalencia ni estado sanitario a nivel local de dicha enfermedad, tanto la OIE y AGROCALIDAD, no cuentan con datos actualizados de la situación de ésta enfermedad en el Ecuador (OIE, 2008).

Según estudios realizados en el cantón Chambo en la provincia de Chimborazo se determinó que existe una prevalencia real del 23% de LBE, mediante la utilización de inmunodifusión en gel agar (IDGA), marca IDEXX; con una muestra de 350 animales (Pineda Vásquez & Romero Avalos, 2014).

Otro estudio realizado en la provincia de Santo Domingo en el año 2012 mediante la utilización de un test de ELISA competitiva para la detección de anticuerpos a LBE dio como resultados, de una muestra de 250 animales, una prevalencia de 5,60% en la zona (Bonifaz & Ulcuango, 2012).

En las últimas décadas se ha dado mayor importancia a enfermedades del ganado vacuno sobre todo a aquellas que están dentro de programas de control dirigidos por el Ministerio de Agricultura y Ganadería – MAG a través de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario – AGROCALIDAD, como lo son: Fiebre Aftosa, Brucelosis, Tuberculosis y Rabia (AGROCALIDAD, 2017).

Existen, sin embargo, enfermedades que afectan a los bovinos que no cuentan con un programa de diagnóstico y control, como sucede con la LBE, la cual a pesar de ser una enfermedad de declaración obligatoria y haber sido reportada ante la OIE, no cuenta con un plan nacional oficial en Ecuador, que se ocupe de ella (OIE, 2017).

No obstante existen empresas, como INGENASA e ID.vet, que desarrollan kits diagnósticos para la detección del virus mediante ELISA, la limitante de estos

kits para algunos productores puede ser por los costos que estos tienen, sin embargo se podría llegar a justificar la compra de los mismos ya que al llegar a diagnosticar la LBE se puede aplicar medidas para evitar pérdidas económicas y de animales.

El objetivo del estudio fue determinar el status sanitario de un predio bovino con respecto a LBE, mediante la utilización de un kit rápido de ELISA, para establecer cuál es la prevalencia de la enfermedad dentro del predio y así como también el manejo que se les está dando a los animales. Con lo cual se logró tener un conocimiento de cómo se encuentra el estado clínico del predio, determinando cuáles son los factores que predisponen a la presencia o ausencia de la enfermedad.

Lo que además permitió tener datos de la enfermedad beneficiando al propietario del predio, ya que se está realizando un diagnóstico del hato; a los productores del sector y a los veterinarios del sector, ya que se está dando una alternativa sencilla para el diagnóstico de Leucosis Bovina.

1.1 Objetivo General

Establecer el status zoonosanitario de la Leucosis Bovina Enzootica y los factores que predisponen la presencia de la enfermedad dentro de un predio del cantón Pedro Vicente Maldonado mediante la aplicación de ID Screen® BLV Competition, para conocer la prevalencia real de la enfermedad.

1.2 Objetivos Específicos

Establecer la prevalencia serológica de Leucosis Bovina Enzootica mediante la aplicación de ID Screen® BLV Competition.

Definir las medidas zoonosanitarias y los factores de riesgo que predisponen a la presentación de la enfermedad.

1.3 Pregunta de investigación

¿Cuál es la prevalencia aparente de Leucosis Bovina en un predio ubicado en el cantón de Pedro Vicente Maldonado?

II Marco Teórico

2.1 Leucosis Bovina Enzoótica

2.1.1 Etiología

El virus de la LBE es un virus ARN oncogénico de la subfamilia Oncovirinae, familia Retroviridae, esta familia se denomina así ya que los virus que la conforman utilizan en su replicación una reversotranscriptasa (Kahrs, 1987).

El virus de la LBE se caracteriza por poseer la enzima transcriptasa inversa, la cual es la responsable de la síntesis de una copia de ADN a partir del ARN viral, además en su estructura se encuentran viriones envueltos en lipoproteínas, con cápside isométrica y ARN de dos cadenas (Pineda Vásquez & Romero Avalos, 2014).

Posee también tres genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*; estos genes codifican la producción de la proteína estructural p24 y proteínas de la envoltura como gp51 y gp30 (Baruta, y otros, 2011). Diferentes epitopos de la proteína gp51 han sido identificados con la finalidad de desarrollar pruebas diagnósticas como ELISA, que permitan revelar anticuerpos anti gp51 en animales infectados (Toma, Eloit, & Savey, 2009).

2.1.2 Patogenia

La patogenia de la LBE posee tres estados: infección inaparente, linfocitosis persistente y linfosarcoma; la primera ocurre cuando los animales no presentan ningún signo clínico o cambios al realizar hemogramas únicamente a la serología son positivos (Toma, Eloit, & Savey, 2009).

En el segundo estado, linfocitosis persistente, ya se aprecian cambios a nivel sanguíneo de los animales con un aumento prolongado del recuento de

linfocitos, raramente esta condición aparece antes de los dos años de edad, sin embargo aún no presentan signos clínicos de la enfermedad (Toma, Eloit, & Savey, 2009).

En el tercer estado, linfosarcoma, los animales empiezan a tener signos clínicos que se caracterizan por la presentación de tumores asociados a la linfocitosis persistente y a una respuesta serológica positiva (Toma, Eloit, & Savey, 2009).

Estos tres estados inician cuando un individuo susceptible está en contacto con un individuo infectado, una vez el virus ingresa al organismo su objetivo son los linfocitos B que expresan la IgM; a continuación de la infección viral se da una expansión policlonal de una heterogénea población de linfocitos portadores (Baruta, y otros, 2011).

Las células infectadas se pueden detectar en sangre a partir de la segunda semana tras el ingreso del virus al organismo, alcanzando su pico a la tercera semana para decrecer rápidamente, lo cual indica que el virus está entrando a nuevas células huésped en diferentes tejidos (Baruta, y otros, 2011).

2.1.3 Epidemiología

La LBE tiene una distribución mundial, como se aprecia en la Figura 1, siendo América, Asia y parte de Europa las zonas donde existe una mayor prevalencia; sin embargo existen países que no han reportado casos de la enfermedad o en otros países la LBE está ausente; todo esto acorde al mapa de distribución de la enfermedad establecido por la OIE (OIE, 2017).

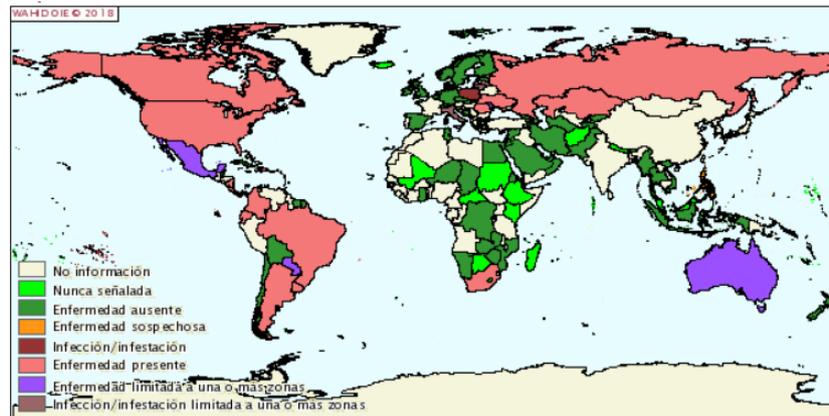


Figura 1. Mapa de distribución de Leucosis Bovina Enzoótica. Adaptada de (OIE, 2017).

