



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

**“DIAGNÓSTICO Y PLAN DE ERRADICACIÓN DE LA BRUCELOSIS
(*Brucella abortus*) EN LA HACIENDA LA ISABELA DE SASAPUT CHAMBO”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN
TIPO: PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN**

**Previo a la obtención del título de
INGENIERA ZOOTECNISTA**

**AUTORA:
BLANCA NOEMI QUISHPI ILLICACHI**

**Riobamba – Ecuador
2017**

Este trabajo de titulación fue aprobado por el siguiente Tribunal

Dr. Nelson Antonio Duchi Duchi. Ph.D

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Byron Leoncio Díaz Monroy. Ph.D.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Dr. Cesar António Camacho León.

ASESOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Riobamba, 27 de julio del 2017

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, **BLANCA NOEMI QUISHPI ILLICACHI**, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 27 de julio del 2017.

BLANCA NOEMI QUISHPI ILLICACHI

C.I. 060460840-6

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, por darme la vida, por ser mi protector y mi guía en cada momento de mí existir, y permitirme cumplir una meta más en mi vida.

A mis padres y mis hermanos quienes han sido mi inspiración y mi fortaleza alentándome cada día a seguir adelante y poder culminar con esta carrera.

A mi esposo, por llegar en los momentos finales de mi formación universitaria y brindarme su apoyo incondicional.

A cada uno mis maestros, quienes tuvieron la paciencia para emitir sus conocimientos y en especial a mi director de trabajo de titulación, Dr. Byron Díaz, por su esfuerzo y dedicación que desinteresadamente con su experiencia y conocimientos me impulso a finalizar dicho trabajo.

A mis amigos y compañeros quienes de algún modo me impulsaron a llegar a la meta.

DEDICATORIA

A Dios, quien me dio la vida y que con su espíritu me ha encaminado en su sendero.

A mis padres Jorge y María, a mis hermanos José, María, Manuela, Anita, Jorge, Franklin, Mayra, Jimmy y Jorge Luis quienes han sido mi inspiración y me han ayudado moral y económicamente.

A mi esposo Ramón y mi hermoso hijo Sebastián, por formar parte de mi vida.

Y a mis compañeros y mejores amigos: José, Edison, Jorge, Mayra, Érica, Gaby, Nancy, Mafer, Estefani, y Nina (+) que de algún modo me impulsaron a llegar a la meta.

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	v
Abstract	vi
Lista de Cuadros	vii
Lista de Gráficos	viii
Lista de Anexos	ix
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
II. <u>REVISION DE LITERATURA</u>	3
A. BRUCELOSIS	3
1. <u>Generalidades</u>	3
2. <u>Etiología</u>	5
3. <u>Transmisión</u>	6
a. Vías de transmisión	8
(1) Oral	8
(2) Cutánea	8
(3) Vía intrauterina	8
(4) Vía Ocular	8
(5) Congénita	9
4. <u>Patogenia</u>	9
5. <u>Signos Clínicos</u>	10
6. <u>Diagnostico</u>	10
B. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO	11
1. <u>Tipo de antígenos</u>	11
2. <u>Pruebas serológicas</u>	12
a. Según el tipo de Antígeno	12
b. Según el tipo de inmunoglobulina	12
C. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	13
1. <u>La prueba de Huddleson</u>	13
a. Técnica	13
2. <u>Rosa de Bengala</u>	15
a. Proceso analítico	16
3. <u>Brucella elisa competitiva</u>	16
a. Procedimiento	17

b. Cálculos	19
c. Controles	19
d. Muestras	19
4. <u>Otras pruebas importantes y complementarias para el diagnóstico</u>	20
a. Prueba del anillo en leche (Ring Test)	20
b. Fijación de complemento	20
c. Prueba de rivanol	20
d. Prueba de 2mercaptoetanol (2ME)	21
e. Prueba de Inmunodifusión Radial (IDR)	21
f. Pruebas alérgicas	21
D. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD	21
1. <u>Sensibilidad y especificidad de las pruebas</u>	21
2. <u>Las pruebas de seroaglutinación</u>	22
3. <u>Los "falsos positivos"</u>	22
4. <u>Los "falsos negativos"</u>	23
5. <u>Procedimientos a seguir con hembras y machos de reacción sospechosa</u>	23
E. INMUNIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD	24
1. <u>Inmunización de hatos</u>	24
a. Vacuna cepa Cotton 19	24
1) Características	25
2) Ventajas	25
3) Desventajas	25
b. Vacuna RB51	25
1) Características	26
2) Ventajas	26
3) Inmunidad Natural	27
3. <u>Influencia de la vacunación sobre el diagnóstico</u>	27
4. <u>Evolución de las inmunoglobulinas en animales vacunados e infectados</u>	28
5. <u>Presentación gráfica de la relación de la edad de vacunación y el nivel y persistencia de IgG</u>	29
6. <u>Pautas de IgM e IgG en animales infectados no vacunados y vacunados</u>	31

F. PLAN DE CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA	32
1. <u>Estrategias De Prevención Y Control</u>	33
a. Estrategia Nacional	33
b. Estrategias Regionales	33
1) Regiones de alta prevalencia (Sierra norte y Costa)	34
2) Regiones de baja prevalencia (Sierra sur y Amazonia)	34
3) Región indemne (Galápagos)	34
c. Vigilancia Epidemiológica	35
a. Diagnóstico e Identificación de Animales Positivos	36
b. Certificación de Predios Libres	37
III. MATERIALES Y MÉTODOS	38
A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO	38
B. UNIDADES EXPERIMENTALES	39
C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES	39
1. <u>Materiales</u>	39
2. <u>Equipos</u>	40
3. <u>Reactivos</u>	40
4. <u>Instalaciones</u>	40
D. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	40
E. MEDICIONES EXPERIMENTALES	41
F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA	41
G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	41
1. <u>De campo</u>	41
2. <u>De laboratorio</u>	42
H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN	44
IV. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	45
A. DIAGNOSTICO DE LA PRESENCIA DE CASOS POSITIVOS DE BRUCELOSIS (<i>Brucella abortus</i>), EN LA HACIENDA “LA ISABELA DE SASAPUT” DEL CANTÓN CHAMBO.	45
1. <u>Prueba serológica de Rosa de Bengala</u>	45
2. <u>Pruebas serológicas de Elisa competitiva</u>	48

B. DISEÑO DE UN PLAN DE ERRADICACIÓN DE LA BRUCELOSIS EN BASE AL DIAGNÓSTICO DE LA HACIENDA LA ISABELA DE SASAPUT DEL CANTÓN CHAMBO.	50
1. <u>Plan sanitario</u>	50
a. Propósitos a lograr mediante la implementación de un plan de control y erradicación de la Brucelosis bovina	51
b. Actividades de diagnóstico y control de la brucelosis	51
c. Proceso de diagnóstico para Brucelosis Bovina	51
d. Control de movilización de animales	¡Error! Marcador no definido.52
e. Educación sanitaria	¡Error! Marcador no definido.
	52 ¡Error! Marcador no definido.
f. Erradicación de la Brucelosis	¡Error! Marcador no definido.55
V. <u>CONCLUSIONES</u>	56
VI. <u>RECOMENDACIONES</u>	57
VII. <u>LITERATURA CITADA</u>	58
ANEXOS	

