

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN-LEÓN

ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS Y VETERINARIAS



TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

Tema

**Comportamiento epidemiológico de la brucelosis bovina en una explotación
endémica, febrero–abril, 2018.**

Autor: Br. María Alejandra Jirón Real.

Tutores: PhD. Jessica Sheleby Elías

PhD. Byron José Flores Somarriba

2019

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”



DEDICATORIA

A **Dios** por ser el pilar más importante en mi vida, por estar conmigo en los momentos más difíciles; Por ser mi padre y el protagonista de mi vida te dedico mi trabajo y todos los logros de mi vida, te amo Dios mío.

A mi papá **Benito Ramón Jirón Munguía**, ya que es la motivación en mi vida encaminada al éxito, en mi mente y corazón fuiste y serás el ingrediente perfecto para alcanzar mis metas. Gracias maestro, y amigo por educarme y enseñarme a ser mejor cada día, a no rendirme, a seguir adelante sin importar los obstáculos; A usted que se preocupó por mí en cada momento y que siempre quiso lo mejor para mí le dedico todas mis metas y proyectos.

A mi mamá **Rene Lucia Real Lechado**, ya que siempre ha sido luz, esperanza y alegría en mi vida.

A mi tío **Carlos Alberto Real Lechado** por guiarme en el camino de la vida, por aconsejarme y hacerme ver que Dios en las pruebas más difíciles nunca nos abandona.

A **Denis Alfonso Membreño Agüero** y a mi sobrina **Elizabeth Sofía Jirón García**, a los cuales llevo dentro de mi corazón.



AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por brindarme fuerzas, serenidad, paciencia, tranquilidad y paz, por quitar la tristeza en mi vida y ayudarme a culminar mi carrera.

A **mis padres** por apoyarme hasta el final. Gracias papá por regalarme los mejores años de tu vida dedicados a mí cada día, hasta el cielo infinitas gracias.

A **mis tutores PhD. Byron José Flores Somarriba y PhD. Jessica Sheleby Elías**, por ayudarme en todo el proceso de la realización de mi tesis, gracias por brindarme parte de su tiempo, paciencia y transmitirme sus conocimientos que son de gran valor.

A **el Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI)** por permitirme realizar mis prácticas y mi tesis disponiendo de los Laboratorios en el periodo de estudio.

A **mis compañeros y amigos** por todos los consejos y palabras de aliento que me ayudaron a seguir adelante. Gracias a las nuevas amistades que hice durante el desarrollo de mi tesis y que me apoyaron de una u otra forma como **Brismania Desiré Soto** a la cual estimo mucho.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	6
2. ANTECEDENTES	8
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
4. OBJETIVOS	11
4.1 Objetivo general.....	11
4.2 Objetivo específico	11
5. MARCO TEÓRICO	12
5.1 Sinonimia.....	12
5.2 Etiología.....	12
5.3 Epidemiología.....	13
5.3.1 Transmisión	13
5.3.2 Distribución geográfica	13
5.3.3 Periodo de incubación	14
5.3.4 Inmunidad.....	14
5.4 Patogenia.....	14
5.5 Cuadro clínico	15
5.6 Diagnóstico.....	16
5.6.1 Diagnóstico diferencial.....	16
5.6.2 Diagnóstico directo.....	16
5.6.3 Cultivo	17
5.6.4 Diagnóstico molecular	18
5.6.5 Prueba de aglutinación lenta (SAT).....	18
5.6.6 Pruebas de antígeno de <i>Brucella</i> tamponadas	19
5.7 Prueba confirmatoria de Rivanol	19
5.7.1 Prueba de fijación del complemento.....	19
5.7.2 ELISA	19
5.7.3 Ensayo de polarización de la fluorescencia	20
5.7.4 Prueba de anillo de leche	20
5.7.5 Ensayos ELISA y polarización por fluorescencia.....	20
5.8 Tratamiento.....	21
5.9 Prevención	21
5.10 Control y profilaxis	21



6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Tipo de estudio	23
6.2 Área de estudio	23
6.3 Población de estudio	23
6.4 Tamaño de la muestra	23
6.5 Selección de muestras	23
6.6 Toma y envío de muestras	23
6.6.1 Muestras de Sangre	23
6.6.2 Muestras de semen	23
6.7 Procesamiento de las muestras	24
6.7.1 Serología	24
6.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	24
6.8 Análisis estadístico	25
7. Resultados	27
8. DISCUSIÓN	28
9. CONCLUSIONES	31
10. RECOMENDACIONES	32
11. BIBLIOGRAFIA	33
12. ANEXOS	44



1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

La brucelosis es una zoonosis extendida a nivel mundial con impacto para la salud pública (1). Es una enfermedad infecciosa bacteriana que afecta a una amplia gama de mamíferos, causada por especies del género *Brucella*, que causa infertilidad, partos prematuros y abortos en animales. Esta zoonosis bacteriana representa una carga económica importante para las industrias pecuarias, debido a que no se ha abordado adecuadamente a nivel nacional. En el 2014, la OMS la considera una de las "zoonosis desatendida", lo que constituye una carga importante para las comunidades rurales pobres (2,3)

Nicaragua es un país eminentemente agropecuario, su economía en este sector se basa principalmente en la explotación del campo y la ganadería, representando un porcentaje significativo en la economía del país (4). Por lo tanto, se requiere fomentar su desarrollo, protegiéndola de las enfermedades infecciosas que la afectan, como es el caso de la brucelosis bovina, que además representa una amenaza a la salud pública (5).

Según el acuerdo ministerial No. 008-2009, en Nicaragua el Programa Nacional para el Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina, ordena el sacrificio de los animales reactivos con el fin de no propagar más la enfermedad, además en su artículo 25 mandata que "Cuando se detecten animales positivos (reactivos), realizar una nueva toma de sangre a los animales restantes de la finca, en un tiempo no menor de 30 días ni mayor a 60 después de efectuada la prueba anterior". Los animales diagnosticados con brucelosis, propiciarán el inicio de una investigación epidemiológica exhaustiva(6).

Las pruebas serológicas detectan anticuerpos y proporcionan una evidencia indirecta de la infección cuando son efectuadas en forma uniforme y se interpretan con criterio epidemiológico, de esta forma se obtendría un instrumento práctico para el diagnóstico de la brucelosis bovina. El diagnóstico molecular por medio de la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) presenta una alta sensibilidad en la detección del DNA bacteriano proporcionando un diagnóstico directo (7).



En el presente estudio abordaremos el comportamiento epidemiológico de brucelosis bovina de una finca endémica. Los datos serán útiles para evaluar un protocolo de muestreo en circunstancias endémicas, que podría presentar variaciones respecto a lo propuesto para una vigilancia nacional.



2. ANTECEDENTES

En diversos países se han realizado estudios de la brucelosis bovina en donde la enfermedad ha sido de interés debido a su comportamiento epidemiológico siendo un problema para las diferentes zonas en donde está presente la enfermedad.

En Lima, Perú; Padilla y colaboradores en el año 2003 realizaron un estudio de estandarización de una prueba de PCR en búsqueda de *Brucella* spp. En el cual para determinar la sensibilidad de la prueba utilizaron 8 cepas peruanas de *Brucella* spp y para determinar su especificidad utilizaron otras cepas peruanas de las especies *E. Coli*, *Shigella*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii* y *Vibrio cholerae*. En los resultados se observó que la sensibilidad analítica de la prueba fue alta, logrando detectar 80 femtogramos de ADN de *Brucella* spp purificado. Todas las cepas peruanas de *Brucella* spp, fueron detectadas por la prueba. Además, la prueba fue negativa para cepas peruanas de otras especies bacterianas (8).

En año 2015 en Ecuador, Llaguno realizó un estudio para evaluar la presencia de brucelosis en vacas (2 a 6 años) en tres haciendas con un total de 303 animales, mediante CAR TEST, logrando determinar como resultado la presencia de brucelosis en vacas de 2 a 6 años en la población seleccionada obteniendo un 3% de vacas positivas al antígeno (9).