A nivel de Latinoamérica la enfermedad se encuentra presente en gran parte de la región, hasta junio del 2017 Bolivia y Chile reportaron la ausencia de la LBE, mientras que en Perú y Venezuela no reportaron información (OIE, 2017).

2.1.4 Transmisión

La transmisión del virus de la LBE se da de dos maneras: horizontal y vertical; en la transmisión horizontal los linfocitos que contienen el virus son traspasados a animales sanos mediante: sangre, calostro, leche, saliva, secreciones nasales, semen y orina, el contagio se da por extracción de sangre, vacunaciones y tacto rectal cuando estas se utiliza el mismo instrumental en más de un animal (Baruta, y otros, 2011).

La transmisión vertical se da por el consumo de calostro y leche que posee linfocitos infectados del virus de la LBE, que afecta directamente a los linfocitos B de las placas de Peyer; además que el virus tiene la capacidad de atravesar la placenta (Baruta, y otros, 2011).

2.1.5 Identificación del agente

Existen dos métodos para llegar a identificar el agente de la Leucosis Bovina Enzoótica: métodos directos y métodos indirectos. Dentro de los métodos indirectos están los que reconocen la respuesta inmune del organismo del hospedador como lo son la detección de anticuerpos específicos antivirales por técnicas inmunológicas (OIE, 2008).

Dentro de los métodos directos tenemos: aislamiento del virus, detección de ácidos nucleicos virales (PCR), microscopia electrónica y la detección de antígenos virales con Inmunofluorescencia (IF) y Enzimoimmunoanálisis (EIA), radioimmunoanálisis (RIA), enzimoimmunoanálisis (ELISA), la inmunotransferencia o inmunodifusión en gel de agar (AGID) (OIE, 2008).

Los Ensayos Inmunoabsorbentes Ligados a Enzimas (ELIAs) tienen un rol significativo en los laboratorios médicos y de investigación, ya que ofrecen una alternativa viable, por medio de la cual se logra realizar la identificación de varios virus y géneros de virus; éstas pruebas están reemplazando a los RIA en muchos laboratorios, por su similar sensibilidad quitando los inconvenientes de manejo (Cruz Malpica, 2010).

La prueba de ELISA tiene como fundamento la reacción antígeno-anticuerpo, uno de estos es de reactividad conocida; el color se produce por el intercambio de un sustrato cromogénico y una enzima que fue acoplada al anticuerpo detector, a continuación de la reacción del antígeno con el suero del paciente, se obtiene que la capa de detección es un reactivo antiinmunoglobulina clase específica (IgM o IgG) para poder manifestar la respuesta de anticuerpos clase específicos (Cruz Malpica, 2010).

Los métodos de ELISA dependiendo de la actividad enzimática se dividen en dos:

ELISA COMPETITIVO: En este método, el anticuerpo de la muestra va a competir con el conjugado por un número limitado de sitios de unión del antígeno. Habrá ausencia de color en una muestra positiva debido a que el sustrato no encontrará a la enzima porque el conjugado ha sido desplazado por el anticuerpo presente en la muestra (Cruz Malpica, 2010).

ELISA NO COMPETITIVO: Consiste en enfrentar la muestra con el antígeno o anticuerpo que está en la fase sólida. Si una muestra es positiva se formará el complejo antígeno-anticuerpo y al agregar el conjugado reaccionará con el respectivo sustrato desarrollando color (Cruz Malpica, 2010).

2.2 Kit diagnóstico

2.2.1 Fundamento Técnico

El kit diagnóstico ID Screen® BLV Competition, se basa en la aplicación de ELISA competitivo, en éste tipo de ELISA el anticuerpo de la muestra va a competir con el conjugado por sitios de unión del antígeno, por lo tanto habrá ausencia de color en una muestra positiva debido a que el sustrato no encontrará a la enzima porque el conjugado ha sido desplazado por el anticuerpo presente en la muestra (López, Rodríguez, & Romero, 2008)

Los pocillos son sensibilizados con el antígeno gP51; las muestras y los controles son añadidos a los pocillos, los anticuerpos anti-gP51, si están presentes, formarán un complejo antígeno-anticuerpo que enmascara los epítopos de la gP51 (IDVET GENETICS, 2017).

Un conjugado anti-gP51 marcado a la peroxidasa (HRP) es distribuido en los pocillos, este se fija a los epítopos del virus que están libres, formando un complejo antígeno-conjugado-HRP; luego de la eliminación del exceso del

conjugado mediante lavado, la reacción es expuesta a través de una solución de revelación (TMB) (IDVET GENETICS, 2017).

2.2.2 Sensibilidad

La sensibilidad de un test diagnóstico se define como la proporción de individuos realmente enfermos (verdaderos positivos) de aquellos que el test marca como positivos (Arango, 2003).

La sensibilidad que posee el kit ID Screen® BLV Competition es del 99% (IDVET GENETICS, 2017).

2.2.3 Especificidad

La especificidad de un test diagnóstico se define como la proporción de individuos realmente sanos (verdaderos negativos) de aquellos que el test marca como negativos (Arango, 2003).

La especificidad que posee el kit ID Screen® BLV Competition es del 98% (IDVET GENETICS, 2017).

2.3 Impacto Económico de la Leucosis Bovina Enzoótica

El impacto económico de la enfermedad es causado por las pérdidas que provocan los efectos de la infección subclínica durante la producción de leche (Delgado, y otros, 2009). Sin embargo el verdadero impacto económico de la LBE se da por la restricción en el comercio entre países que reportan la presencia de la enfermedad, siendo además difícil su diagnóstico al no presentar signos clínicos de forma evidente sino hasta que el animal está en la tercera etapa de la enfermedad presentando linfosarcoma (Gutiérrez, 2016).

Según un estudio realizado en Estados Unidos, por Bartlett et al, en el año 2013 se pierde 95kg/vaca/año por cada aumento en el 10% de la prevalencia de LBE en las zonas infectadas en Estados Unidos, lo cual hace referencia a alrededor de \$285 millones de pérdidas al año (Puentes, 2015)

En Estados Unidos existen alrededor de 93,6 millones de cabezas de ganado vacuno (Vacuno de élite, 2016), mientras que en Ecuador existen alrededor de 5,2 millones (El ciudadano, 2017), por lo tanto relacionando la pérdida que Estados Unidos posee por la prevalencia de LBE (\$285 millones y 95kg/vaca/año) con la cantidad de cabezas de ganado que tiene, Ecuador estaría perdiendo cerca de \$15 millones y 5,3kg/vaca/año por la presencia de la LBE.

III Materiales y Métodos

3.1 Ubicación

Este estudio se encontró ubicado en el cantón de Pedro Vicente Maldonado en la provincia de Pichincha. El cantón cuenta con una temperatura entre 16° - 25° C, y una humedad sobre el 70%. Se localiza al Noroeste de la provincia de Pichincha. Es una zona con un ecosistema de bosque nublado, húmedo tropical y subtropical, con una altitud de 620 metros msnm (Gobierno de Pichincha, 2015).

El predio cuenta con 49 hectáreas destinadas a la producción extensiva de leche, con un suelo húmedo y fértil para la producción de *Neonotonia wightii* (soja forrajera) y *Paspalum dilatatum* (pasto miel).

El predio del estudio se encuentra ubicado en la vía a la Celica, con unas coordenadas de 0° 8'35.02"N, 79°16'3.95"O

3.2 Población y muestra

La población actualmente del hato bovino en estudio es de 57 animales distribuidos en 5 categorías, como se observa en la tabla 1.