RESUMEN

En el presente trabajo, se profundizó sobre los mecanismos de patogenicidad, virulencia, supervivencia en el huésped, aspectos zoonóticos y los diversos síntomas que produce en el animal la Brucelosis. Se muestra la situación actual en algunos países que la presentan y los que ya la han erradicado. Se hicieron descripciones detalladas de las dos vacunas utilizadas contra *Brucella abortus* (cepa 19 y RB51) teniendo en cuenta sus características, efectos que producen en el animal, modos adecuados de uso y las interferencias que se ocasionan con el uso inadecuado de estas vacunas en el diagnóstico serológico de la Brucelosis bovina. En cuanto al diagnóstico y plan de erradicación de la *Brucella abortus* en la hacienda Isabela de Sasaput, en los análisis primarios realizados por el método de rosa de bengala de una hato de 32 animales hembras se detectó la presencia de *Brucella* en 7 semovientes los mismos que fueron sometidos al análisis confirmatorio de ELISA COMPETITIVO para descartar falsos positivos siendo el resultado positivos para los mismos 7 animales. Se diseñó y recomienda la aplicación de un plan de erradicación que se basa en el normativo vigente de AGROCALIDAD, el cual menciona el descarte inmediato de los animales positivos con todas las normas de bioseguridad. Se sugiere además dentro de este plan de erradicación cumpla con parámetros sanitarios como: la desparasitación y otros y revacunación específica al hato. También es necesario interactuar con entidades públicas ecuatorianas como AGROCALIDAD y MAG para detectar a tiempo la brucelosis en los hatos ganaderos.

ABSTRACT

In the present work, the mechanisms of pathogenicity, virulence, survival in the host, zoonotic aspects and various symptoms produced in the animal Brucellosis were investigated. The present situation is shown in some countries that present it and those already eradicated. Detailed descriptions of the two vaccines used against *Brucella abortus* (Starin 19 and RB51) were made taking into account their characteristics, effects that produce in the animal, adequate modes of use and the interferences that occur with inadequate use of these vaccines in the serological diagnosis of bovine Brucellosis. As for the diagnosis and plan for the eradication of *Brucella abortus* at the Isabel de Sasaput farm, the primary analyzes carried out using the "Rosa de Bengala" method of a herd of 32 female animals detected the presence of *Brucella* in 7 livestock the same as were submitted to the confirmatory ELISA COMPETITIVE to highlight false positives being the positive result for the same 7 animals. It is designed and recommended the implementation of an eradication plan that is based on the current regulation of AGROCALIDAD, which mentions the immediate disposal of positive animals with all biosecurity standards. It is also suggested that within this eradication plan comply with sanitary parameters such as: deparasitization and revaccination specific to the herd. It is also necessary to interact with Ecuadorian public entities such as AGROCALIDAD and MAG to detect brucellosis in cattle herds in time.

LISTA DE CUADROS

N°	Pág.
1. ESPECIES DE <i>Brucella</i> .	6
2. CANTIDADES DE SUERO, ANTÍGENO Y DIÁMETROS DE LA PRUEBA DE HUDDLESON.	13
3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE HUDDLESON.	15
4. CONDICIONES METEOROLÓGICAS DEL CANTÓN CHAMBO	38
5. POBLACION BOVINA LECHERA DE LA HACIENDA LA ISABELA DE SASAPUT CHAMBO.	45
6. RESULTADOS SEROLÓGICOS DE PRESENCIA DE BRUCELLA POR METODO ROSA DE BENGALA EN LOS ANIMALES DE LA HACIENDA LA ISABELA DE SASAPUT. CHAMBO.	45
7. RESULTADOS SEROLÓGICOS DE PRESENCIA DE BRUCELLA POR MÉTODO ELISA COMPETITIVA EN LOS ANIMALES DE LA HACIENDA LA ISABELA DE SASAPUT. CHAMBO.	48
8. CALENDARIO SANITARIO DE EJECUCIÓN EN LA HACIENDA LA ISABELA SE SASAPUT.	53
9. CALENDARIO SANITARIO PROPUESTO PARA LA HACIENDA LA ISABELA DE SASAPUT.	54

LISTA DE GRÁFICOS

Nº	Pág.
1. Representación esquemática de los resultados de la prueba de aglutinación con sueros de terneras vacunadas con Cepa Cotton 19 entre 4 y 6 meses de edad.	30
2. Representación esquemática de los resultados de la prueba de aglutinación con sueros de terneras vacunadas con la vacuna Cepa Cotton 19 a los 8 meses de edad.	30
3. Desarrollo secuencial de IgM y IgG en una vaquillona, sin antecedentes de vacunación, expuesta a una cepa de <i>B. abortus</i> ,	31
4. Porcentaje de presencia de <i>B. abortus</i> en los semovientes de la Hacienda la Isabela de Sasaput del cantón Chambo.	47

LISTA DE ANEXOS

1. La Hacienda La Isabela De Sasaput Del Cantón Chambo.
2. Fotos trabajo de campo en La Isabela De Sasaput Del Cantón Chambo.
3. Fotos trabajo en laboratorio en La Isabela De Sasaput Del Cantón Chambo.
4. Resultados del laboratorio.

I. INTRODUCCIÓN

La Brucelosis bovina es una enfermedad infecciosa limitante del desarrollo ganadero; se encuentra ubicada en la lista B de la OIE donde se enumeran enfermedades transmisibles que se consideran importantes desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario y cuyas repercusiones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal son considerables, (REDVET. 2005).

Existen siete especies de *Brucella* que están asociadas a varios huéspedes principales: *B. abortus* al ganado bovino, *B. melitensis* al caprino, *B. suis* a los porcinos, *B. canis* a los caninos, *B. ovis* a los ovinos, y *B. neotomae* a roedores salvajes y recientemente se determinó la *Brucella maris* asociada a mamíferos marinos. Esta se localiza principalmente en los órganos del tracto genital en el que producen abortos en las hembras y orquitis o epididimitis en los machos, procesos que pueden ser causa de esterilidad permanente, por lo que la repercusión socioeconómica de la brucelosis es grande en países con esta patología.

A pesar de los esfuerzos que se están haciendo desde hace mucho tiempo para controlar y erradicar la brucelosis, esta infección sigue siendo una zoonosis importante en el mundo entero. Su persistencia se puede atribuir; a la diversidad existente en el género *Brucella*, a la distribución geográfica de los animales sensibles, a la supervivencia y a los mecanismos de transporte de un hospedador a otro que presentan estas bacterias, (Bricker, B. *et al.* 2000).

En el Ecuador la prevalencia e incidencia de brucelosis bovina genera cuantiosas pérdidas económicas calculadas en 5'436908 USD según el Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina 2010, sobre todo en la cuenca lechera del país, integradas por las 6 provincias del centro de la Sierra, al existir venta de animales enfermos a las unidades campesinas de producción lo que implica la pérdida de leche, de crías y de hembras vientres de reemplazo, por no existir políticas pecuarias que garanticen el cumplimiento de programas de prevención y vacunación que permitan un mayor desarrollo del sector ganadero.

En la actualidad para la prevención y control de *Brucellaabortus* en bovinos se realizan vacunaciones controladas con la Cepa Cotton 19 o la Cepa RB51 y el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos en suero mediante pruebas de aglutinación rápida por Rosa de Bengala, fijación de Complemento, Elisa indirecta y Elisa competitiva, las cuales contribuyen a unificar criterios tendientes a lograr el control y finalmente la erradicación de la enfermedad, (Bagchi, T. 2010).

El presente trabajo contribuye con un diagnóstico asertivo y elaboración de un plan de erradicación de la *Brucellaabortus* en el hato lechero de La Hacienda “La Isabela de Sasaput” del cantón Chambo, considerando que esta enfermedad ha ocasionado pérdidas económicas en la misma.