En la provincia de Cañar, en el año 2009, Agurto y Fernández realizaron una investigación en 140 bovinos en edades reproductivas, 6 hembras y 1 macho por cada comunidad en un total de 20 comunidades, a las cuales se les realizó la prueba de Rosa de Bengala (RB) y ELISA de competencia (cELISA); obteniendo como resultado 3 casos positivos de 140 animales (prevalencia de 0.021%) de estos, 2 fueron de raza mestiza y 1 de la raza normando, todos bajo el sistema de reproducción de monta natural(10).

En Ecuador, provincia Pastaza año 2011, Pozo y Noroña en la Asociación de productores agropecuarios (Unión libre), realizaron un estudio para determinar brucelosis bovina mediante la prueba de Rosa de Bengala en 375 bovinos, repartidos en 17 fincas, obteniendo como resultado ningún caso positivo a



Brucelosis bovina. El pre-diagnóstico mediante encuestas demostró que los animales padecían diferentes irregularidades reproductivas concluyendo que los diferentes síntomas presentados en las encuestas eran debido a otras patologías (11).

En la región central de Ecuador en el año 2011 Cevallos y colaboradores compararon las técnicas de PCR y Rosa de Bengala en la detección de *Brucella* spp. Se utilizaron 40 muestras de sangre de cuatro hatos con alta prevalencia de brucelosis en la región. Obteniendo como resultado que el 35% de los animales fueron positivo para el análisis con Rosa de Bengala, mientras que con PCR simple fue del 45% con una correlación del 30% lo que sugiere que la PCR frente a la RB es 22% más sensible (7).

En Nicaragua en el año 2004 el MAGFOR realizó un estudio epidemiológico en el cual se tomó una muestra de 7,000 animales obteniendo como resultado una prevalencia del 0.12% de brucelosis, llegando a la conclusión que Nicaragua es el país con menor prevalencia de la enfermedad en Centro América (Boletín epidemiológico del MAGFOR).



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cómo es el comportamiento epidemiológico de la brucelosis bovina en una finca endémica?



4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Conocer el comportamiento epidemiológico de la brucelosis bovina en una explotación endémica.

4.2 Objetivo específico

- Determinar la incidencia mensual de brucelosis bovina en una finca endémica.
- Evaluar la utilidad de la prueba Rosa de Bengala en muestras de sangre y PCR en muestras de semen para el diagnóstico de la brucelosis bovina en una finca endémica.
- Contrastar el tiempo requerido para la seroconversión y lo propuesto en el programa de la erradicación de la brucelosis.



5. MARCO TEÓRICO

5.1 Sinonimia

Enfermedad de Bang, Fiebre de Malta, Fiebre Mediterránea, Fiebre Ondulante.

5.2 Etiología

La brucelosis bovina es una enfermedad causada por la bacteria *Brucella abortus* denominada por su morfología un cocobacilo Gram negativo inmóvil (12), o bastoncillos cortos de bordes rectos o ligeramente convexos y de extremos redondeados, de 0,5 - 0,7 μ m de ancho por 0,6 - 1,5 μ m de largo, estos se presentan individualmente, a veces en pares, cadenas cortas o pequeños racimos. No producen cápsulas, esporas ni flagelos. No suelen presentar coloración bipolar ni son acidorresistentes, aunque pueden resistir a la decoloración por ácidos débiles o por los álcalis (13).

La *Brucella* es aerobia pero algunas cepas requieren de 5 a 10% de dióxido de carbono, es catalasa y oxidasa positiva, intracelular facultativo, es decir, tiene la capacidad de establecer una infección estable en el huésped a pesar de las necesidades de crecimiento complejas (14).

Brucella abortus no puede desarrollarse bien en la luz solar, sequedad y calor, en leche infectada se destruye cuando se calienta a 161° F durante 15 segundos en un aparato que simula el proceso de pasteurización de alta temperatura en tiempo corto. También se destruye en todas las combinaciones de tiempo y temperatura hasta 149° F 5 segundos (15).

En bovinos *Brucella abortus* es el agente más frecuente, causante de brucelosis bovina seguido de *B. melitensis* y *B. suis* que podrían afectar a bovinos si estos habitaran juntos(16). Además de estas especies clásicas se encuentran *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* y varias especies asignadas como *B. pinnipedialis* y *B. ceti* aislados de mamíferos marinos (17,18); *B. inopinata* aislada de un implante mamario (19), *B. microti* aislado de roedores salvajes (20,21) y *B. papionis* aislados de babuinos (22), estos nuevos aislamientos indican que el rango de hospedador está incrementando.



La Brucelosis bovina se caracteriza por presentarse en animales sexualmente maduros, afectando el trato reproductor de hembras (partos prematuros, abortos, retención de placenta, infecciones uterinas), en toros provocando orquitis y alteraciones en la fertilidad y fecundidad como secuela de la infección (23).

5.3 Epidemiología

5.3.1 Transmisión

La principal vía de entrada de la *Brucella* es la oral, por medio de la ingestión de alimentos o agua contaminada por secreciones o restos de abortos de vacas infectadas expulsando líquidos cargados de bacterias siendo fuente de contaminación, o bien por el lamido de las secreciones vaginales, los genitales, y los becerros recién nacidos de vacas infectadas. La vía venérea no suele ser de importancia epidemiológica en la transmisión de la enfermedad, pero si el semen infectado y utilizado en la inseminación artificial (24).

La brucelosis bovina también puede transmitirse a animales y a personas a través de heridas en la piel o de las mucosas, consumo de leche no pasteurizada procedente de animales infectados. La brucelosis es una enfermedad importante en la fauna salvaje afectando al cerdo salvaje, bisonte, alce y la liebre europea (25).

5.3.2 Distribución geográfica

Determinar la prevalencia de la brucelosis bovina en algunos países es difícil debido a que no se notifica la enfermedad pero se ha observado que en algunas regiones como Asia, América Latina (México) en especial América central y América del sur (Argentina, Perú) se encuentran prevalentes a la enfermedad acompañado de pérdidas económicas directas que ocasionan restricciones comerciales tanto de animales como productos.

En el 2008, 12 países de la Unión Europea incluyendo Japón, Australia, Nueva Zelanda fueron declarados oficialmente libres de brucelosis bovina (26).

En los Estados Unidos casi todos los estados están clasificados como libres de brucelosis bovina, sin embargo, la enfermedad persiste en algunos animales



salvajes de la zona. Desde 2007 hasta la fecha, se han detectado rebaños bovinos infectados por brucelosis en Montana, e Idaho (22).

5.3.3 Periodo de incubación

El período de incubación es variable, puede presentarse en un rango de 10 días a 7 meses, en el síndrome de terneras con latencia el periodo puede ser mayor a un año. El periodo de incubación, desde la infección hasta la aparición de anticuerpos dura varias semanas y va a depender del hospedero, la carga bacteriana y el estadio de la gestación; En las hembras preñadas ocurren abortos en la segunda mitad de la gestación por lo cual el periodo de incubación es más prolongado cuando los animales se infectan en etapas tempranas de la gestación. Luego del periodo de incubación, la infección puede evolucionar de diferentes formas clínicas (asintomática o subclínica) (28).

5.3.4 Inmunidad

Fagocitosis del microorganismo por células polimorfonucleares y macrófagos activados, mediada por anticuerpos específicos y mecanismos de mediación celular. En la fase inicial de la infección los anticuerpos son de tipo IgM y posteriormente IgG e IgA.

5.4 Patogenia

Brucella abortus consigue entrar en las vacas a través de las mucosas de la cavidad oral, cavidad nasal, conjuntiva o a través de la piel agrietada. Una vez ocurre la penetración de las mucosas, el organismo busca los ganglios linfáticos regionales y en ellos se multiplica antes de ocasionar bacteriemia.

Si las *Brucellas* se escapan de la localización ganglionar, pasan al torrente sanguíneo en un proceso de fagocitosis protagonizado por leucocitos, neutrófilos, monocitos y macrófagos. Durante esta fase se comportan como bacterias intracelulares facultativas, caracterizadas por sobrevivir largos periodos de tiempo en el interior de dichas células, y estar protegidas de los anticuerpos humorales y de los mecanismos de inmunidad celular.