Tabla 1

Distribución del hato

CATEGORÍA	N°
Rejo	15
Seco	15
Vaconas	6
Terneritas	19
Macho Reproductor	2
Total	57

En el presente estudio se trabajó con el total de la población, 57 animales, no se aplicaron criterios de inclusión y exclusión, ya que el objetivo fue obtener la prevalencia del predio por lo tanto se debió someter al total de la población al estudio.

3.2.1 Información del Paciente

Dentro del estudio, a pesar que la recolección de datos se la realizó de manera individual, la presentación de la anamnesis o información del paciente se la trabajó como grupo de animales.

El hato no realiza chequeos ginecológicos debido a que el productor no cuenta con el servicio de un médico veterinario, el calendario sanitario es básico administrando únicamente las vacunas que el consejo provincial les proporciona; aftosa, brucelosis, leptospirosis y Bacterina Triple C.E.S.® (pasteurelisis neumónica, carbunco y el edema maligno). Las desparasitaciones las realizan con Ivomec® cada seis meses, además de baños para eliminar a las garrapatas.

La alimentación de los animales es en base a pastoreo de manera extensiva combinado con balanceado y sales minerales únicamente a las vacas que se encuentran en reño, y agua a voluntad, la cual proviene de vertiente de un río que atraviesa el predio. Cada 3 meses suplementan con vitaminas a todos los animales del predio.

Estos animales, en su mayoría, son de biotipo lechero, manejándose con cruces entre Holstein, Jersey, Brahman y recientemente con un macho Brangus, mediante monta directa. Los machos que son traídos de otros predios y el reemplazo de hembras se lo realiza de dos maneras, la primera es mediante la selección y crianza de terneras del mismo predio y la segunda mediante la adquisición de hembras adultas de otros predios, actualmente el predio utiliza las terneras del mismo predio para reemplazo, comprando vacas en pocas ocasiones.

La producción de leche del predio es de 140 litros/predio/día, dando un promedio entre 9 y 12 litros diarios por vaca, con un solo ordeño al día que se lo realiza en la mañana con la cría a la vista, destinando una parte de la leche para la alimentación de terneros, que requieren de 4 litros diarios, separando uno de los cuartos para la cría, la cual toma la leche directamente de la madre.

Cuenta con 8 diferentes cruces, Jersey con 9 animales; Holstein con 19 animales; el cruce entre Jersey y Holstein con 13 animales; Brahman con 4 animales, al igual que el cruce de Brahman y Holstein; el cruce de Jersey y Brahman con 5 animales; Brangus con 1 animal y finalmente el cruce de Brahman con animales criollos con 2 animales.

3.3 Materiales

Para efectos del trabajo de experimentación se han considerado materiales para cuatro actividades: diagnóstico clínico, toma de muestras, laboratorio e interpretación de resultados y determinación de factores de riesgo.

3.3.1 Diagnóstico clínico

Los materiales que se requirieron para realizar el diagnóstico clínico se encuentran detallados en la tabla 2.

Tabla 2
Materiales para Diagnóstico clínico

MATERIAL	CANTIDAD
Fonendoscopio	2 unidades
Termómetro	2 unidades
Nariguera	1 unidad
Cuerdas	10 unidades
Fichas clínicas	100 unidades

Esfero	2 unidades
Guantes de manejo	1 caja de 100 unidades
Cinta bovinométrica	1 unidad
Manga	1 unidad

3.3.2 Toma de muestras

Los materiales que se requirieron para realizar la toma de muestras se encuentran detallados en la tabla 3.

Tabla 3
Materiales para toma de muestra sanguínea

MATERIAL	CANTIDAD
Agujas de vacutainer 21G 1"	100 unidades
Capuchones	5 unidades
Tubo de ensayo sin anticoagulante tapa roja 10 ml	100 unidades
Cooler 27 litros	1 unidad
Gel refrigerante	5 unidades
Hojas de registro	100 unidades
Guantes de manejo	1 caja de 100 unidades
Torundas con alcohol	100 unidades
Gradillas	1 unidad
Nariguera	1 unidad
Cuerdas	3 unidades
Marcador permanente	2 unidades
Papel	1 rollo
Guardián o botella vacía	1 unidad
Centrífuga de 5000 rpm	1 unidad
Micropipeta	1 unidad
Puntas de pipetas	100 unidades
Tubos de eppendorf	100 unidades

3.3.3 Laboratorio e interpretación de resultados

Los materiales que se requirieron para realizar procesamiento de las muestras e interpretación de los resultados en laboratorio se encuentran detallados en la tabla 4.

Tabla 4
Materiales de laboratorio

MATERIAL	CANTIDAD
ID Screen® BLV Competition	1 unidad
Guantes	1 par
Mascarilla	1 unidad
Micropipeta	1 unidad
Puntas de pipetas	100 unidades
Tubos de eppendorf	100 unidades
MaxSignal ® 4302 lector de microplacas de 96 pocillos	1 unidad

3.3.4 Determinación de factores de riesgo

Los materiales que se requirieron para realizar la determinación de los factores de riesgo de LBE dentro del predio se encuentran detallados en la tabla 5.

Tabla 5
Materiales para determinación de factores de riesgo

MATERIAL	CANTIDAD
Check list	1 unidad
Carpeta miniclip con pinza	1 unidad
Esfero	1 unidad

3.4 Metodología

Para alcanzar el objetivo del estudio se lo dividió en cuatro etapas: diagnóstico clínico, toma de muestras, procesamiento de muestras en laboratorio y determinación de factores de riesgo.

3.4.1 Diagnóstico clínico.

Para el diagnóstico clínico se realizó la toma de constantes fisiológicas: temperatura, sonidos ruminales, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, tiempo de llenado capilar y color de las mucosas; además se revisó al animal cualquier tipo de alteración en la cabeza, cuerpo o extremidades y por último se midió la condición corporal de cada animal. Para todo se empleó la metodología y ficha clínica del Examen Clínico General descrito en el Anexo 1. Siendo de importancia la realización del examen clínico para conocer el estado sanitario general del hato. Se lo realizó antes de las tomas de muestras sanguíneas, en caso de las vacas de rejo y las terneras se lo realizó una semana antes de la toma de sangre; mientras que para vaconas, vacas del seco y los machos reproductores se lo realizó inmediatamente antes de la toma de muestras. No se pudo realizar la palpación de los nódulos linfáticos superficiales ya que los animales inquietos por lo cual no fue posible la palpación.

Toda la información obtenida con el Examen Clínico fue registrada en fichas clínicas que se encuentran en el Anexo 1.

3.4.2 Toma de muestras.

De acuerdo al kit ID Screen® BLV Competition se requiere la obtención de una muestra de suero sanguíneo, para lo cual se recolectó sangre de la vena coccígea, posteriormente se colocó la sangre en la centrifugadora para separar el suero, a continuación se almacenó el suero para su transporte y después se las congeló hasta realizar el análisis en el laboratorio. La toma de muestras sanguíneas se realizó con la metodología descrita en el Anexo 2.

3.4.3 Procesamiento de las muestras en laboratorio.

El fin del kit de diagnóstico empleado en el estudio es detectar anticuerpos dirigidos contra la gP51 en sueros de bovinos, donde se puede utilizar tanto sueros individuales como mezclas de 10 sueros. El análisis de muestras se realizó con sueros individuales de todos los animales del predio, tomando en cuenta las instrucciones del fabricante primero se realizó la preparación de la solución de lavado y la preparación del conjugado.