Con los antecedentes expuestos, en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:

1. Diagnosticar la presencia de casos positivos de brucelosis (*Brucellaabortus*) en la Hacienda La Isabela de Sasaput del cantón Chambo.
2. Diseñar un plan de erradicación de la brucelosis en base al diagnóstico de La Hacienda la Isabela de Sasaput del cantón Chambo.

II. REVISION DE LITERATURA

A. BRUCELOSIS

1. Generalidades

El género *Brucella* está formado por un reducido número de bacterias gram negativas, estrechamente relacionadas entre sí. Son pequeñas (0,4 a 0,8 x 0,4 a 2,5 μ), aerobios sin cápsula, ni espora, que se presentan aisladas o en pequeños grupos, (Franco, F. y Loza, C. 2009).

Comprenden patógenos intracelulares facultativos que causan una zoonosis (enfermedad transmisible de animales al hombre) conocida como brucelosis. Esta zoonosis es una de las más dispersas alrededor del mundo y afecta a una amplia variedad de mamíferos, (Martínez, C. 2008).

La mayoría de las cepas pierde su viabilidad a 56°C, aunque para la esterilización se necesitan temperaturas superiores a los 80°C. El pH normal de crecimiento oscila entre 6 y 7,4, mueren a pH menores de 3,5, (López, G. 2007).

Álvarez, E. (2010), manifiesta que la brucelosis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa ocasionada por la bacteria *Brucella abortus*, difundida en mayor o menor grado por algunos países de América latina y entre ellos Ecuador. La enfermedad ataca a bovinos de todas las edades, pero persiste con mayor frecuencia en animales sexualmente adultos, y presenta infección congénita en terneros nacidos de vacas infectadas. Otras especies animales como ovinas, caprinas, búfalos, porcinos y equinos también pueden contagiarse.

La brucelosis bovina también produce grandes pérdidas económicas estimadas en cinco millones de dólares al año debido principalmente a la disminución de la producción de leche, abortos de vacas y otros problemas de infertilidad. Las pérdidas de terneros o dificultades en la crianza de los mismos, principalmente en las zonas destinadas a la producción de carne, donde los terneros representan una fuente de ingresos. La infertilidad de las vacas provoca a su vez el sacrificio de

vacas infectadas, como consecuencia de retención placentaria, seguida de metritis aguda.

La brucelosis no es la única causa de abortos en hembras sexualmente activas, si no hay ciertos factores que contribuyen a la presencia de abortos entre estos factores están: Los inmunosupresores como la ingestión prolongada de toxinas fúngicas (micotoxinas) que contribuyen para que se produzcan abortos asociados a distintas etiologías, (Martínez, C. 2008).

Otros factores a tener en cuenta son las deficiencias de oligoelementos y vitaminas: Cobre, Zinc, Selenio, y Vitaminas E y A que actúan como sustancias antioxidantes mejorando el status inmunitario de los bovinos. Es muy difícil lograr una buena inmunidad cuando existen factores inmunosupresores, fundamentalmente cuando el hato a vacunar presenta cuadros de deficiencia nutricional ya sea cuantitativa o cualitativa. Se debe tener en cuenta que el aporte de Vitaminas E, Selenio y Zinc son de vital importancia para lograr un hato protegido.

La placenta cumple roles fundamentales: El respiratorio, el nutricional y el renal; la reacción placentaria del patógeno está limitada a cambios circulatorios, (hiperemia, edema, hemorragia y trombosis), infiltración leucocitaria, (macrófagos placentarios), degeneración, necrosis, y fibrosis. La presencia de lesiones placentarias nos indica una infección intrauterina, de hecho es la placentitis la lesión más común en los abortos infecciosos. Por ello la presencia de la placenta es vital para un diagnóstico correcto, (Castro, H. 2005).

Agrocalidad y el MAGAP, señalan en el programa Nacional de control de la brucelosis bovina, que las pérdidas al parto incluyen los terneros que nacen muertos, los que mueren durante el parto y los que mueren en las horas siguientes al nacimiento. En términos muy generales se puede considerar que del total de pérdidas de terneros en este período, el 75 % se producen al nacimiento y el 25 % restante entre el nacimiento y el destete. También expresan con respecto al total de nacimientos para un hato constituido normalmente por edades se podría esperar 4 a 6% de mortandad al parto y entre 2 y 3% para el período 72 horas postparto hasta el destete. Uno de los aspectos más desalentadores del estudio de estas

pérdidas es el número prácticamente ilimitado de clasificaciones en que se agrupan estas, lo cual hace muy difícil la comparación entre los resultados y la evaluación, (Rivera, G. 2011).

La repercusión socioeconómica de la brucelosis es grande en los países que no la han erradicado. El control y la erradicación de la brucelosis requiere el poner en ejecución en forma coordinada por lo menos las siguientes cuatro medidas: vacunación, diagnóstico, eliminación de reactores y vigilancia epidemiológica. Si una de estas acciones falla o solo se cumple parcialmente, la enfermedad permanece como problemática constante o emergente. Actualmente se dispone de herramientas que permiten cumplir la primera acción mediante la aplicación reglamentaria de una vacuna, cepa Cotton 19 o cepa RB51, para la segunda se ha demostrado la utilidad y la eficacia de pruebas serológicas de alta sensibilidad y especificidad, (Bautista, M. 2008).

Las dos últimas medidas se encuentran reglamentadas apropiadamente, pero lo anterior requiere del trabajo compartido entre los productores y la autoridad sanitaria para reducir progresivamente la existencia de fuentes de infección hasta alcanzar las condiciones específicas para la fase de erradicación.

2. Etiología

Es una enfermedad infecciosa de características zoonóticas bacteriana de curso crónico que afecta a bovinos, equinos, ovinos, caprinos y caninos, es causada por *Brucella abortus* y se caracteriza por aborto en la hembra y orquitis e infección de las glándulas sexuales en el macho. La bacteria es gram negativa. Se instala en células del sistema inmunológico, (Samartino, L. 2008).

En lotes donde la enfermedad es endémica el animal afectado aborta una vez. Después de la exposición y las gestaciones, los períodos de lactancia subsiguientes son aparentemente normales. Las bacterias se encuentran en el útero durante la preñez, y el microorganismo es excretado en la leche y en descargas uterinas.

En la actualidad se conoce, 7 especies de *Brucellas*(cuadro 1) dividiéndose en; lisas (*Brucellamelitensis*, *Brucellaabortus*, *Brucellasuis*, *Brucellaneotomae*) y rugosas (*Brucellaovis*, *Brucellacanis* y *Brucella maris*), Guzmán, O. (2009).

Cuadro 1. ESPECIES DE *Brucella*.

ESPECIE DE <i>BRUCELLA</i>	FORMA	HUÉSPED
<i>B.melitensis</i>	Lisa	Cabra
<i>B.abortus</i>	Lisa	Vacas
<i>B.suis</i>	Lisa	Cerdos
<i>B.neotomae</i>	Lisa	Roedores
<i>B.ovis</i>	Rugosa	Ovejas
<i>B.canis</i>	Rugosa	Perros
<i>B.maris</i>	Rugosa	Mamíferos marinos

Fuente: Guzman, O. (2009).