La circulación de las *Brucellas* por vía hemática provoca persistencia, intermitencia y diseminación hematogena de las bacterias por todo el organismo, colonizando de forma acantonada en varios órganos como la glándula mamaria, útero, placenta y ganglios linfáticos regionales y en testículos, epidídimo y glándulas sexuales secundarias de los toros ocasionando alteraciones inflamatorias

Las *Brucellas* tienen un tropismo particular por el útero gestante y la placenta por lo cual las lesiones brucelares son evidentes cuando la gestación se ha implantado. *Brucella abortus* se desarrolla ampliamente en el tejido placentario cuando cuenta con secreciones hormonales, estructuras histológicas y el azúcar eritritol como componente bioquímico afín. El azúcar eritritol alcanza niveles altos en el útero grávido, glándula mamaria y epidídimo de los rumiantes determinando crecimiento y multiplicación brucellar.

A las 72 horas post-infección se pueden encontrar grandes cantidades de *Brucellas* en los trofoblastos corionicos produciendo necrosis de los mismos. En el último tercio de la gestación los niveles de eritritol uterino se incrementan, ocasionando una migración masiva de *Brucellas* hacia el tejido vascular del útero, causando una placentitis y vasculitis placentar. En el útero grávido las *Brucellas* provocan una reacción inflamatoria que origina una placentitis necrótica purulenta con necrobiosis en las vellosidades placentarias formadas por una capa de exudado fibrinoso purulento que relaja la unión de la placenta fetal y materna con pérdida de la garantía del intercambio gaseoso y nutritivo entre ambos tejidos. Esta relación se hace por medio de los cotiledones fetales, los cuales se proyectan dentro en las criptas de las carúnculas carnosas, y al fallar en forma total o parcialmente, entonces el feto siente las deficiencias nutritivas por la perturbación de la circulación fetal y en consecuencia la infección brucelar puede provocar el aborto con expulsión prematura del feto (29–31).

5.5 Cuadro clínico

En las vacas reproductoras el síntoma clínico más importante es el aborto. Los abortos van precedidos, a menudo de partos prematuro, así como síntomas indicativos de un proceso inflamatorio del canal de parto, mucosa vaginal enrojecida



en ocasiones puede presentar nodulitos rojizos y flujo vaginal blanco grisáceo, mucoso o mucopurulento, en casos excepcionales hemorrágico y siempre inodoro (30).

Otros signos incluyen cefalea, diaforesis, astenia, mialgias, retención placentaria cuya consecuencia podría originar metritis e infertilidad, tasas de concepción bajas, disminución en la producción de leche en las vacas, orquitis y epididimitis en los toros, disminución del libido e infertilidad, inflamación de las vesículas, atrofia de los testículos y en ocasiones puede producir poliartritis, tenosinovitis, bursitis y abscesos subcutáneos. Normalmente la infección de la mama no provoca manifestaciones clínicas pronunciadas (32).

5.6 Diagnóstico

5.6.1 Diagnóstico diferencial

Debido al cuadro clínico poco específico se requiere realizar un diagnóstico diferencial con las siguientes entidades nosológicas: tuberculosis, paludismo, hepatitis, leptospirosis, mononucleosis infecciosa, linfoma de Hodgkin, espondiloartropatías, vibriosis, listeriosis, tricomoniasis, rinotraqueítis infecciosa bovina entre otras.

5.6.2 Diagnóstico directo

El aislamiento de *Brucella* spp. constituye el método diagnóstico definitivo. Suele obtenerse por hemocultivo o cultivo de medula ósea y raramente por cultivo de líquido cefalorraquídeo, líquido articular y exudado purulento.

El medio clásico de Ruiz Castañeda, que utiliza una fase sólida y otra líquida es el más apropiado para el diagnóstico. En la mayoría de los casos agudos se puede observar crecimiento de 2-4 días y en algunos se puede presentar el crecimiento entre los 5-15 días. Los cultivos deben mantenerse en incubación en un periodo no menor de 30 días ya que las bacterias del género *Brucella* son de crecimiento lento. Luego del periodo de incubación en medios de agar se forman colonias en la estría primaria con un diámetro de < 1 mm observándose pequeños cocobacilos con resultado de catalasa y oxidasa positivas lo que indica que hay presencia del género *Brucella* (33).



5.6.3 Cultivo

El aislamiento bacteriano siempre es requerido para conocer el biotipo de cepas, para el diagnóstico de brucelosis la elección de las muestras depende de los signos clínicos observados. En el caso de la clínica, las muestras válidas incluyen fetos abortados (estómago, bazo y pulmón), membranas fetales, secreciones vaginales, calostro, leche, espermatozoides y líquido recolectado de artritis o higroma. Para confirmar los casos sospechosos de la brucelosis aguda o crónica, los tejidos preferidos son los ganglios linfáticos genitales, orofaríngeos, bazo, glándula mamaria y los ganglios linfáticos asociados.

Las cepas de *Brucella* pueden identificarse a nivel de especie y biovar mediante fagotipado, cultivos, características bioquímicas y serológicas. La mayoría de las especies de *Brucella* forman colonias en pocos días, aunque las cepas de las focas crecen lentamente y pueden tardar entre 7 y 10 días hasta hacerse visibles sobre los medios selectivos. La morfología de la colonia varía con la especie, las colonias de formas lisas (*B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* y *Brucella* de mamífero marino) son redondas con bordes lisos. Cuando las placas se observan a la luz del día a través de un medio transparente, estas colonias son traslúcidas, vistas desde arriba, son convexas y de tonalidad blanco perla. *B. ovis* y *B. canis* tienen forma rugosa, las colonias son redondas, brillantes, convexas y en ellas puede observarse su naturaleza rugosa al examinarlas con iluminación indirecta. Se debe tener precaución durante su identificación, ya que a veces las cepas de mamíferos marinos inicialmente se identifican erróneamente como cepas terrestres (28).

Para el aislamiento de *Brucella* spp. el medio más utilizado es el medio de Farrell, que contiene antibióticos capaces de inhibir el crecimiento de otras bacterias. Algunas especies de *Brucella*, como *B. abortus* wildtype (biovars 1-4), necesitan CO₂ para crecer, mientras que otros, como *B. abortus* tipo salvaje (biovars 5, 6, 9), *B. abortus* S19 cepa de vacuna, *B. melitensis*, y *B. suis*, no lo necesitan. Para muestras líquidas (leche o sangre), la sensibilidad aumenta con el uso de un medio bifásico como el medio Castañeda, originalmente descrito para utilizarse en hemocultivos a humanos. El crecimiento puede aparecer después 2-3 días, pero los cultivos



generalmente se consideran negativos después de 2-3 semanas de incubación (33,34).

5.6.4 Diagnóstico molecular

Se han desarrollado métodos basados en la PCR. Los mejores métodos validados se basan en la detección de secuencias específicas de *Brucella* spp., como los genes 16S-23S la secuencia de inserción IS711 o el gen bcp31 que codifica una proteína de 31 kDa (35,36).

Estas técnicas fueron desarrolladas originalmente en aislamientos bacterianos y ahora son también utilizadas para detectar *Brucella* spp. (37).

Como norma general, las técnicas de PCR para la detección de brucelosis puede mostrar una menor sensibilidad diagnóstica que los métodos de cultivo, su especificidad se acerca al 100% (37–39). Los mejores resultados se han obtenido hasta ahora combinando el cultivo y detección por PCR en muestras clínicas (37,40).

5.6.5 Prueba de aglutinación lenta (SAT).

El principio de esta prueba es detectar aglutininas anticuerpos principalmente del isotipo IgM dirigidos contra *Brucella* spp. a una concentración óptima de antígeno y anticuerpos se forman grandes complejos y precipitan en la parte inferior del tubo de ensayo. Esta reacción es lenta, a diferencia de la rápida aglutinación.

Para las pruebas, se requiere una incubación a 37°C. Esta técnica también se puede practicar en (prueba de microaglutinación) en un volumen de reacción de 100 µl sin un cambio en el rendimiento. La falta de especificidad y sensibilidad de esta prueba a menudo ha sido presentada como un gran inconveniente. Sin embargo, esta es una prueba estandarizada y extremadamente robusta que ha demostrado buenos resultados y ser eficaz en varios países ahora declarados oficialmente libres de brucelosis (37).