Una vez que se obtuvieron ambas soluciones se procedió a colocar en todos los pocillos el diluyente, en los dos primeros el control negativo, en los dos siguientes el control positivo y en los pocillos restantes cada una de las muestras, se dejó incubar por 45 minutos a temperatura ambiente para posteriormente vaciar los pocillos y lavarlos 3 veces antes de colocar el conjugado e incubar otros 30 minutos. Se vuelve a vaciar los pocillos y lavarlos 3 veces con la solución de lavado para añadir la solución de revelación e incubar los últimos 15 minutos para posteriormente añadir la solución de parada. A continuación se procedió a leer los pocillos a 450nm en un lector de microplacas para Elisa.

El procesamiento e interpretación de resultados de las muestras se realizó mediante las instrucciones del fabricante como se detalla en el Anexo 3.

3.4.4 Determinación de factores de riesgo

Para la determinación de los factores de riesgo se realizó un check list, mediante la recopilación de los factores que predisponen a la LBE descritos en la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), se preguntó tanto al dueño del predio como al trabajador sobre todos los puntos del check list descrito en el Anexo 4, además se observó que los que decía el dueño y el trabajador coincidiera con lo que se apreciaba en el predio.

3.5 Análisis estadístico

En el presente estudio se realizó un análisis descriptivo de tipo porcentual de la distribución de los animales, y determinación de la prevalencia aparente y real mediante la ecuación 1 y ecuación 2 respectivamente:

$$\textit{Prevalencia aparente} = \frac{\textit{Número de casos existentes}}{\textit{Número total de individuos en una población}}$$

Ecuación 1. Prevalencia aparente (INTA, 2006).

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

Ecuación 2. Prevalencia real (INTA, 2006).

IV Resultados y Discusión

4.1 Hallazgos Clínicos

El hato cuenta con 5 categorías: seco, rejoy, vaconas, terneros y macho reproductor. Distribuidos como se aprecia en la Figura 2 siendo: seco el 26% (15 animales); rejoy también con 26% (15 animales); vaconas el 11% (6 animales); terneros el 33% (19 animales) y macho reproductor el 4% (2 animales).

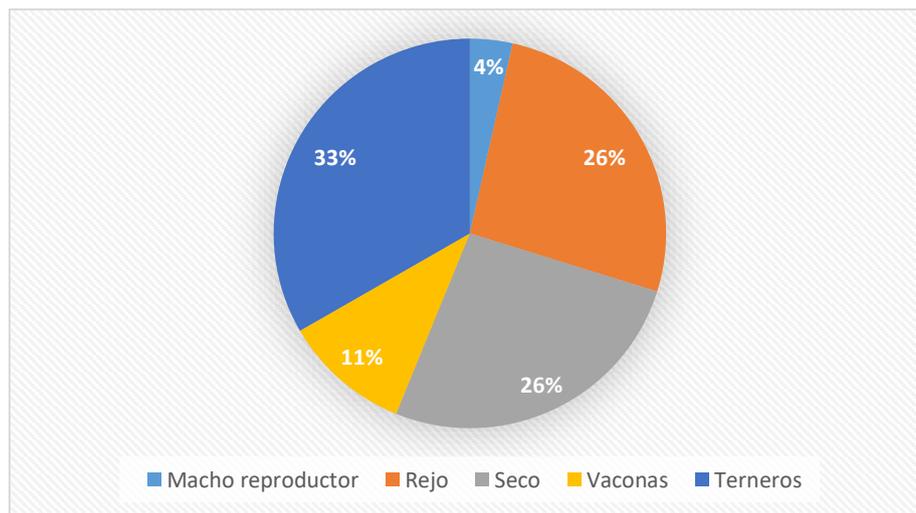


Figura 2. Distribución por categorías de los bovinos

Los cruces se encuentran distribuidos como se aprecia en la Figura 3 siendo: Jersey el 15,8% (9 animales); Holstein con un 33,3% (19 animales); el cruce entre Jersey y Holstein el 22,8% (13 animales); Brahman con 7%, al igual que el cruce de Brahman y Holstein (4 animales); el cruce de Jersey y Brahman con el 8,8% (5 animales); Brangus con el 1,8% (1 animal); y finalmente el cruce de Brahman con animales criollos el 3,5% (2 animales).

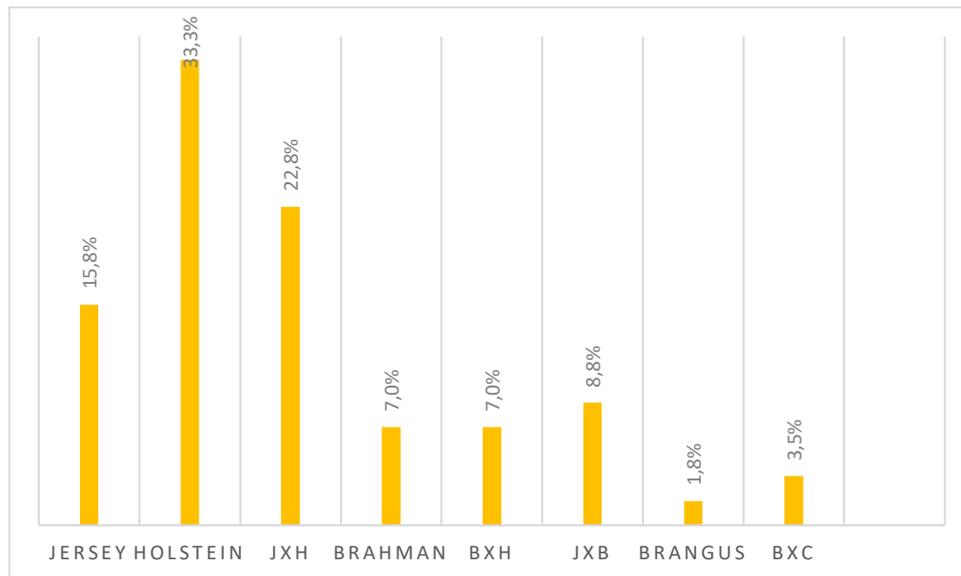


Figura 3. Distribución de los cruces de los bovinos

Nota. JxH= cruce de Jersey y Holstein; BxH = cruce de Brahman x Holstein; JxB = cruce de Jersey y Brahman; BxC = cruce de Brahman y Criollos

Los machos y hembras son mantenidos con las madres hasta los 6 meses de edad y posteriormente a los machos se los vende para engorde, mientras que las hembras se quedan en el predio para reemplazos. Entre la distribución de hembras y machos que se observa en la Figura 3, se indica que el 23% corresponden a machos (13 animales), mientras las hembras alcanza un 77% (44 animales).

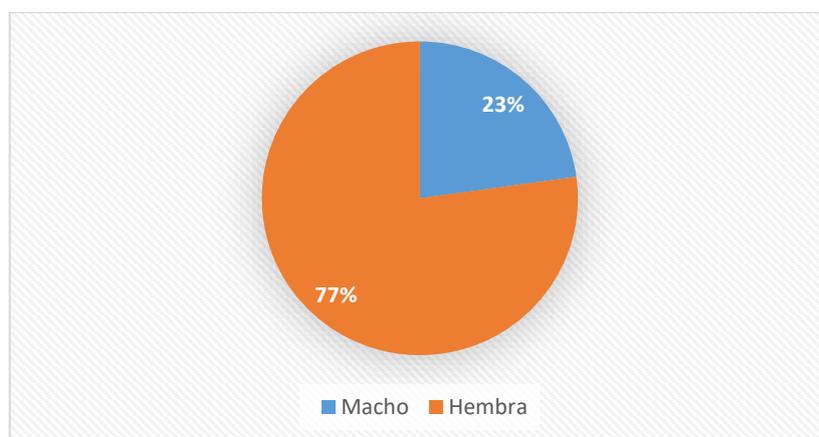


Figura 4. Distribución de machos y hembras.