3. Transmisión

La brucelosis casi siempre es transmitida al ganado susceptible por su estrecha asociación con el ganado infectado o la exposición a un ambiente contaminado. Se eliminan cantidades enormes de *B. abortus* en los fetos abortados, placentas, líquido placentario y secreciones vaginales. Estas últimas persisten con frecuencia durante varias semanas después del aborto o del parto normal. Las vacas más infectadas eliminan *B. abortus* en su leche continuamente o en forma intermitente durante toda la lactancia. Los becerros alimentados por vacas infectadas o que toman leche contaminada con frecuencia eliminan los microorganismos en su materia fecal dado que no todos los microorganismos mueren durante el proceso digestivo. Los toros infectados pueden arrojar en su semen el agente patógeno, (Bautista, M. 2008).

La difusión de la infección depende de la capacidad de reacción, la fase de gestación y la edad de la hembra. La bacteriemia siguiente al contagio pasa frecuentemente desapercibida debido a sus escasas manifestaciones clínicas. Las *brucellas* se asientan en las mamas de hembras sexualmente maduras y no

gestantes, para luego, durante la gravidez mudarse al útero. Si las vacas se encuentran en la primera mitad de gestación se produce inmediatamente la invasión uterina. La brucelosis puede difundirse por medio de intermediarios animados e inanimados, (Bauza E. 2009).

La infección de presentación natural probablemente se adquiere a través del tubo digestivo. El ganado frecuentemente lame los fetos abortados, placenta y los genitales externos de las vacas infectadas, quedando expuestos de esta manera. Pueden ingerir pasto, rastrojo, alimentos, agua o lamer objetos contaminados presentes en su ambiente. La *Brucella* también puede entrar a través de las membranas mucosas como la conjuntiva y las fosas nasales, y posiblemente a través de la piel como resultado del contacto con materiales contaminados.

La inseminación artificial constituye una vía de transmisión de la brucelosis si toros infectados se utilizan como fuente de semen. Los toros infectados que eliminan la *B. abortus* en su semen rara vez transmiten la infección directamente mediante la monta natural. Sin embargo, existe el riesgo potencial, porque el ambiente puede estar contaminado con semen u orina infectada y con semen infectado expulsado por la vagina de las vacas poco después del apareamiento (reflujo vaginal). Bajo circunstancias poco comunes, la brucelosis puede ser transmitida por picadura de mosquitos, moscas y garrapatas.

Las condiciones óptimas para su supervivencia son una combinación de congelamiento o temperaturas cercanas al congelamiento, ausencia de luz solar directa y el secado lento en presencia de materia orgánica. Bajo tales condiciones el microorganismo puede vivir más de 2 años. Las temperaturas progresivamente mayores, la eliminación del material orgánico diluido, y el aumento en la humedad disminuyen la viabilidad de la *Brucella abortus*.

Los microorganismos mueren fácilmente por la luz solar directa y así también son susceptibles a los desinfectantes más comunes. La forma más común en que se transmite la brucelosis dentro de un hato no infectado es mediante la introducción de ganado infectado, (FEDEPLE. 2009).

a. Vías de transmisión

(1) Oral

La vía de penetración más importante es el tracto gastrointestinal por ingestión de pastos, forrajes y aguas contaminadas. Las vacas tienen además la costumbre de lamer membranas fetales, fetos y terneros recién nacidos, que contienen todos ellos gran número de *Brucella* y constituyen una fuente de infección muy importante. El instinto de lamer los órganos genitales de otras vacas contribuye también a la transmisión de la infección, (REDVET. 2005).

(2) Cutánea

La vía cutánea tiene la misma importancia que la vía gastrointestinal, por ejemplo: se pueden producir infecciones mediante las camas infectadas, cuando haya lesiones en las tetillas o en los extremos de los miembros o en el espacio interdigital que faciliten la penetración del agente patógeno en capas profundas de la piel, al ordeñar, quizás puedan introducir *Brucella* en la piel de los pezones las manos humedecidas con leche infectada, (REDVET. 2005).

(3) Vía intrauterina

La vía intrauterina que se emplea en la inseminación artificial es muy importante en la transmisión de la infección. Por el uso de semen de toros infectados y que en la inseminación artificial se deposita en el cérvix o en el útero, eludiendo la acción bactericida de la vagina, (Edifarm, 2009).

(4) Vía Ocular

La vía ocular es muy eficiente porque la *Brucella* entra fácilmente por la conjuntiva y requiere de pocas *Brucellas* viables que se transportan por macrófagos al linfonódulo parotídeo. Se utiliza como vía de infección experimental ya que solamente son necesarios 750.000 microorganismos viables intra-conjuntiva, para infectar al 90% de vacas susceptibles, (Solís, T. 2008).

(5) Congénita

El 60 al 70 % de los terneros recién nacidos de madres infectadas nacen infectados, pero la gran mayoría de los terneros se deshacen de la infección en pocos meses, (Solis, T. 2008).

Se ha determinado que aproximadamente el 65 % de las vacas infectadas abortan; de éstas, el 65% abortan solo una vez, y el 23%, dos veces. Un porcentaje mucho más pequeño abortan más de dos veces. Cuando el aborto no se presenta y la preñez llega a su término, a menudo la cría está débil y el animal recién nacido sufre neumonía y enteritis, lo cual retrasa seriamente su desarrollo. Se estima que del 40 al 50% de las vacas afectadas tienen obstaculizadas su capacidad reproductora, como resultado de la enfermedad, (REDVET, 2005).

4. Patogenia

Independientemente de la puerta de entrada de *B. abortus*, la localización primaria de los microorganismos durante la primera semana después de la exposición estará cerca del sitio de entrada y en los ganglios linfáticos adyacentes de la cabeza y de la pelvis. La *Brucella* que es ingerida entra al cuerpo principalmente a través de la mucosa oral o faríngea por las amígdalas.

La vía seguida por los microorganismos hasta su localización inicial en los ganglios linfáticos son probablemente los conductos linfáticos. Posteriormente la rápida propagación de microorganismos por todo el cuerpo se hace a través de los vasos sanguíneos. Los microorganismos son ingeridos por las células fagocíticas cerca del sitio de entrada y llevados a otros sitios dentro del cuerpo. Se considera que la mayoría de las brucelas son ingeridas inicialmente por los neutrófilos. Aunque los constituyentes normales del plasma, como las bacteriocidinas unidas al complemento, matan algunos microorganismos, la ingestión ocurre rápidamente y una vez dentro de los neutrófilos las brucelas están protegidas de las bacteriocidinas. Los neutrófilos sirven principalmente como un medio para conducir las brucelas a varias regiones del cuerpo, favoreciendo la multiplicación de los microorganismos, en vez de contribuir a la defensa del huésped.

Después de la muerte y la lisis de los neutrófilos, las *brucellas* son liberadas y entonces pueden ser ingeridas por otros neutrófilos, monocitos, histiocitos y por ciertas células epiteliales. Tras la propagación de la *Brucella abortus* través del cuerpo, se producen cambios tisulares en órganos donde las bacterias tienden a persistir. Se desarrolla linfadenitis difusa, serosa o supurativa en cada ganglio linfático infectado, (Bercovich, Z. 2006).

5. Signos Clínicos

El aborto después del quinto al séptimo mes de gestación constituye un signo clínico cardinal de este padecimiento; en tanto que es rara la presentación de partos adelantados o el nacimiento de terneros débiles. En las poblaciones recién infectadas abortan con frecuencia hasta el 80% de las hembras. Cuanto antes se presente el aborto, más escasas son las manifestaciones apreciables. En preñeces sucesivas suele llegar a término el feto, aunque se registran casos de dos y tres abortos en la misma vaca. Son secuelas frecuentes del aborto la retención de la placenta y la metritis, (Blasco, J. 2011).