La especificidad de la prueba aumenta con la adición de suero o un agente quelante como el EDTA, que reduce las reacciones cruzadas debido a IgM. Aunque esta prueba ya no se recomienda por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)



para el diagnóstico de brucelosis bovina, todavía es ampliamente utilizado en el diagnóstico de brucelosis humana (33).

5.6.6 Pruebas de antígeno de *Brucella* tamponadas

La Rosa de Bengala (RB) y Las pruebas de aglutinación en placa tamponada (BA) son pruebas de aglutinación rápida, pruebas de 4 minutos de duración sobre una placa de vidrio con la ayuda de un antígeno tampón ácido ($\text{pH } 3.65 \pm 0.05$). Estas pruebas se han introducido en muchos países como la prueba de detección estándar, ya que es muy simple y se piensa que es más sensible que el SAT (38).

5.7 Prueba confirmatoria de Rivanol

La prueba de Rivanol es de tipo cuantitativa y cualitativa la cual consiste en confrontar el suero problema con un colorante de acridina que precipita las inmunoglobulinas de la muestra, principalmente las IgM, quedando en solución solo las IgG, que son las directamente involucradas con la respuesta inmune ante una cepa de campo. Enseguida se realiza de manera similar a la prueba de aglutinación en placa utilizando un antígeno específico, considerando positivos todos aquellos sueros que presenten reacción de aglutinación completa en cualquiera de sus diluciones. En bovinos la prueba de Rivanol ayuda a confirmar el diagnóstico (41).

5.7.1 Prueba de fijación del complemento

La prueba de fijación del complemento (CFT) permite la detección de anticuerpos anti-*Brucella* que son capaces de activar el complemento por medio de inmunoglobulinas de ganado (Ig) como las IgG y la IgM. Según algunos estudios, esta prueba no es altamente sensible, pero muestra una excelente especificidad ya que la prueba es difícil de estandarizar, siendo reemplazados por ELISAs(37,40)

5.7.2 ELISA

Las pruebas de ELISA se dividen en dos categorías, ELISA indirecta (iELISAs) y el ELISA competitivo (cELISAs). La mayoría de los iELISAs detectan principalmente las subclases de IgG la principal cualidad es su alta sensibilidad, pero también son más vulnerables a reacciones no específicas. Estas reacciones cruzadas observadas en iELISAs motivaron el desarrollo de los cELISAs en el que se emplea un anticuerpo monoclonal que reconoce el epítipo o del LPS-S que compite con los



anticuerpos del suero por la unión al antígeno fijado en la placa. Por lo tanto, mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos específicos de la *Brucella*, el desarrollo de cELISAs ha hecho posible que estas pruebas sean más específicas pero menos sensibles que los iELISAs (42,43).

5.7.3 Ensayo de polarización de la fluorescencia

Durante el examen, las muestras de suero se incuban con un antígeno específico de *B. abortus* marcado con fluoresceína isotiocianato. En presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp. Se forman grandes complejos fluorescentes, estas moléculas pequeñas giran más rápido por lo tanto causan mayor despolarización de la luz esto indica que las muestras son positivas para *Brucella*.spp. a diferencia de las muestras negativas en las cuales no ocurre esa reacción. Esta prueba se puede automatizar fácilmente y es muy rápida, ya que después de mezclar el antígeno marcado y el suero, la lectura es casi instantánea. La sensibilidad de la prueba parece ligeramente más baja que la de los iELISAs (44), la especificidad varía entre 98.8 y 99.0%. Esta prueba ya se utiliza en programas de control de la brucelosis y certificación en América del Norte y en Europa (45).

5.7.4 Prueba de anillo de leche

los anticuerpos brucelares contenidos en la muestra, reaccionan con el antígeno coloreado de *Brucella* formando con él un complejo antígeno-anticuerpo que se adhiere a los glóbulos de grasa de la leche que, por su menor densidad ascienden a la superficie del tubo formando una capa de crema a manera de un anillo que se colorea de morado (hematoxilina del antígeno) que por su intensidad varían en matices; Desde un morado intenso (positivo) a un blanco cremoso (negativo), el cual es indicativo de que la muestra no contiene aglutininas específicas por lo tanto el antígeno no aglutina permaneciendo la columna de leche uniformemente coloreada de lila (46)

5.7.5 Ensayos ELISA y polarización por fluorescencia

Estas dos pruebas, discutidas anteriormente en el contexto de muestras de suero, también se pueden aplicar a muestras de leche para detectar animales infectados. Estas pruebas son menos sensibles cuando se aplican a la leche que a muestras



de suero antes que puedan ser utilizados en la leche del tanque, que puede provenir de cientos de vacas, su sensibilidad debe comprobarse primero en grupos de muestras. Esta menor sensibilidad en el caso de la leche de tanque puede a menudo ser compensado incrementando la frecuencia de la prueba. Estas pruebas son prescritas por la OIE para probar la leche de bovinos y pequeños rumiantes (47).

5.8 Tratamiento

Según el acuerdo ministerial 008-2009 el programa de control y erradicación de la brucelosis ordenará que los animales positivos o reactores serán marcados y sacrificados en un matadero con la debida inspección de un veterinario oficial en un periodo no mayor a 8 días después de haber realizado la prueba (6).

5.9 Prevención

Para prevenir brucelosis bovina en un área ganadera se deben seguir métodos de prevención como lo es asegurarse antes de comprar animales, estos deben tener previamente un diagnóstico de brucelosis bovina negativo y sin antecedentes de enfermedad. Mantener en cuarentena a los animales nuevos, brindar educación sanitaria a la población para hacerle consciente de los factores de riesgo y las medidas preventivas de esta enfermedad. Tener conocimiento sanitario de los linderos y la zona de donde proviene el animal a comprar, tener en cuenta si hubo o no vacunación, investigar los diferentes problemas reproductivos que pudieron haberse presentado en la historia clínica del animal, analizar las muestras de abortos, manejo e higiene especialmente al momento del parto, categorías de hembras servidas separadas del resto, conocer el manejo sanitario de efluentes y desinfección periódica (48).

5.10 Control y profilaxis

Las vacunas *Brucella abortus* desempeñan un papel importante en programas de control y erradicación de la brucelosis bovina y se han utilizado con éxito en todo el mundo durante mucho tiempo. Strain 19 y RB51 son las cepas de vacunas aprobadas de *B. abortus* que se usan más comúnmente para proteger al ganado contra infecciones y abortos. Sin embargo, debido a algunos inconvenientes que muestran estas vacunas, se ha realizado un gran esfuerzo para el desarrollo de



nuevas vacunas, más seguras y más efectivas, que también podrían usarse en otras especies de animales susceptibles (49)

La vigilancia con fines de detección puede pasar por la realización sistemática de pruebas serológicas y de análisis de la leche, con técnicas como la prueba del anillo en leche. Estas medidas de vigilancia pueden resultar de gran ayuda en las campañas para eliminar la enfermedad (50).



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio longitudinal, dando seguimientos por 3 meses a los animales en la finca, realizando el análisis de las muestras a solicitud del propietario para identificar nuevos animales reactivos durante el período de estudio.

6.2 Área de estudio

La procedencia de las muestras ingresadas en el laboratorio corresponde a una finca con casos positivos a brucelosis bovina en el período de febrero-abril del año 2018, por consideraciones éticas se omite la dirección y el nombre de la finca.

6.3 Población de estudio

Todos los animales de la finca (bovinos y equinos).

6.4 Tamaño de la muestra

Se incluyeron en el estudio 309 animales, de estos, 292 bovinos y 17 equinos muestreados de 2-4 veces para un total de 1267 muestras, de las cuales 1,267 fueron muestras de sangre para serología y 12 muestras de semen para PCR durante el estudio.

6.5 Selección de muestras

La realizó un muestreo no probabilístico, ya que se realizaron los análisis a solicitud del propietario.

6.6 Toma y envío de muestras

6.6.1 Muestras de Sangre

Se tomaron 3 ml de sangre por medio de la extracción de la vena coccígea o de la vena yugular, fueron depositadas en tubos de ensayo sin anticoagulante marcados con el código de cada animal correspondiente. Se esperó por 15 minutos antes de transportarlas, esto para permitir una coagulación completa y evitar la hemólisis.