Mediante el examen físico se llegó a determinar las constantes fisiológicas de los animales, como temperatura, sonidos ruminales, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, tiempo de llenado capilar y color mucosas; un resumen de los resultados de este examen se detalla en la tabla 6, dónde se aprecia que en el parámetro de la temperatura hubieron 33 animales fuera de rango lo cual se debió a que el examen clínico fue tomado entre las 10h00 y 12h00, de igual manera con los 35 animales que tuvieron una frecuencia respiratoria fuera de rango se debió a la temperatura ambiental por la hora en que se realizó el examen clínico.

Tabla 6
Constantes fisiológicas

	T°*	Sonidos Ruminales	Frecuencia Cardiaca	Frecuencia Respiratoria	Tllc*	Mucosas
Normal	24	51	38	22	56	53
Fuera de rango	33	6	19	35	1	4

* T°: Temperatura; *Tllc: Tiempo de llenado capilar

En cuanto a los resultados del kit ID Screen® BLV Competition, se obtuvo que solo un animal, de los 57 en estudio, fue positivo mediante la aplicación de Elisa competitivo como se muestra en la tabla 7. El único animal positivo corresponde a la muestra N° 19, el animal N° 5979 una vaca Jersey de 3 años de edad, perteneciente a la categoría de seco y que al examen clínico sus constantes fueron normales.

Tabla 7
Resultados obtenidos de Elisa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	1,731	1,575	1,785	1,614	1,657	1,581	1,859	1,783	1,792
B	1,734	1,569	1,693	1,432	1,755	1,712	1,641	1,783	1,830
C	0,252	1,638	1,674	1,704	1,530	1,726	1,788	1,736	1,700
D	0,265	1,530	1,622	1,712	1,797	1,746	1,671	1,641	1,555

E	1,701	1,532	1,582	1,809	1,625	1,710	1,625	1,793	1,681
F	1,652	1,683	1,635	1,570	1,773	1,709	1,699	1,684	1,605
G	1,766	1,616	*0,244	1,666	1,845	1,762	1,553	0,268	1,724
H	1,829	1,696	1,785	1,860	1,797	1,768	1,759	1,730	1,685

El resultado fue de 1 positivo de los 57 animales que tiene el hato dando como prevalencia aparente 1,75% y prevalencia real 0% dado por las ecuaciones:

$$\text{Prevalencia aparente de LBE} = \frac{\text{Número de casos existentes}}{\text{Número total de individuos del hato}}$$

$$\text{Prevalencia aparente de LBE} = \frac{1}{57}$$

$$\text{Prevalencia aparente de LBE} = 0,0175 \times 100$$

$$\text{Prevalencia aparente de LBE} = 1,75\%$$

Ecuación 3. Prevalencia aparente de LBE en el hato

$$\text{Prevalencia real de LBE} = \frac{(\text{Prevalencia aparente} + \text{Especificidad} - 1)}{(\text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1)}$$

$$\text{Prevalencia real de LBE} = \frac{(0,0175 + 0,98 - 1)}{(0,99 + 0,98 - 1)}$$

$$\text{Prevalencia real de LBE} = 0 \times 100$$

$$\text{Prevalencia real de LBE} = 0\%$$

Ecuación 4. Prevalencia real de LBE en el hato

4.2 Línea de tiempo

Para el objetivo del estudio se realizaron cuatro procedimientos: examen físico, toma de muestras, procesamiento e interpretación de las muestras y determinación de factores de riesgo. Estos procedimientos se ejecutaron en 4 días diferentes como se explican en la Figura 5.

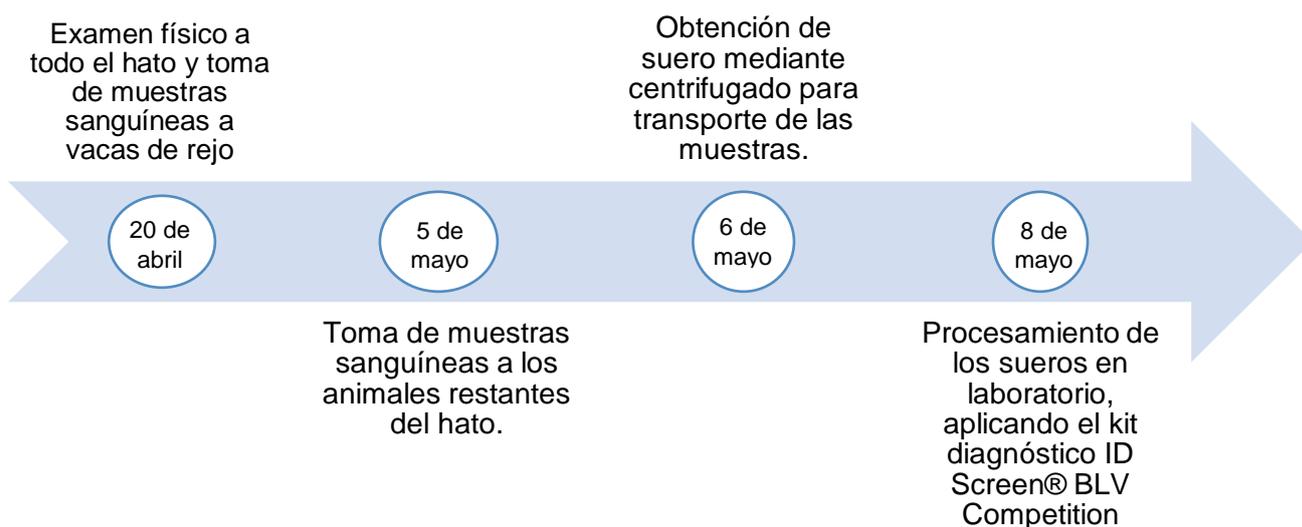


Figura 5. Línea de tiempo del estudio en 2018.

4.3 Evaluación Diagnóstica

Para llegar al diagnóstico del status sanitario de Leucosis Bovina Enzoótica en el hato se implementó el kit ID Screen® BLV Competition, para lo cual las muestras se colocaron en pocillos para la realización de Elisa como se detalla en el Anexo 4.

Los resultados que se obtuvieron a partir de la realización de Elisa se muestran en la tabla 6, donde las celdas A1, B1 y F8 corresponden a controles negativos, mientras que las celdas C1, D1 y G8 corresponden a controles positivos, de esta manera la muestra correspondiente a la celda G3 es la única muestra positiva del hato en estudio.

4.4 Factores de Riesgo

Los factores de riesgo para la presentación de LBE del estudio fueron recopilados a partir de la OIE, siendo los principales: desconocimiento de la

enfermedad, uso de una sola aguja para desparasitaciones y vacunación de todos los animales, entrada de animales del hato sin registros sanitarios, uso de guantes de palpación para varios animales, cirugías y descornes en masa sin desinfectar el instrumental y monta natural (OIE, 2008). Se realizó un check list, que se encuentra detallado en el Anexo 4, con todos los factores de riesgo mencionados, para ser aplicado en el predio.

Como resultado de la evaluación se observó que: realizan monta directa, utilizan una aguja por animal en desparasitaciones y vacunas, en pocas ocasiones se ha realizado cirugías, no descornan a los animales y las entradas de animales sin registros sanitarios son de manera esporádica, dándose el caso de la vaca N°19 correspondiente al positivo en el Elisa realizado en el estudio.