En el toro, se observan ocasionalmente orquitis y epididimitis. Puede estar afectado uno o ambos sacos escrotales con tumefacción aguda y dolorosa que aumenta hasta dos veces su tamaño normal. La tumefacción persiste durante largo tiempo y los testículos experimentan necrosis por licuefacción quedando finalmente destruidos. Las vesículas seminales son afectadas con frecuencia pudiendo advertirse su agrandamiento por palpación rectal. Los toros enteros suelen ser estériles cuando la orquitis es aguda, (Gómez, L. 2006).

6. Diagnostico

El diagnóstico de la Brucelosis se realiza mediante la utilización de distintos métodos serológicos y laboratorio; los que de acuerdo con las características de la enfermedad, permiten determinar la situación de la misma en el hombre, los animales y en el medio ambiente.

B. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Dos factores deben ser tomados en consideración: tipo de antígeno y pruebas serológicas, (Grandy, V. 2005).

1. Tipo de antígeno

El género *Brucella* tiene una característica única entre las bacterias Gram negativas que es la de tener especies permanentemente rugosas (*B. ovis*, *B. canis*), junto con especies lisas (*B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*) y con mutantes rugosas derivadas de estas últimas, (Blood, D. et al. 2007).

Las especies en fase lisa presentan los siguientes antígenos:

- Lipopolisacárido liso (LPS), localizado en la superficie de la bacteria, siendo el principal antígeno frente al cual aparecen anticuerpos (IgM, IgG), tanto en los animales vacunados como en los infectados.
- Polisacárido Beta (Poly B), que algunos llaman de Hapteno Nativo (HN), también localizado en la superficie. Los anticuerpos frente a este antígeno parecen depender de la intensidad del estímulo antigénico, puede ayudar en la diferenciación de vacunados e infectados.
- Proteínas de Membrana Externa (PME) y Citoplasmáticas (PC), aisladas y caracterizadas recientemente. Su función antigénica aún no está completamente esclarecida.

Las especies en fase rugosa presentan los siguientes antígenos:

- Lipopolisacárido rugoso (LPS-R), principal antígeno de la superficie de las brucelas rugosas. Se diferencia del LPS liso por una reducción en la proporción de polisacáridos de la cadena O.
- Proteínas de Membrana Externa (PME) y Citoplasmáticas (PC), su función es poco conocida.

2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas pueden ser clasificadas de acuerdo con el antígeno relacionado o de acuerdo con las clases y subclases de las inmunoglobulinas que intervienen, (Blood, D. *et al.* 2007).

a. Según el tipo de Antígeno.

- Lipopolisacárido (LPS).
- Seroaglutinación rápida, lenta, mercaptoetanol, antígeno acidificado tamponado (Rosa de Bengala), Rivanol, Coombs.
- Fijación de complementos (FC).
- Ensayo inmunoenzimático (ELISA).
- ELISA de Competición (Com Elisa).
- Hemoaglutinación indirecta (HI).
- Contrainmunolectroforesis (CIE).
- Haptenos nativos.
- Inmunodifusión radial (IDR).
- Doble difusión en gel (DDG).
- ELISA modificada.
- Proteínas de membrana externa.
- Western blotting.
- Proteínas citoplasmática (PC).
- Doble difusión en gel (DDG).
- Ensayo inmunoenzimático (ELISA).

b. Según el tipo de inmunoglobulina

- **IgM:** lentas, rápida, rosa de bengala, ELISA.
- **IgG:** lentas, rápida, rosa de bengala, ELISA, fijación de complemento, Rivanol, Coombs.
- **IgG1:** Rosa de bengala, fijación de complemento.
- **IgG2:** rápida y lenta, (Bowden, R. 2006).

C. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

La prueba ideal es la que reúne la capacidad de identificar infecciones latentes y crónicas, que diferencia animales vacunados de infectados y no sea influenciada por anticuerpos inespecíficos, el inconveniente es que aún no está disponible en el mercado.

1. La prueba de Huddleson

Es una reacción de aglutinación rápida en placa. Se enfrentan cantidades decrecientes del suero a investigar con cantidades constantes de antígeno y se observa la presencia o no de aglutinación. Existe una escala de títulos, establecida por convención, que permite la expresión de resultados. El Antígeno es una suspensión de *Brucellaabortus*, al 3 – 10% de gérmenes en fenol, con verde brillante y cristal violeta, (Bofill, P. 2010).

a. Técnica

Se coloca el suero con la pipeta en los cinco (pueden ser cuatro) cuadritos de las filas transversales de la placa de vidrio del aglutinómetro, empezando por el frente hacia atrás. La primera porción es de 0,08ml luego sigue la de 0,04ml, y a continuación las de 0,02 – 0,01 y 0,005 ml, (Ancha, P. 2013).

Inmediatamente se deja caer sobre cada porción de suero una gota de antígeno, cuya cantidad representa 0,03 ml; se mezclan bien los líquidos con palillos de dientes, empezando con la dilución menor hasta terminar con la de 0,08ml de suero. Una vez mezclado el suero con el antígeno, dicho suero queda diluido 1:25 - 1:50 – 1:100 – 1:200 y 1:400, como puede observarse en el cuadro 2.

Cuadro 2. CANTIDADES DE SUERO, ANTÍGENO Y DIÁMETROS DE LA PRUEBA DE HUDDLESON.

CANTIDADES DE SUERO, ANTÍGENO Y DIÁMETROS.			
Dilución	Cantidad de suero	Cantidad de antígeno	de Diámetros
1:25	0,08 ml	0,03 ml	27 mm
1:50	0,04 ml	0,03 ml	24 mm
1:100	0,02 ml	0,03 ml	21 mm
1:200	0,01 ml	0,03 ml	18 mm
1:400	0,005 ml	0,03 ml	15 mm

Fuente: Ancha, P. (2013).

Terminada la operación de mezcla se aconseja levantar el vidrio y darle movimientos rotatorios a fin de que el líquido se mueva constantemente mientras la lámina se mantiene horizontal. Transcurridos tres minutos del contacto del suero con el antígeno, se realizara la lectura, aunque se puede esperar hasta ocho minutos; para realizar la lectura es necesario encender la luz del aglutinómetro. En las reacciones negativas no se altera el estado homogéneo de la mezcla, en cambio en las positivas se advierte el agrupamiento de las bacterias en forma de grumos, lo cual es muy notorio, (Campos, L. 2007).

Interpretación: Se hace solamente tres clasificaciones: Aglutinación completa (c), es aquella en la que el líquido de la mezcla suero antígeno aparecen claro y la agitación suave no rompe los grumos; aglutinación incompleta (I) es aquella en la que la mezcla suero antígeno es parcialmente clara y la agitación no rompe los grumos; aglutinación negativa (-), es aquella en la que la mezcla suero antígeno no aparece clara y una suave agitación no revela grumos, (Campos L. 2007).

Para la interpretación de los resultados debe tomarse en cuenta que las aglutinaciones completas en diluciones 1:1000 o más altas pueden ser consideradas como positivas y la ausencia de aglutinación a la dilución 1:50 como negativa; las reacciones en las diluciones de 1:50 pero no mayores, son consideradas como sospechosas, tal como se observa en el cuadro tres.

Cuadro 3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE HUDDLESON.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS				
1:25	1:50	1:100	1:200	Interpretación
-	-	-	-	Negativa
	-	-	-	Negativa
+	-	-	-	Negativa
+		-	-	Sospechosa
+	+	-	-	Sospechosa
+	+		-	Sospechosa
+	+	+	-	Positiva
+	+	+		Positiva
+	+	+	+	Positiva

Fuente: Campos, L. (2007).