6.6.2 Muestras de semen

Para la toma de muestras de semen se utilizó el método de la electroeyaculación que consiste en un electrodo conectado a una batería que genera estimulaciones rítmicas provocadas por descargas no mayores a 20 voltios.



El electroeyaculador está diseñado para estimular los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos con impulsos de bajo voltaje y amperaje, de esta forma pueden inducir erección peneana y eyaculación.

6.7 Procesamiento de las muestras

6.7.1 Serología

Las muestras de sangre fueron registradas en el la base de datos del laboratorio. Se procedió a desfibrinar la sangre en las paredes de los tubos de ensayo para permitir una mejor separación del suero, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos, el suero sobrenadante se colocó en microviales de (0.2 ml) previamente identificados con su respectivo código del registro de laboratorio y fecha.

Para el análisis de las muestras de sangre se utilizó la prueba Rosa de Bengala (detector de anticuerpos (IgM e IgG), con una pipeta calibrada, se colocaron 30 μ l del suero y 30 μ l de reactivo en un portaobjeto, se homogenizaron con la misma punta de la pipeta y después de 4 minutos se realizó la lectura en busca de aglutinación, ubicando el portaobjeto sobre una luz que permita observar adecuadamente los resultados.

A los sueros que reaccionaron a la prueba Rosa de Bengala se les realizo la prueba confirmatoria de Rivanol.

En un tubo de ensayo se colocaron 400 μ l de suero más 400 μ l de solución Rivanol se agitó y se dejó reposar por 10 minutos. Luego se procedió a centrifugar por 5 minutos a 5000 rpm. Al finalizar se depositó en diferentes portaobjetos 80 μ l, 40 μ l, 20 μ l y 10 μ l del sobrenadante, colocando cerca de cada uno 30 μ l de antígeno de Rivanol mezclando de forma circular, después de 4 minutos se observaron en búsqueda de aglutinación.

6.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

6.7.2.1 Extracción de ADN

Se realizó extracción de ADN a partir de las muestras de semen, utilizando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit de QIAGEN, siguiendo los procedimientos descritos por el fabricante, los detalles se describen en anexos.



6.7.2.2 Preparación de la mezcla de reacción

Se utilizó un Master Mix (Promega®) que contiene los siguientes elementos:

- a) **Enzima Taq Polimerasa:** enzima termoestable (polimerasa); acelera el proceso de formación de la copia de ADN, dependiente del patrón original.
- b) **Desoxirribonucleicos trifosfatados** (adenina, timina, citosina y guanina): necesarios para proporcionar las bases nitrogenadas en la construcción del ADN.
- c) **-MgCl²:** cofactor importante para generar la reacción enzimática en el proceso de formación del ADN

Se utilizaron los cebadores descritos por Probert y colaboradores (51), sentido (F: 5´-GCGGCTTTTCTATCACGGTATTC-3´) y anti-sentido (5´-CCAGCCTTCCAATCGTCAG-3´).

El volumen para cada compuesto de la mezcla fue de 12.5 µl de Máster Mix 2X, 3.5 µl de agua libre de nucleasa, 2 µl del cebador sentido, 2 µl de cebador anti-sentido y 5µl de muestra de ADN, para una reacción de 25µl.

6.7.2.3 Amplificación y visualización

La amplificación se realizó en un termociclador elevando la temperatura a 95°C para desnaturalizar las cadenas de ADN durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos durando 1.15 minutos a 95°C, 2 minutos a 55,5°C, 2 minutos a 72°C. Para finalizar se hizo una amplificación durante 7 minutos a 72°C y luego se enfrió a 4°C. El producto del PCR fue separado en gel de agarosa al 1.3% con bromuro de etidio en un campo eléctrico de 120 volt, se visualizó en una lámpara de UV, se consideró positivo con la presencia de un producto de 150 pb, sin amplificación en el control negativo.

6.8 Análisis estadístico

- Se calculó la seroprevalencia inicial con su respectivo intervalo de confianza.
- Se calculó la incidencia acumulada de los 3 meses excluyendo los animales reactivos del primer muestreo.



- Se calculó la tasa de incidencia mensual y la prevalencia por cada uno de ellos.



7. Resultados

La seroprevalencia de brucelosis en el periodo de estudio fue 43/309, que representa un 13.9% (IC95%=7.89-17.93), realizado mediante técnicas serológicas. La incidencia acumulada en los tres meses de estudio fue de 0.08/animal-trimestre (IC95%=0.05-0.12), mientras que la tasa de incidencia mensual fue de 0.0318/animal-mes (IC95%=0.0208-0.0466), es decir, por cada 100 animales, 3 mostraron seroconversión en un mes.

En el mes de febrero se ingresaron al laboratorio 260 muestras de las cuales 26 fueron rectoras a Rosa de Bengala, obteniendo como resultado una seroprevalencia de brucelosis del 10.0% (IC95% = 6.16-13.84). En el mes de marzo se ingresaron 236 muestras de las cuales 3 aparecían rectoras representando el 1.3% (IC95% = 0.26-3.67) y en el mes de abril se ingresaron 236 muestras obteniendo 12 muestras rectoras para un 5.1% (IC95% = 2.07-8.09), (Figura 1).

En el periodo de estudio se obtuvo la seroprevalencia de brucelosis por especies obteniendo como resultado, en bovinos 42/292 fueron rectoras lo que representa el 14.4% y en los equinos 1/17 equinos fue reactor obteniendo una seroprevalencia de 5.9%, (Tabla 2).

En la PCR se obtuvieron 3/12 muestras positivas y en la comparación con la Rosa de Bengala se observó que 8 muestras fueron negativas en ambas pruebas, 1 muestra fue positiva en Rosa de Bengala, pero negativa en PCR, 3 muestras fueron negativas en Rosa de Bengala, pero positivas en PCR y ninguna muestra fue positiva en ambas pruebas, estos datos proporcionaron un valor de Kappa=-0.143 con un $p \geq 0.05$, (Tabla 1).



8. DISCUSIÓN

La seroprevalencia observada de 13.9% de brucelosis en la finca en estudio, fue considerada alta en comparación con estudios epidemiológicos realizados por el IPSA Nicaragua, en los cuales se observó una prevalencia de 0.12%. Para que un país pueda declararse libre de brucelosis, la OIE recomienda tener menos del 1% de prevalencia y mantener un control de movilización de animales (52), ya que el traslado es la principal forma de diseminación. Pueden haber fincas endémicas con una prevalencia mayor a la de otras, ya que la brucelosis es una enfermedad que tiene un comportamiento diferente dependiendo de múltiples factores, la mayoría asociados al manejo sanitario, de tal forma, se pueden encontrar fincas totalmente libres y fincas endémicas en las que a veces los animales no siempre son contagiosos, o no excretan la bacteria. Esto también se ve reflejado entre diferentes estudios, ya que un muestreo en un municipio en Colombia reveló una prevalencia de 5,81% (53), mientras que en otro estudio realizado en Perú la prevalencia fue inferior al 1%. (16). Por tal razón, para obtener la prevalencia real de brucelosis en un país o región, es recomendable realizar monitoreo con un número representativo de hatos y animales, así como, la aplicación adecuada de muestreos probabilísticos, tomando en consideración la sensibilidad y especificidad de las pruebas utilizadas.

La incidencia acumulada indica que, por cada 100 animales, 8 seroconvertían en las pruebas de aglutinación durante los 3 meses de estudio. En Chile el servicio agrícola y ganadero en un proyecto de control y erradicación expresó que la incidencia durante el periodo 2010-2015 mostró una disminución y que la situación se encuentra en un periodo de estancamiento dado a que persisten focos de la enfermedad principalmente en zonas endémicas (54).

En la tasa de incidencia mensual se observó que por cada 100 animales aparecían 3 reactores cada mes; El MAGFOR en su acuerdo ministerial 008-2009, artículo 25 dice que cuando se detecten animales positivos (reactores), realizar una nueva toma de sangre a los animales restantes de la finca, en un tiempo no menor de 30 días ni mayor a 60 después de efectuada la prueba anterior y en el Artículo 22 y 23 el acuerdo ordena el sacrificio de los animales positivos (reactores) mediante el



documento "Acta de marcado y sacrificio" los animales positivos (reactores) a brucelosis serán sacrificados en un rastro municipal o matadero bajo inspección veterinaria oficial, en un periodo no mayor a 8 días naturales posterior a la prueba diagnóstica(6). De tal forma que sería ideal utilizar un protocolo de muestreo diferente al protocolo sugerido por las autoridades, y que sea establecido de acuerdo con la endemidad en cada finca. Es importante tener en consideración la toma de muestras de sangre antes de la entrada del animal a servicio reproductivo, para confirmar la ausencia de reactividad serológica o bien determinar, si existe título serológico (55).