4.5 Discusión

Felipe Aristizábal menciona que el 17% de las vacas en producción deben estar en seco mientras que el 83% restante debe estar en rejo (Pallarez, 2017), lo cual difiere del estudio dándose una distribución de vacas en rejo y en seco de 50% cada una, sin tomar en cuenta las otras 3 categorías del hato, esto se debe a que el sistema de manejo por parte del ganadero es de manera estacional, teniendo épocas del año donde la proporción de vacas en rejo y vacas en seco es la misma.

Por otro lado el Médico Veterinario Gabriel Serrano (2014) y Pellarez (2017) concuerdan que el porcentaje adecuado de vaconas en un hato está dado por la mortalidad del hato, los días entre partos, la edad de descarte de las vacas y la edad en que las vaconas entran en producción; de igual manera Serrano afirma que las salidas de un hato no deben superar el 14% por lo tanto no debe contar con gran cantidad para reemplazos (Serrano, 2014); en el estudio la cantidad de vaconas es del 11% de la población total, tomando en cuenta que tienen una edad máxima de 2 años y que la edad para primer parto que se está manejando en el hato es de 30 meses, faltándoles medio año para alcanzar la etapa

productiva, y que este hato tiene un porcentaje de salidas del 12%, esto concuerda con lo descrito por Pellarez y Serrano.

En cuanto a la proporción de terneros es del 33% inferior al total de vacas en producción que es del 52% tanto en rejo como en seco, esto supondría que algunos terneros corresponden a vacas que se encuentran en el seco, y una cantidad de ellos ya estando destetados, lo cual concuerda con Pérez et al, donde mencionan que debe existir en el predio un mayor número de vacas que de terneros para obtener ganancias en la producción lechera (Pérez, Holmann, Schuetz, & Fajardo, 2006).

Vásconez-Hernández et al., en el año 2017 realizaron un estudio donde compararon la prevalencia aparente de LBE entre tres provincias (Manabí, Pichincha y Chimborazo), cuatro pisos climáticos (páramo, templado, subtropical y tropical) y diferentes altitudes, dando una prevalencia de 8,13% para Pichincha, para un clima subtropical la prevalencia fue de 1,24% y para una altitud entre 501 – 1000 msnm dio una prevalencia de 1,54% (Vásconez-Hernández, Sandoval-Valencia, Puga-Torres, & De La Cueva-Jácome, 2017); los dos últimos datos concuerdan con los resultados de este estudio, que fue de 1,75% de prevalencia aparente debido a que a pesar de que el cantón de Pedro Vicente Maldonado se encuentra en Pichincha, el cantón se encuentra en la región noroccidental de la provincia con clima subtropical y altitud de 600 msnm

La prevalencia aparente del hato fue de 1,75% utilizando un kit diagnóstico de Elisa competitiva, en un hato de Pedro Vicente Maldonado que tiene una altitud de 600msnm y un clima subtropical, esto concuerda con el estudio

En cuanto a la utilización de Elisa como método diagnóstico Rama y González et al, concuerdan que este método es sensible y rápido para la obtención de los resultados, y de igual manera ambos recomiendan la utilización de otro método diagnóstico solo en caso de que exista duda del resultado (González, y otros,

2001) (Rama, 2009). En este estudio se trabajó con un kit de Elisa altamente sensible 99% de esta manera no hizo falta realizar una prueba confirmatoria.

V Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

El status zoosanitario con respecto a Leucosis Bovina Enzoótica del hato en estudio es que la enfermedad se encuentra presente, teniendo 1,75% de prevalencia obtenida mediante la aplicación de ID Screen® BLV Competition, Elisa competitiva, teniendo en cuenta que al ser una enfermedad no vacunal la presencia de anticuerpos se debe a que el animal esta efectivamente contagiado evitando así los falsos positivos.

Los factores de riesgo en el estudio fueron la compra esporádica de animales sin registros sanitarios, ya que el animal que presenta la enfermedad coincide que fue una compra resiente del productor, por otro lado el hato cuenta con buenas practicas sanitarias impidiendo así el contagio de otros animales.

5.2 Recomendaciones

Dentro del predio en estudio se debe implementar un programa de cuarentena a los animales recién llegados, para prevención y control tanto de la LBE como de cualquier otra enfermedad y así poder mantener un buen status sanitario en el predio.

En cuanto a la vaca positiva a LBE hay dos acciones que se pueden llegar a realizar acciones: la primera es descartar al animal de manera inmediata para de esta manera estar seguro de que no va a infectar al resto de animales. Mientras que la otra opción, si se desea conservar al animal dentro de predio, es mantenerlo identificado y alejado del grupo, que al momento del ordeño no se pongan en contacto secreciones y excreciones del animal infectado, no realizar monta directa con los machos reproductores del hato y al momento de tener una cría darle calostro y leche de una vaca sana.

REFERENCIAS

- AGROCALIDAD. (Octubre de 2017). *Agrocalidad*. Recuperado el 23 de Octubre de 2017, de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/sanidad-animal/01-vigilancia-zoosanitaria/DAJ-2013461-0201.0214.pdf>
- Arango, F. S. (Agosto de 2003). *Scielo*. Recuperado el 8 de Abril de 2018, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572003000300012
- Baruta, D., Ardoino, S., Brandan, J., Sosa, R., Mariani, E., & Albretch, E. (2011). *Universidad Nacional de La Pampa*. Recuperado el 1 de Abril de 2018, de Universidad Nacional de La Pampa: cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/download/1855/1812
- Bonifaz, N., & Ulcuango, F. (2012). *Univerdidad Politecnica Salesiana*. doi:10.17163
- Cruz Malpica, C. (2010). *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Recuperado el 16 de Abril de 2018, de Universidad Nacional Mayor de San Marcos: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtual/Tesis/Salud/Cruz_M_C/generalidades.htm
- Delgado, I., Martínez, N., Abeledo, M. A., Rodríguez, M., Barrera, M., & Aguirre, A. (Abril de 2009). *Scielo*. Recuperado el 8 de Abril de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2009000100005
- El ciudadano. (2017). *El ciudadano*. Recuperado el 18 de Abril de 2018, de <http://www.elciudadano.gob.ec/en-el-ecuador-hay-mas-de-4-millones-de-cabezas-de-ganado-vacuno/>
- Gobierno de Pichincha. (10 de Septiembre de 2015). *Gobierno de Pichincha*. Recuperado el 22 de Noviembre de 2017, de <http://www.pichincha.gob.ec/pichincha/cantones/item/19-pedro-vicente-maldonado.html>
- González, E., Oliva, G., Valera, A., Bonzo, E., Licursi, M., & Etcheverrigaray, M. (2001). Recuperado el 19 de Mayo de 2018, de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11131/Documento_completo__.pdf?sequence=1
- Gutiérrez, M. F. (2016). *Salud Capital*. Recuperado el 8 de Abril de 2018, de http://www.saludcapital.gov.co/CTDLab/Publicaciones/2016/Virus_Leucosis_Bovina_en_Cancer_de_Mama.pdf