2. Rosa de Bengala

La técnica de Rosa de Bengala es una prueba de screening que se caracteriza por ser de alta sensibilidad y niveles menores de especificidad, lo que quiere decir que se obtienen resultados falsos negativos pero sí en algunos casos falsos positivos ya que puede producir reacciones cruzadas con otras bacterias.

Por lo tanto se recomienda que todos los resultados POSITIVOS a Rosa de Bengala sean confirmados mediante la técnica de Elisa indirecto o Elisa Competitivo para *Brucellas*.

Es una prueba de aglutinación, utiliza células completas de *Brucella abortus* cepa 1119-3 coloreadas con rosa de bengala a un pH de 3,65 el pH bajo previene la aglutinación por IgM y estimula la aglutinación por IgG1, reduciendo alteraciones no específicas. Es considerada útil para el tamizaje individual de animales. La prueba consiste en hacer reaccionar el suero sanguíneo del bovino con el rosa de bengala, (Carter, G. 2008).

a. Proceso analítico

- Separación de las muestras a analizar mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos.
- Extracción del suero e identificación de tubos eppendorf.
- Colocar en la placa de vidrio 30 μ L de suero en cada uno de los pocillos de reacción y 30 μ L de reactivo rosa de bengala.
- Homogenizar la muestra.
- Someter a agitación durante 4 minutos a 3000 rpm.
- Leer los resultados.
- Conservar los tubos eppendorf en congelación a -20°C , (Carter, G. 2008).

Los resultados se reportan en forma cualitativa más no cuantitativa de aglutinación, por medio de cruces. Por su fácil realización, es muy útil como prueba de despistaje inicial o “screening”; cuyo reporte se hace para cualquier grado de aglutinación (+) y ausencia de aglutinaciones (-).

- Negativo: se aprecia un color rosado uniforme sin aglutinación ni formación de gránulos.
- Positivo: se consideraron positivos todos aquellos sueros que presentaron aglutinación, desde muy ligera hasta la formación de gránulos grandes. La aglutinación perceptible se considera positivo. Los gránulos se aprecian teñidos y el líquido tomó un color semitransparente.

Cualquier grado de aglutinación es considerado positivo.

3. Brucella Elisa Competitiva

La prueba de *Brucella abortus* C- ELISA-Ab está diseñado para detectar, anticuerpos específicos contra *Brucella abortus* en muestras de suero de animales domésticos y salvajes, por lo tanto éste test es aplicable a múltiples especies. El test se basa en la técnica del enzima-inmuno ensayo competitivo en fase sólida, pudiendo distinguir entre animales infectados y animales vacunados con la Cepa Cotton 19 de *Brucella abortus*, (Casillas, F. 2005).

Es un test de ELISA diseñado para ser comparado con el Test de Fijación de Complemento.

Las placas microtiter se encuentran tapizadas por un lipopolisacárido (S-LPS), de la bacteria, junto con un anticuerpo monoclonal (mAb) específico para un epítipo de la porción o-polisacárido del antígeno S-LPS. Una vez añadidas las muestras a los pocillos de la placa y después de un tiempo de incubación, las placas se lavan y a continuación se incuban con un anticuerpo anti-mouse IgG conjugado con peroxidasa. La aparición de color se debe a la conversión del sustrato por el conjugado, la densidad óptica es medida en un fotómetro a 450 nm.

En ausencia de anticuerpos anti-*Brucella* en el suero problema (suero negativo), el anticuerpo monoclonal (mAb), se unirá al epítipo de la porción o-polisacárido del antígeno S-LPS, con la consiguiente aparición de color. Si la muestra contiene anticuerpos específicos de *Brucella* (suero positivo), éstos competirán con el anticuerpo monoclonal (mAb) e inhibirán su unión al epítipo de la porción o-polisacárido del antígeno S-LPS y la consiguiente no aparición de color. Muestras procedentes de animales vacunados, con la cepa C19 no competirán con el anticuerpo monoclonal (mAb), debido a su especificidad y baja afinidad, dando como resultado una reacción negativa. Pueden haber casos de falsos positivos si las muestras de suero son tomadas antes de 6 meses después de la vacunación del animal, (García, C. 2005).

a. Procedimiento

Todos los reactivos deben ser preparados a temperatura ambiente: 18-25 °C. La dilución de las muestras y de los controles puede hacerse de dos formas distintas:

Prediluyendo la muestra antes de añadir al pocillo

- Prediluir los tres controles y las muestras a testar 1/10 en tubos separadamente añadiendo a 20µl de cada muestra 180µl de Buffer de Dilución de muestra.
- Añadir 50 µl de Buffer de Dilución de muestra a dos pocillos elegidos previamente como control del conjugado (Cc).

- Añadir 50 µl de cada muestra prediluida y de cada control prediluido en los pocillo.

Se recomienda duplicar los controles.

Añadiendo directamente la muestra y los controles al pocillo.

- Dilución de las muestras y de los controles en el pocillo directamente.
- Añadir 45 µl de Buffer de Dilución de muestra en cada pocillo.
- Añadir 5 µl de cada control en los pocillos elegidos previamente para los controles.
- Se recomienda duplicar los controles.
- Añadir 50 µl de Buffer de Dilución de muestra a dos pocillos elegidos previamente como Control del Conjugado (Cc).
- Añadir 5 µl de cada muestra a los pocillos apropiados.
- Añadir 50 µl de la Solución mAb, preparada previamente, a todos los pocillos incluidos los controles.

Nota: el tiempo transcurrido desde añadir las muestras hasta añadir el anticuerpo monoclonal (mAb), no debe ser superior a 10 minutos.

- Agitar la placa suavemente a temperatura ambiente durante 5 minutos, para asegurar una mezcla homogénea en los pocillos de la placa.
- Incubar a temperatura ambiente (+18-25°C) durante 30 minutos.
- Lavar los pocillos cuatro veces con PBS-Teewn.
- Añadir 100 µl de Conjugado en cada pocillo. Agitar e incubar a temperatura ambiente (+18-25°C) durante 30 minutos.
- Lavar cuatro veces cada pocillo con PBS-Teewn.
- Añadir 100 µl Solución Sustrato a cada pocillo e incubar 10 minutos a

temperatura ambiente (+18-25°C).

- Parar la reacción añadiendo 50 µl de Solución de Frenado a cada pocillo, agitar la placa. Añadir la Solución de Frenado en el mismo orden que la solución Sustrato.
- Medir la densidad óptica (OD), en un fotómetro para placas microtiter a 450 nm (usar una placa vacía como el control blanco). Se recomienda medir las densidades ópticas (OD) quince minutos después de añadir la solución de frenado para evitar fluctuaciones en los valores. (Contreras, F. 2006).

b. Cálculos

- Calcular los valores de Densidad Óptica (OD), para los controles y las muestras.
- Calcular el Porcentaje de Inhibición (PI), para las muestras y para los controles de la siguiente manera:

$PI = 100 - OD \text{ del control o muestra} \times 100 / \text{Densidad Óptica (OD) del Control del Conjugado (Cc)}$.

Ejemplo: $PI = 100 - 0,300 \times 100 / 1,030 = 70,9 \%$, (Contreras, F. 2006).

c. Controles

Para validad el test, los controles deben estar entre los siguientes límites:

- Densidad Óptica del Control del Conjugado = 0,75-2,0
- PI Control Positivo = 90-110
- PI Control Positivo Débil = 35- 65
- PI Control Negativo = -10- 15

Si el test según alguno de los parámetros anteriores resultara inválido, se debe repetir el ensayo.

d. Muestras

Para clasificar una muestra como positiva o negativa seguir el siguiente parámetro.