La seroprevalencia de brucelosis mensual destacó que en febrero se obtuvo una alta seroprevalencia (10.0%) 26/260 observándose un descenso en el mes de marzo (1.3%) 3/236, la baja seroprevalencia de este mes se debió a que probablemente los primeros animales reactores fueron aislados o sacrificados, esto ayudó a reducir la prevalencia de animales reactores. Posteriormente se observó un pequeño incremento de la seroprevalencia en el mes de abril (5.1%) 12/236 que se debió a que los animales no habían seroconvertido en el muestreo anterior también.

En los equinos la seroprevalencia fue de 5.9% esto significa que 1/17 equinos fue reactor. La relación o contacto entre los animales en la finca podría ser una fuente de infección, en un estudio de diferentes municipios del salvador se demostró que esta relación de equinos con bovinos es considerada como el factor más importante de riesgo en el contacto con el agente infeccioso (56). En Córdoba, Colombia (2016) se realizó un estudio en el cual se expresa que los equinos contribuyen con la introducción de la enfermedad en zonas no afectadas debido a la movilización además del contacto entre animales (57).

Al comparar la PCR con la prueba serológica Rosa de Bengala, una muestra fue positiva en Rosa de Bengala, pero negativa en PCR, 3 muestras fueron negativas en Rosa de Bengala, pero positivas en PCR y ninguna muestra fue positiva en ambas pruebas. En el PCR los resultados reflejan que se pudieron identificar animales que realmente estaban positivos a brucelosis bovina, sin seroconversión;



Orly y colaboradores (2011) en Ecuador muestrearon diferentes hatos con una alta prevalencia de brucelosis en la región, y llegaron a la conclusión que la PCR es más sensible frente a Rosa de Bengala (7). Esto sugiere que los resultados serológicos negativos pueden ser debido a que algunos animales puedan tener un nivel bajo de anticuerpos. Si la enfermedad pasa a ser crónica, la inmunoglobulina IgM desaparecen y las inmunoglobulina IgG permanecerán por largos períodos de tiempo, normalmente años, la intensidad de la respuesta se mide por los títulos de anticuerpos séricos utilizando la prueba de aglutinación lenta, que mide principalmente IgM, y ELISA indirecto (iELISA) que puede medir IgG, por este motivo es recomendable realizar un ELISA para la identificación de animales con infecciones crónicas (58).



9. CONCLUSIONES

1. Se observó una alta seroprevalencia de brucelosis bovina en comparación con la prevalencia estimada en Nicaragua.
2. La incidencia encontrada sugiere que los muestreos en esta finca en particular deberían realizarse con mayor frecuencia.
3. Se observó una baja concordancia entre la prueba de PCR y la prueba de Rosa de Bengala.
4. La PCR fue útil para identificar animales infectados por *Brucella abortus* y que fueron no reactivos a los test serológicos utilizados (Rosa de Bengala y Rivanol), demostrando la eficacia de la prueba en la detección de falsos negativos, ya sea por padecer formas crónicas de la enfermedad o por insuficiente producción de anticuerpos por cualquier otro motivo.



10. RECOMENDACIONES

- Realizar saneamiento total de la finca en estudio.
- Realizar muestreos con mayor frecuencia a lo estipulado en el Acuerdo Ministerial 008-2009.
- Tratar de hacer un muestro total de los animales en la finca.
- Debido a la condición crónica de brucelosis en la finca se recomienda realizar otras pruebas diagnósticas como ELISA que puedan detectar IgG que se mantiene en títulos bajos indetectables en pruebas de aglutinación.
- Los perros podrían ser una fuente de propagación de la bacteria, por lo cual se recomienda mantener un control sobre el movimiento de estos entre bovinos y equinos.



11. BIBLIOGRAFIA

1. Ducrotoy M, Muñoz P, Conde A, Blasco J, Moriyón I. A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis. *Preventive Veterinary Medicine*. 1 de marzo del 2018,151:57-72. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29496108>.
2. Suárez E, Ruiz V, Castillo Z, Jiménez R, et al. *Brucella abortus* Strain 2308 Wisconsin Genome: Importance of the Definition of Reference Strains. *Front Microbiol* [PubMed]. 29 de septiembre de 2016.7 [Citado: 29 de octubre 2018] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5041503/>.
3. Moral M, Laplume H, Sardi F, Jacob N, Garro S, et al. Enfermedades infecciosas: Brucelosis, Diagnóstico de Brucelosis. [Internet] Noviembre 2013,;58 [13 enero 2019] Disponible en <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000304cnt-guia-medica-brucelosis.pdf>
4. Polanco G, Rizo D. Estudio epidemiológico de la prevalencia de brucelosis bovina en la zona seca del municipio de San Pedro de Lóvago, Chontales. [Internet] Universidad Nacional Agraria, UNA, 2006 [citado 30 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.una.edu.ni/1325/>.
5. Ayala B, Meléndez M. Prevalencia de Tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) y Brucelosis (*Brucella abortus*) en bovinos criollos de la raza Reyna en edad reproductiva, en la finca Santa Rosa. [Internet]. Nicaragua: Universidad Nacional Agraria, UNA, 2013 [citado 30 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.una.edu.ni/2762/>.



6. MINISTERIO AGROPECUARIO Y FORESTAL [MAGFOR]. ACUERDO MINISTERIAL No. 008-2009 Medidas Sanitarias Para el Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina en Nicaragua [Internet] 29 de junio 2009. : 4, [citado 13 de enero 2019]. Disponible en: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/nic90609.pdf>.
7. Cevallos O, Escobar A, Carranza M, Saucedo S, Romero D, et al. Comparación de las técnicas PCR anidado y Rosa de Bengala para la detección de *Brucella* spp. en bovinos. [Internet] Octubre 2011 [citado 22 de febrero 2019] Disponible en: <https://docplayer.es/73529896-Comparacion-de-las-tecnicas-pcr-anidado-y-rosa-de-bengala-para-la-deteccion-de-brucella-spp-en-bovinos.html>.
8. Padilla R, Montoya P, Carrillo P. Estandarización de una prueba de PCR para la detección de *Brucella* spp. [Internet] Revista peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. Abril de 2003,102-4 Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342003000200007.
9. Llaguno T. Brucelosis, presencia en vacas (2 a 6 años) mediante card test, en tres haciendas, Rcto. Pajales, cantón pedernales, provincia de Manabí. (Guayaquil): Universidad Católica De Santiago de Guayaquil; Facultad de educación técnica para el desarrollo carrera de Medicina veterinaria y zootecnia; [Internet] Marzo del 2015. Disponible en: <http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/3869/1/T-UCSG-PRE-TEC-CMV-3.pdf>.
10. Agurto D, Fernández P. Prevalencia de brucelosis bovina en la parroquia ingapirca, cantón cañar, provincia de cañar. [Internet]. 2013 [citado 5 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/415/1/tesis.pdf>.



11. Pozo M, Noroña G. Determinación de Brucelosis Bovina (*Brucella Abortus*) Con La Prueba Rosa de Bengala en La Asociación “Unión Libre” de La Parroquia 10 de Agosto Provincia de Pastaza [Internet]. Julio 2011 [citado 13 de enero de 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/324947126/Determinacion-de-Brucelosis-Bovina-Brucella-Abortus-Con-La-Prueba-Rosa-de-Bengala-en-La-Asociacion-Union-Libre-de-La-Parroquia-10-de-Agosto-Provin>.
12. Rovid A, Roth J, et al. Enfermedades emergentes y exóticas de los animales. CFSPH Iowa State University, 15 oct. 2011 - 336 páginas. Disponible en: https://books.google.com.ni/books?id=s1R6wsyeT4IC&dq=etiologia+brucelosis&source=gbs_navlinks_s.
13. Vargas F. Brucella abortus en bovinos. Universidad Agraria Autónoma Antonio Narro. [Internet] Octubre 2012. [citado 6 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/fernandovargasvelasquez1/brucella-abortus-fernando-vargas-v>.
14. Corbel M, Brinley W. Clasificación del género Brucella situación presente. [Internet]. Marzo 1982 [citado 6 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://studylib.es/doc/5547744/clasificaci%C3%B3n-del-g%C3%A9nero-brucella--situaci%C3%B3n-presente---->.
15. Davies G, Casey A. The Survival of Brucella Abortus in Milk and Milk Products. British Veterinary Journal. [Internet] 1 de julio de 1973; 129(4):345-53. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007193517364369>.