- INGENASA. (2017). *INGENASA*. Recuperado el 31 de Octubre de 2017, de <http://www.ingenasa.eu/index.php?enf=Leucosis%20Enzootica%20Bovina&esp=Rumiantes>
- Kahrs, R. (1987). *Enfermedades víricas del ganado vacuno*. Zaragoza, España: ACRIBA.
- Mendoza, A. (s.f.). Recuperado el 22 de Mayo de 2018, de http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/costos_hato.htm
- OIE. (2008). *Manual Terrestre de la OIE*. Recuperado el 31 de Octubre de 2017, de http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.10_Leucosis_bovina_enzootica.pdf
- OIE. (2017). *OIE*. Recuperado el 1 de abril de 2018, de OIE: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Disease_distributionmap/index/newlang/es?header_disease_type_hidden=0&header_disease_id_hidden=0&header_selected_disease_name_hidden=0&header_disease_type=0&header_disease_id_terrestrial=35&hea
- OIE. (Octubre de 2017). *Organización Mundial de Sanidad Animal*. Recuperado el 23 de Octubre de 2017, de <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2017/>
- Pallarez, M. (2017). Recuperado el 19 de Mayo de 2018, de <http://www.contextoganadero.com/reportaje/recomendaciones-para-contar-con-un-inventario-ideal>
- Pérez, E., Holmann, F., Schuetz, P., & Fajardo, E. (2006). Recuperado el 22 de Mayo de 2018, de ESTRUCTURA DE COSTOS Y ESTRUCTURA DEL HATO
- Pineda Vásquez, M. d., & Romero Avalos, R. J. (2014). *Udla*. Recuperado el 29 de Octubre de 2017, de <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/2923/8/UDLA-EC-TMVZ-2014-02.pdf>
- Puentes, R. (2015). *ResearchGate*. Recuperado el 22 de abril de 2018, de https://www.researchgate.net/publication/300088456_Virus_de_la_Leucosis_bovina_Una_amenaza_silenciosa_en_la_respuesta_inmune_en_bovinos
- Rama, G. (2009). Recuperado el 17 de Mayo de 2018, de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/123456789/1490/1/uy24-14427.pdf>
- Serrano, G. (2014). Recuperado el 22 de Mayo de 2018, de <https://vacasyalgomas.wordpress.com/2014/09/15/dinamica-poblacional-del-hato-bovino/>

Toma, B., Eloit, M., & Savey, M. (2009). *OIE*. Recuperado el 31 de Octubre de 2017, de <http://www.oie.int/doc/ged/D9426.PDF>

Vacuno de élite. (2016). *Vacuno de élite*. Recuperado el 18 de Abril de 2018, de <http://www.vacunodeelite.es/el-censo-de-ganado-vacuno-de-estados-unidos-crecio-un-2-en-2016/>

Vásconez-Hernández, A., Sandoval-Valencia, P., Puga-Torres, B., & De La Cueva-Jácome, F. (2017). *Universidad Politécnica Saieciana*. Recuperado el 17 de Mayo de 2018, de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/14690/1/Seroprevalencia%20de%20leucosis%20enzootica%20bovina%20en%20animales.pdf>

ANEXOS

Anexo 1: Examen Clínico

a) Objetivo:

Realizar diagnóstico clínico a todos los animales del hato mediante la aplicación de un Examen Clínico General

b) Procedimiento

1. Realizar la sujeción de los animales dentro de la manga con nudos de fácil liberación en la cabeza y patas.
2. Realizar la obtención de datos de los animales: tipo y frecuencia de alimentación, vacunas administradas, como se administran las vacunas, suplementos nutricionales administrados, frecuencia de desparasitaciones.
3. Tomar constantes fisiológicas de los animales:
 - 3.1. Temperatura: utilizar un termómetro digital vía rectal. Desinfectar el termómetro en cada animal con alcohol antes de introducirlo por el recto. La temperatura normal va de 38,6 - 39,1°.
 - 3.2. Sonidos ruminales: realizar percusión y auscultación del lado izquierdo del animal para descartar sonido timpánico. Para escuchar las contracciones ruminales, colocar el fonendoscopio en la fosa paralumbar izquierda, las contracciones normales deberán ser de 1-3 por minuto
 - 3.3. Frecuencia cardíaca: posicionar el fonendoscopio por debajo del codo izquierdo a la altura del sexto espacio intercostal. La frecuencia cardíaca normal va de 60 - 80 ppm.
 - 3.4. Frecuencia respiratoria: posicionar el fonendoscopio en el borde caudal de la onceava costilla, o a su vez observar los movimientos del tórax en cada respiración. La frecuencia respiratoria normal es de 12 - 36 rpm.
 - 3.5. Tiempo de llenado capilar: revisar las encías del animal, haciendo una ligera presión sobre estas para observar

cuanto se demoran en retomar el color normal. El tiempo normal debe ser menor a 2 segundos.

- 3.6. Color de mucosas: observar mucosas de conjuntiva, vulva, boca, las cuales deben tener un color rosa pálido.
4. Realizar un examen físico completo de los animales, desde la cabeza hasta extremidades.
 - 4.1. Realizar una palpación del cráneo, columna y extremidades.
 - 4.2. Hacer caminar al animal en una superficie plana y limpia para determinar grados de cojera del animal, utilizando una escala de los 5 grados de dolor.
 - 4.3. Verificar condición corporal del animal para esto se va a utilizar la escala de 5 puntos.
5. Levantar de registros a partir de la información recolectada en el examen clínico.
6. A los registros se les sacará copias dejando el original al productor y la copia a la estudiante.

c) Consideraciones generales

Tener cuidado al momento de la sujeción de los animales para tratar de no alterar las constantes fisiológicas.

Realizar los nudos de manera adecuada para la protección de la persona encargada del examen clínico.

d) Registros

REGISTRO DE DIAGNÓSTICOS CLÍNICO

IDENTIFICACIÓN		Tarjeta Número:
Nombre/Número:	Fecha de Nacimiento/Edad:	Número de Registro:
Raza:	Sexo:	
Categoría:		

INFORMACIÓN

Alimentación:	
Suplementos:	
Vacunas:	
Desparasitaciones:	

EXAMEN CLÍNICO / FÍSICO

<u>TC</u>	<u>Sonidos ruminales</u>	FC	FR	<u>TIC</u>	Mucosas

Cabeza	Cuerpo	Extremidades	Locomoción	CC

OBSERVACIONES

e) Materiales

MATERIAL	CANTIDAD
Fonendoscopio	5 unidades
Termómetro	5 unidades
Nariguera	1 unidad
Cuerdas	10 unidades
Fichas clínicas	100 unidades
Esfero	5 unidades
Guantes de manejo	1 caja de 100 unidades
Cinta bovinométrica	1 unidad
Manga	1 unidad

f) Responsable: estudiante y vaquero

Anexo 2: Toma de muestra sanguínea

a) Objetivo: Realizar extracción de sangre de los bovinos a partir de vena coccígea

b) Procedimiento

1. Sujetar a los animales en la manga.
2. Rotular el tubo.
3. Un ayudante debe levantar la cola del animal, desde la base, con suavidad hasta colocarla casi vertical
4. Retirar el material fecal de la zona, luego limpiarla con papel
5. Localizar la vena mediante palpación en el espacio intervertebral en el tercio medio de la cola.
6. Realizar una antisepsia con las torundas
7. Insertar el equipo vacutainer en el espacio intervertebral, en el tercio medio de la cola, en ángulo recto, hasta que la sangre empiece a brotar.
8. Colocar el tubo tapa lila para la recolección de sangre hasta que se llene el tubo, para la obtención del suero.
9. Retirar la aguja y realizar hemostasia sobre la zona de punción
10. Desechar las agujas en un guardián o botella vacía
11. Colocar el tubo tapa lila en una gradilla y dejar reposar la muestra para ser transportadas.
12. Al terminar con todos los animales colocar las muestras en un cooler con geles refrigerantes
13. Las muestras serán transportadas desde Pedro Vicente hasta Quito para su análisis.

c) Consideraciones generales

El animal debe estar bien sujeto para la protección de las personas que realizaran este trabajo.