16. Meza C, Morales C, Ara G, Manchego S, Calle E, Angulo J. Seroprevalencia de brucelosis bovina en el distrito de Puerto Inca, Huánuco. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. Julio de 2010, 21(2):223-6. [citado 18 de febrero 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1609-91172010000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
17. Foster G, Osterman B, Godfroid J, Jacques I, Cloeckeaert A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Año 2007; 57(11):2688-93. [Citado 4 de marzo] Disponible en: <https://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.65269-0>.
18. Garofolo G, Zilli K, Troiano P, Petrella A, Marotta F, Di Serafino G, et al. *Brucella ceti* from two striped dolphins stranded on the Apulia coastline, Italy. Journal of Medical Microbiology. Año 2014,63(2):325-9. [Citado el 4 de marzo 2019]. Disponible en: <https://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.065672-0>.
19. Scholz H, Nöckler K, Göllner, Bahn P, Vergnaud G, et al. *Brucella inopinata* sp. nov, isolated from a breast implant infection. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. [Internet] [Citado el 4 de marzo] 2010; 60(4):801-8 Disponible en: <https://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.011148-0>.
20. Scholz H, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, et al. *Brucella microti* sp. nov, isolated from the common vole *Microtus arvalis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. [Internet] [Citado el 4



- de marzo]. 2008; 58(2):375-82. Disponible en: <https://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.65356-0>.
21. Jiménez M, De Martino A, Quintana J, Alcaraz A, Pardo J. Course of Infection with the Emergent Pathogen *Brucella microti* in Immunocompromised Mice. *Infection and Immunity* [Internet] 1 de octubre de 2011; 79(10):3934-9. [citado el 4 marzo 2019] Disponible en: <https://iai.asm.org/content/79/10/3934>.
22. Whatmore A, Davison N, Cloeckert A, Al Dahouk S, Zygmunt M, Brew S, et al. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014; 64(12):4120-8. [citado el 4 marzo 2019] Disponible en: <https://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.065482-0>.
23. Ramales V. Brucelosis en bovinos. [Internet]. Junio 2013 [citado 7 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7372/VICTOR%20HUGO%20RAMALES%20PLIEGO.pdf?sequence=1>.
24. Ruiz M. Manual para la vigilancia epidemiológica de la Brucelosis. [Internet]. 23 de septiembre 2013 [citado 14 de enero de 2019]. Disponible en: http://187.191.75.115/gobmx/salud/documentos/manuales/03_Manual_Brucelosis.pdf.
25. OIE - World Organisation for Animal Health. Código terrestre. [Internet]. Mayo 2018 [citado 14 de enero de 2019]. Disponible en: <http://www.oie.int/es/normas/codigo-terrestre/>.



26. Valera Y, Sánchez W, Sánchez G, Pérez F, Pérez Y, et al. Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. [Internet] Septiembre 2005. [Citado el 14 de enero 2019]:9 Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090905/090503.pdf>.
27. Díaz A. Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. Rev. Scientifique et Technique de l'OIE. 1 de abril de 2013; 32(1):43-51. [Citado el 13 de enero 2019]. Disponible en: <http://doc.oie.int:8080/dyn/portal/index.seam?page=alo&alold=31507>.
28. The center for food security & public health. Brucelosis [Internet]. Año 2009 [citado 5 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucelosis.pdf>.
29. Rebhun W. Enfermedades del ganado vacuno lechero. de la edición de la lengua española. Zaragoza (España): editorial Acribia, SA., Royo, 23-50006; 1995. [Citado el 15 enero].
30. Beer J, et al. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. De la edición en lengua española. Vol. II. Zaragoza (España): ACRIBIA- Royo, 23-Zaragoza; 344 p.
31. Querol J. Cuestiones clínicas, epidemiológicas y diagnósticas de la brucelosis bovina, ovina y caprina [Internet] [Citado 15 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/brucelosis-bovina-t29060.htm>.



32. Vega L, Ariza A. et al. Brucelosis, una infección vigente. [Internet] año 2008;(4):8. [Citado el 17 de enero]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/actmed/am-2008/am084c.pdf>.
33. Nafati S, Hassan S. Diagnosis of Brucella Infection in Sheep and Goat and Evaluation of the associated Practices in Animal Contacts. American Journal of Infectious Diseases and Microbiology. 19 de octubre de 2016; 4(5):95-101. Disponible en: <http://pubs.sciepub.com/ajidm/4/5/1/index.html>.
34. Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. Croat Med J. agosto de 2010; 51(4):296-305. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2931434/>.
35. Baddour M, Alkhalifa D. Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of Brucella DNA in peripheral human blood. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 22 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18449219?dopt=Abstrac>.
36. Ouahrani S, Soubrier M, Liautard J. IS6501-anchored PCR for the detection and identification of Brucella species and strains. J Appl Bacteriol. agosto de 1996; 81(2):154-60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8760325>.
37. Leyla G, Kadri G, Umran O. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. - [Internet]. PubMed - NCBI. [citado 22 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12591206?dopt=Abstrac>.
38. Whatmore A. Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens. [Internet]. PubMed - NCBI. [citado



- 22 de enero de 2019]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19628055?dopt=Abstrac>.
39. Marianelli C, Martucciello A, Tarantino M, Vecchio R, Lovane G, Galiero G. Evaluation of Molecular Methods for the Detection of Brucella Species in Water Buffalo Milk - Journal of Dairy Science [Internet]. journalofdairy. [citado 22 de enero de 2019]. Disponible en:
[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(08\)71003-8/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(08)71003-8/fulltext).
40. Hinić V, Brodard I, Thomann A, Holub M, Miserez R, Abril C. IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of Brucella spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. - PubMed - NCBI [Internet]. PubMed - NCBI. [citado 22 de enero de 2019]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19602266?dopt=Abstrac>.
41. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. Manual de procedimientos del programa nacional de control progresivo y erradicación de brucelosis bovina [Internet]. 2015 [citado 12 de marzo de 2019]. Disponible en:
http://www.standardsfacility.org/sites/default/files/STDF_PG_358_Manual_Procedimiento_Brucelosis.pdf
42. Nielsen K, Kelly L, Gall D, Nicoletti P, Kelly W. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. Veterinary Immunology and Immunopathology. 1 de junio de 1995; 46(3):285-91. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016524279405361U>.
43. Weynants V, Gilson D, Cloeckaert A, Denoel P, Tibor A, Thiange P, et al. Characterization of a monoclonal antibody specific for Brucella smooth lipopolysaccharide and development of a competitive enzyme-linked



- immunosorbent assay to improve the serological diagnosis of brucellosis. Clin Diagn Lab Immunol. Mayo de 1996; 3(3):309-14. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8705675>.
44. McGiven J, Tucker J, Perrett L, Stack J, Brew S, MacMillan A. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to Brucella abortus in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. J Immunol Methods. Julio de 2003; 278(1-2):171-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12957405>.
45. Greiner M, Verloo D, de Massis F. Meta-analytical equivalence studies on diagnostic tests for bovine brucellosis allowing assessment of a test against a group of comparative tests. Prev Vet Med. 1 de diciembre de 2009; 92(4):373-81. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19766334>.
46. Acosta A, Ortiz M. Prueba de anillo en leche [Internet]. Año 2010 [citado 5 de marzo de 2019]. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/54-anillo.pdf.
47. Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. Vet Microbiol. 20 de diciembre de 2002; 90(1-4):447-59. [citado el 23 de enero] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414164>.
48. Ministerio De Trabajo y asuntos sociales de España (Gabinete técnico provincial de Toledo). Brucelosis: normas preventivas. (Prevención de la brucelosis). 8. [Citado el 12 de marzo]. Disponible en: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/201a300/ntp_224.pdf.



49. Dorneles E, Sriranganathan N, Lage A. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Vet Res* [Internet]. 2015 [citado 6 de marzo de 2019]; 46(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4495609/>.
50. Programa de Acción Específico, Secretaría de Salud. Prevención y Control de la Brucelosis 2013-2018. CENAPRECE. 52. [Citado el 13 de marzo 2019]. Disponible en: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/201a300/ntp_224.pdf.
51. Probert W, Schrader K, Khuong N, Bystrom S, Graves M. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol*. marzo de 2004; 42(3):1290-3. [Citado el 3 de marzo]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004098>.
52. MAGFOR. Estudio epidemiológico en población ganadera para eliminar brucelosis [Internet]. *La Voz del Sandinismo*. 2010 [citado 13 de febrero de 2019]. Disponible en: <https://www.lavozdelsandinismo.com/nicaragua/2010-09-15/estudio-epidemiologico-en-poblacion-ganadera-para-eliminar-brucelosis/>.
53. Motta P, Herrera V, Londoño M, Rojas V, Rivera C. Prevalencia de brucelosis (*Brucella* spp) en bovinos del municipio de San Vicente del Caguán, Caquetá, Colombia. *Veterinaria y Zootecnia*. 2018; 12:9. <http://vip.ucaldas.edu.co/vetzootec/downloads/v12n2a01.pdf>.
54. Servicio Agrícola Y Ganadero, División de Protección Pecuaria, Sub Departamento de Sanidad Animal. Situación Sanitaria Brucelosis Bovina en Chile [Internet]. 2016 [citado 15 de febrero de 2019]. Disponible en: http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/situacion_sanitaria_bb_2015.pdf.



55. ICA, socio estratégico del agronegocio colombiano. Toma y envío de muestras de brucelosis para envío a laboratorio [Internet]. Salud capital. [citado 18 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://www.saludcapital.gov.co/CTDLab/Publicaciones/2015/Toma%20y%20Envio%20de%20Muestras-Dx-Brucelosis.pdf>.

56. Castro V. Estudio serológico de brucelosis en equinos en los municipios de Colón, San Juan Opico y Ciudad Arce del departamento de La Libertad, El Salvador. [Internet]. Universidad de El Salvador; 2008 [citado 26 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/1554/>.

57. Tique V, González M, Mattar S, Velásquez R, Triana A, Vergara O. Seroprevalencia de Brucella sp. en équidos de Córdoba, Colombia. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Diciembre de 2016; 57(2):92-100. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0258-65762016000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es.

58. Saegerman C, Gilson D, Bastin A, Dubray G, et al. Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. Vet Rec. 21 de agosto de 1999; 145(8):214-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499853>.



12. ANEXOS

Protocolo de extracción del ADN

1. La extracción del ADN se realizó a partir de muestras de semen de toros, utilizando el Kit Comercial QIAamp ADN Blood Mini Kit siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante
2. En un tubo de 2 ml se coloca 200 μ l de muestra de semen
3. Se agregó 200 μ l de buffer AL más 20 μ l de proteinasa K, la mezcla se incubó 15 minutos a 57 °C.
4. Dar vortex y agregar 200 μ l de alcohol, dar vortex y centrifugado rápido
5. Pasar todo el contenido a la columna de silica y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto
6. Pasar la columna a un nuevo tubo colector, agregar 400 μ l de buffer AW1
7. Centrifugar a 8000 rpm por un minuto
8. Cambiar de tubo colector, agregar 500 μ l de buffer AW2
9. Centrifugar a 11000 rpm por 3 minutos
10. Pasar la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml
11. Agregar 200 μ l de agua libre de nucleasa y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto
12. Tirar la columna y guarda la solución filtrada a 20 °C hasta su uso.



GRAFICOS

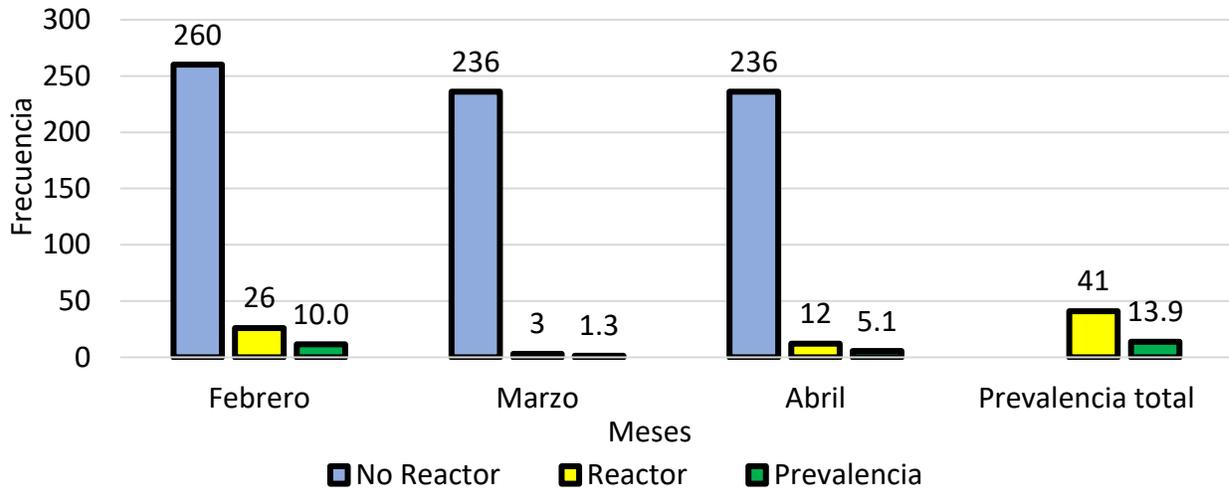


Figura1. Prevalencia mensual de brucelosis bovina en la finca

Tabla 1: Resultados serológicos de los bovinos a los que se les realizó PCR.

		PCR		Total
		Positivo	Negativo	
Rosa de Bengala	Reactor	0	1	1
	No Reactor	3	8	11
	Total	3	9	12

Kappa=
0.143, $p \geq 0.05$

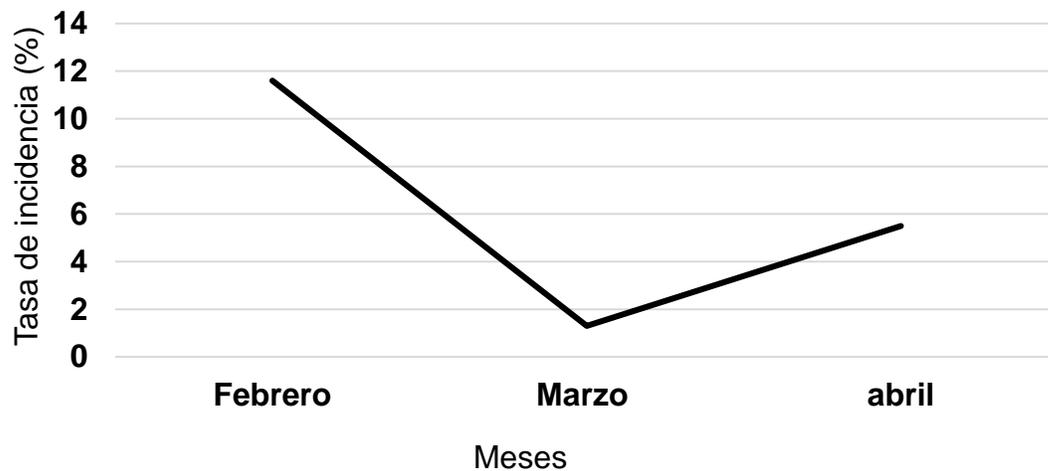


Figura2: tasa de incidencia mensual de brucelosis en una finca endémica

Tabla 2. Resultados de Rosa de Bengala por especies muestreadas

Especie	Serología		Total
	No reactor	Reactor	
Bovino	250	42	292
Equino	16	1	17
Total	266	43	309

p=0.484, según estadístico exacto de Fisher