Guantes de manejo	1 caja de 100 unidades
Torundas con alcohol	100 unidades
Gradillas	1 unidad
Nariguera	1 unidad
Cuerdas	3 unidades
Marcador permanente	2 unidades
Papel	1 rollo
Guardián o botella vacía	1 unidad
Centrífuga de 5000 rpm	1 unidad
Micropipeta	1 unidad
Puntas de pipetas	100 unidades
Tubos de eppendorf	100 unidades

f) Responsable: estudiante y vaquero

Anexo 3: Procesamiento de muestras en laboratorio

- a) Objetivo: Realizar el procesamiento las muestras y análisis de los resultados.
- b) Procedimiento
1. Centrifugar 1 ml de cada muestra a 5000rpm durante 10 minutos.
 2. Preparar una placa de 96 pocillos conteniendo muestras y controles
 3. Transferir la placa con muestras y controles a la microplaca ELISA con una pipeta multicanal
 4. Es necesario equilibrar la Solución de lavado concentrada (20X) a temperatura ambiente ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) y agitar correctamente para disolver los cristales.
 5. Preparar la Solución de lavado (1X) diluyendo 1:20 la solución de lavado (20X) en agua destilada/desionizada.
 6. Colocar todos los reactivos a temperatura ambiente ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) antes de ser utilizados y homogenizarlos por vortex o por inversión.
 7. Incubación corta (Suero individual o mezcla). Añadir:
 - 80 μl del Diluyente 2 en cada pocillo.
 - 20 μl del Control positivo a los pocillos A1 y B1.
 - 20 μl del Control negativo a los pocillos C1 y D1.
 - 20 μl de cada muestra a analizar en los pocillos restantes.
 - 7.1. Incubar 45 min (± 4 min) a 21°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$).
 8. Incubación nocturna (Suero individual o mezcla). Añadir:
 - 190 μl de Diluyente 2 en cada pocillo.
 - 10 μl del Control positivo a los pocillos A1 y B1.
 - 10 μl del Control negativo a los pocillos B1 y C1.
 - 10 μl de cada muestra a analizar en los pocillos restantes.
 - 8.1. Incubar entre 16 y 20 horas a 4°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$).
 9. Preparar el Conjugado 1X diluyendo el Conjugado concentrado (10X) a 1:10 con el Diluyente 2.

10. Vaciar los pocillos. Lavar cada pocillo 3 veces con aprox. 300 µl de Solución de lavado. Evitar el desecado de los pocillos durante los lavados.
11. Añadir 100 µl del Conjugado 1X a cada pocillo.
12. Incubar 30 min (± 3 min) a 21°C (± 5°C).
13. Vaciar los pocillos. Lavar cada pocillo 3* veces con aprox. 300 µl de Solución de lavado. Evitar el desecado de los pocillos durante los lavados.
14. Añadir 100 µl de la solución de revelación a cada pocillo.
15. Incubar 15 min (± 2 min) a 21°C (± 5°C) en la oscuridad.
16. Añadir 100 µl de la Solución de parada a cada pocillo para detener la reacción.
17. Leer y guardar la DO a 450 nm.

c) Consideraciones generales

Todos los reactivos del kit deben ser almacenados en refrigeración entre 2 - 8°C

Evitar cualquier tipo de contaminación de los reactivos

Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar

Prepara el volumen necesario de conjugado ya que la solución sobrante ha de ser desechada

d) Lectura e Interpretación de los Resultados

Para cada muestra, calcular el porcentaje de competición

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

Las muestras que presentan un S/N%:

- Inferior o igual a 50 % son consideradas positivas.
- Superior a 50 % e inferior a 60 % son consideradas dudosas.
- Superior o igual a 60 % son consideradas negativas.

Resultado	ESTATUS
$S/N \% \leq 50\%$	POSITIVO
$50\% < S/N\% < 60\%$	DUDOSO
$S/N \% \geq 60 \%$	NEGATIVO

e) Materiales

MATERIAL	CANTIDAD
ID Screen® BLV Competition	1 unidad
Guantes	1 par
Mascarilla	1 unidad
Micropipeta	1 unidad
Puntas de pipetas	100 unidades
Tubos de eppendorfs	100 unidades
Lector de Elisa	1 unidad

f) Responsable: estudiante

Anexo 4: Check List de Factores de Riesgo

CHECK LIST FACTORES DE RIESGO

Fecha: 6 Mayo 2018

El predio realiza las siguientes actividades:

Conoce la existencia de LBE	X
Monta directa	✓
Uso de una sola aguja para vacunaciones y desparasitaciones	X
Uso de guantes de palpación en varios animales	X
Cirugías en masa sin desinfectar el instrumental	X
Descornes en masa sin desinfectar el instrumental	X
Ingreso de animales de manera continua y sin registros sanitarios	X
Ingreso de animales de manera esporádica y sin registros sanitarios	✓

Anexo 5: Análisis e interpretación de resultados

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	CN	5	13	21	29	37	45	53	39
B	CN	6	14	22	30	38	46	54	40
C	CP	7	15	23	31	39	47	55	12
D	CP	8	16	24	32	40	48	56	26
E	1	9	17	25	33	41	49	57	1
F	2	10	18	26	34	42	50	CN	46
G	3	11	19	27	35	43	51	CP	35
H	4	12	20	28	36	44	52	CC	57

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	1,731	1,575	1,785	1,614	1,657	1,581	1,859	1,783	1,792
B	1,734	1,569	1,693	1,432	1,755	1,712	1,641	1,783	1,830
C	0,252	1,638	1,674	1,704	1,530	1,726	1,788	1,736	1,700
D	0,265	1,530	1,622	1,712	1,797	1,746	1,671	1,641	1,555
E	1,701	1,532	1,582	1,809	1,625	1,710	1,625	1,793	1,681
F	1,652	1,683	1,635	1,570	1,773	1,709	1,699	1,684	1,605
G	1,766	1,616	0,244	1,666	1,845	1,762	1,553	0,268	1,724
H	1,829	1,696	1,785	1,860	1,797	1,768	1,759	1,730	1,685

El test es válido si:

El valor medio de la densidad óptica de los Controles Positivos (DO_{CP}) es inferior a 30% de la DO_{CN}.

$$\text{Validación CP} = \frac{0,252 + 0,265}{2} = 0,2585$$

$$\text{Validación CN} = \frac{1,731 + 1,734}{2} = 1,7325$$

$$\text{Validación} = \frac{0,2585}{1,7325} = 0,15$$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	99,91	90,91	103,03	93,16	95,64	91,26	107,30	102,91	103,43
B	100,09	90,56	97,72	82,66	101,30	98,82	94,72	102,91	105,63
C	14,55	94,55	96,62	98,35	88,31	99,62	103,20	100,20	98,12
D	15,30	88,31	93,62	98,82	103,72	100,78	96,45	94,72	89,75
E	98,18	88,43	91,31	104,42	93,80	98,70	93,80	103,49	97,03
F	95,35	97,14	94,37	90,62	102,34	98,64	98,07	97,20	92,64
G	101,93	93,28	14,08	96,16	106,49	101,70	89,64	15,47	99,51
H	105,57	97,89	103,03	107,36	103,72	102,05	101,53	99,86	97,26