PI = ESTATUS

- < 30 % = NEGATIVA
- >= 30 % = POSITIVA

NOTA: Muestras negativas pueden proceder de animales que han sido vacunados con *B. abortus*, (Flores, C. 2012).

4. Otras pruebas importantes y complementarias para el diagnóstico**a. Prueba del anillo en leche (Ring Test)**

De gran utilidad para identificar rebaños infectados. El antígeno se colorea con Hematoxilina (azul) y se realiza adicionando 1 gota (0,03 ml), a 1ml de leche fresca. En la reacción positiva las brúcelas suben a la superficie con los glóbulos de grasa, formando un anillo coloreado, (LIDIVET. 2006).

Esta prueba es útil cuando se emplea en las plantas de tratamiento de leche y debe ser utilizada en la mezcla de leche de varios animales. Puede también emplearse como forma de diagnóstico individual mediante una leve modificación de la técnica. Podemos hallar falsos positivos en el caso de leches calostrales, ácidas o de animales con mastitis.

b. Fijación de complemento

Considerada la más sensible y específica, tiene en contra él no estar estandarizada y el ser una prueba muy laboriosa, (Luna, M. 2007).

c. Prueba de rivanol

Se usa el colorante de acridina para precipitar los IgM; después se centrifuga el suero en presencia de rivanol el sobrenadante se une en el test. El antígeno también contiene rivanol y la positividad significa presencia de IgG, (Pachame, A. 2005).

d. Prueba de 2mercaptoetanol (2ME)

En esta prueba los anticuerpos del tipo IgM son degradados por los radicales TioI; se realiza al tiempo con la prueba lenta y la interpretación se realiza por comparación entre las dos. Si hay títulos significa presencia de IgG, (Lopez, A. *et al.* 2008).

e. Prueba de Inmunodifusión Radial (IDR)

Se emplea como antígeno el polisacárido Beta o Hapteno Nativo, el cual se adiciona el agar. Se coloca el agar en cajas petri con agujeros para evaluar, los sueros positivos presentan un anillo de precipitación alrededor del antígeno. Algunos estudios indican que animales vacunados con Cepa Cotton 19, dan reacción negativa en esta prueba y animales infectados dan positivo, (Ocadiz, J. 2009).

f. Pruebas alérgicas

Se usan para evidenciar la inmunidad mediada por las células (hipersensibilidad tardía). Refleja la respuesta de los linfocitos T y macrófagos sensibilizados frente al antígeno de *Brucella*. Son usadas en forma de pruebas cutáneas (skin test), en la prueba positiva aparece en la región de la inoculación, un eritema 24 horas después, máximo 48 a 72 horas.

El producto empleado se llama brucelina y puede dar una reacción positiva en animales vacunados lo que limita un poco su uso rutinario.

D. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

1. Sensibilidad y especificidad de las pruebas

Se entiende por sensibilidad de una prueba la capacidad que tiene para detectar animales infectados por el agente específico, en este caso *Brucella*. De esta manera, si la prueba que se usa da reacción positiva en 98 animales de 100 bovinos infectados se dirá que la prueba tiene 98 % de sensibilidad. El 2% restante son "falsos negativos".

En un programa de erradicación interesa mucho que la prueba empleada sea lo suficientemente sensible para que el grado de error por "falsos negativos" sea el menor posible, ya que el objetivo es eliminar todo foco de infección de un hato. Ninguna prueba es capaz de descubrir el 100 % de los bovinos infectados. La especificidad en cambio mide el grado de capacidad de la prueba para detectar el mayor número de infecciones específicas y el menor número de "falsos positivos".

Una prueba altamente específica será la que dé menos reacciones de "falsos positivos". Si de 100 animales no infectados, la prueba da reacciones positivas en 5 animales, decimos que la misma tiene una especificidad del 95%. Una prueba poco específica es causa por consiguiente del sacrificio de animales sanos y de pérdidas económicas innecesarias. Ninguna prueba serológica sin embargo es 100 % específica, (Ruiz, M. 2006).

2. Las pruebas de seroaglutinación

Estas pruebas son ampliamente usadas para el diagnóstico de la brucelosis. Sin embargo cuando la proporción de hatos infectados y la prevalencia global de la infección llegan a tasas reducidas, aparecen junto con las limitaciones de las pruebas en los hatos problema, en los cuales hay que recurrir a otras pruebas para poder erradicar la enfermedad. En las pruebas de seroaglutinación predominan la reacción con las IgM. Las IgG 1 e IgG 2 difieren en su actividad. La IgG1 tiene poco poder aglutinante, mientras que la IgG 2 es activa en la prueba, (Villagas, L. *et al.* 2014).

3. Los "falsos positivos"

Los "falsos positivos" en las reacciones se deben a varias causas, tales como anticuerpos residuales por la vacunación con cepa Cotton 19 y reacciones cruzadas debidas a anticuerpos originados por bacterias que tienen lipopolisacáridos superficiales similares a los de *Brucella*. Ya se dijo que hay una pequeña proporción de animales especialmente los vacunados a una edad tardía que puede mantener anticuerpos aglutinantes que persisten durante mucho tiempo.

Las reacciones en estos casos se deben a la inmunoglobulina M, ya que la IgG 2 generalmente desaparece rápidamente y la IgG 1, tiene poca actividad en la prueba y además su concentración se reduce al poco tiempo después de la vacunación.

El origen de muchas reacciones inespecíficas de los bovinos no se conoce. Sin embargo se sabe que algunas salmonellas dan reacciones cruzadas. Se ha comprobado que hay una relación antigénica entre *Brucella* *Escherichiacoli* y *Yersinia* *enterocolitica*, (Ruiz, M. 2006).

4. Los "falsos negativos"

Los "falsos negativos" en las pruebas de aglutinación se presentan durante el período de incubación es decir desde la exposición a la infección hasta la aparición de las aglutininas.

En hembras expuestas por primera vez a la infección durante la gestación es frecuente que las aglutininas aparezcan varios días a dos semanas después del aborto o del parto. Además hay animales infectados que nunca alcanzan un título aglutinante significativo.

De especial interés son algunos animales con infección crónica, que se encuentran en los llamados "hatos problema" y en los cuales las IgM han bajado a un nivel no diagnóstico y casi todos los anticuerpos están constituidos por IgG, (Ruiz, M. 2006).

5. Procedimientos a seguir con hembras y machos de reacción sospechosa

Los animales sospechosos a la prueba de aglutinación deben ser examinados en la próxima prueba general del hato. Si es posible a los 30 días, con el fin de clarificar su estado frente a la infección sobre la base del aumento, estabilidad o reducción del título. Si el título se incrementa es indicación que el animal está enfermo; si disminuye, se le otorga la clasificación de negativo. Más difícil es decidir sobre los animales con títulos estables del rango de sospechoso, que deberán ser eliminados o sometidos a pruebas complementarias. En toros con títulos bajos es conveniente además de las pruebas complementarias recurrir a la prueba de aglutinación en

plasma seminal ya que a veces se comprueban títulos más altos en semen que en suero, (AGROCALIDAD. 2009).

E. INMUNIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD

1. Inmunización de hatos

El punto clave para la prevención de la brucelosis en el ganado bovino es mediante vacunación. Las dos vacunas mundialmente más utilizadas contra la brucelosis bovina son: la Cepa Cotton 19 y la Cepa RB51.

a. Vacuna cepa Cotton 19

La vacuna cepa Cotton 19 de *Brucellaabortus* es la más ampliamente utilizada para prevenir la brucelosis en el ganado bovino, continúa siendo la vacuna de referencia con la que se compara el resto de vacunas. Se utiliza como una vacuna viva que por lo general se suministra a terneras entre 3 y 8 meses como una dosis única subcutánea de $5-8 \times 10^{10}$ viables. Se puede administrar al ganado adulto una dosis reducida de 3×10^8 a 3×10^9 microorganismos, pero algunos animales desarrollan títulos duraderos de anticuerpos y pueden abortar y excretar la cepa vacunal por la leche. Alternativamente, se puede administrar a ganado de cualquier edad en dos dosis de $5-10 \times 10^9$ microorganismos viables por vía conjuntival; esto produce protección sin una respuesta duradera de anticuerpos y reduce los riesgos de aborto y de excreción en la leche.

La vacuna con *Brucellaabortus* cepa Cotton 19 induce una buena inmunidad frente a desafíos moderados por microorganismos virulentos. La vacuna debe prepararse de inóculos derivados del Departamento de Agricultura de los EAU. - USDA y cada lote ha de probarse para pureza (ausencia de microorganismos extraños), viabilidad (bacterias vivas por dosis) y homogeneidad (determinación de la fase de disociación). Los lotes de inóculo para la producción de vacuna S19 deben comprobarse regularmente en ratones para virulencia residual e inmunogenicidad, (Melean, A. 2010).

1) Características

- Es una cepa lisa, gram negativa que posee íntegro su Lipopolisacárido (LPS) incluyendo la cadena "O", responsable de inducir los anticuerpos que reaccionan con los antígenos para el diagnóstico.
- Confiere protección a por lo menos el 70 % de los animales vacunados.
- Es una vacuna muy estable pues no se ha observado cambios en su virulencia o inmunogenicidad, (Agro Meat. 2012).

2) Ventajas

- Induce altos niveles de protección.
- Se utiliza en la vacunación de terneras entre 3 y 8 meses de edad contra Brucelosis. (Sánchez, C. 2011).

3) Desventajas

Los anticuerpos temporales que produce no se diferencian de los generados por una infección, provocando una interferencia momentánea con el diagnóstico, (Sánchez, C. 2011).

b. Vacuna RB51

Respecto a la vacuna RB51 de *Brucella abortus* desde 1996 esta cepa es la vacuna oficial en muchos países para la prevención de la brucelosis en el ganado vacuno. Sin embargo, su eficacia e inocuidad en comparación con la S19 son motivo de controversia. Cada país utiliza métodos ligeramente diferentes de administrar la vacuna. En EE.UU. las terneras se vacunan subcutáneamente entre los 4 y 12 meses con $1-3,4 \times 10^{10}$ microorganismos viables de la cepa RB51. La vacunación de ganado de mayor edad solo se hace bajo autorización de organizaciones estatales o federales de salud animal y la dosis recomendada es de 1×10^9 microorganismos viables. En otros países se recomienda la vacunación de terneros (4-12 meses), con dosis de $1-3,4 \times 10^{10}$, y la revacunación de 12 meses en adelante con una dosis similar para inducir un efecto de recuerdo y aumentar la

inmunidad.

Se ha descrito que cuando se administran intravenosamente al ganado dosis completas de RB51 se induce placentitis grave e infecciones placentarias en la mayoría del ganado vacunado y que un número notable de éstos excreta microorganismos en la leche.

Las experiencias de campo también indican que en algunos casos puede provocar aborto si se aplica a vacas grávidas. Debido a estas observaciones se debe evitar la vacunación de vacas grávidas. Un modo de reducir los efectos colaterales de RB51 es reducir la dosis. Con la dosis reducida de esta vacuna (1 x 10⁹ unidades formadoras de colonias [CFU] no se producen abortos ni lesiones placentarias en el ganado vacunado subcutáneamente, aunque un porcentaje significativo de estos animales excreta la cepa vacunal. Sin embargo, esta dosis reducida no protege contra *B. abortus* cuando se usa en la vacunación de terneros, aunque lo hace cuando se aplica a adultos, (Solé, V. 2013).

1) Características

- Cepa rugosa, que impide la aparición de serología positiva al vacunar o revacunar.
- No incluye serología que interfiera con el diagnóstico.
- Más atenuada que la cepa 19 (al vacunar animales preñados causa menos abortos).
- Más segura para el vacunador.
- Permite la revacunación de los animales a cualquier edad y múltiples veces, (TECNO VET. 2010).

2) Ventajas

- Protege contra la brucelosis del bovino.
- No produce falsos positivos porque los diagnósticos tradicionales no la detectan

en el suero de los animales vacunados. (No confunden el diagnóstico).

- Se puede vacunar a cualquier edad debido a que no es detectada en el suero (no confunde el diagnóstico) pero con el fin de prevenir el contagio temprano, se recomienda vacunar las terneras entre 4 y 10 meses (La edad ideal es cercano a los 5 meses), (TECNO VET. 2010).

2. Inmunidad Natural

Los terneros infectados in útero, o por contagio después del nacimiento, generalmente permanecen infectados solo un corto tiempo, a menos que se les crie con leche infectada o se mantengan en un ambiente infectado. Si se les pone fuera de contacto con la infección, después de varias semanas el germen desaparece y el animal se desarrolla normalmente.

Los animales adultos que nunca han estado en contacto con la infección son los más susceptibles para adquirirla y los que abortan con mayor facilidad cuando están infectados. El animal que ha abortado una vez o que se ha infectado en estado adulto o sin abortar, no adquiere fácilmente la infección por segunda vez.

Esto indica el desarrollo de un grado de inmunidad como resultado de la primera infección. A menudo esta inmunidad no es lo bastante intensa como para prevenir un segundo o tercero y hasta un cuarto aborto. En general, la mayoría de los animales después de uno o dos abortos, llevarán a término sus terneros, aunque permanezcan infectados.

Parece existir un grado considerable de variación en la resistencia individual de las vacas. Algunos animales parecen ser totalmente resistentes, tanto a la infección natural como a la artificial, aunque su sangre no contenga anticuerpos; en cambio otros animales son infectados fácil y repetidamente, (LIDIVET. 2006).

3. Influencia de la vacunación sobre el diagnóstico

La vacunación tiene indudables ventajas pero también algunas desventajas. El inconveniente mayor es que la vacuna induce la formación de anticuerpos que

pueden confundir el diagnóstico. Para contrarrestar este inconveniente se debe vacunar entre los 3 y 8 meses de edad. Cuanto más joven es el animal, menor tiempo retiene los anticuerpos debido a la vacunación. Las hembras vacunadas a los 3 meses se vuelven negativas dos meses después de la vacunación, en cambio las vacunadas a los 6 meses tardan en hacerlo 6 meses y las vacunadas a los 9 meses (fuera de la edad permitida), mantienen la clasificación de sospechosa 15 meses después de la vacunación. En términos generales se puede afirmar que el 95 % de las hembras vacunadas a los 3-8 meses se negativizan a la edad de 2 años, (Valero, G. 2008).

Otro aspecto es la infección residual por la vacuna. La cepa Cotton 19 produce en general un proceso de infección de corta duración en los animales vacunados. Sin embargo en algunos animales se ha podido comprobar una infección duradera y persistente en el tejido mamario, con aislamiento de la cepa vacunal en leche.

Estos animales no pueden distinguirse de los infectados por cepas a campo mediante pruebas serológicas. Afortunadamente la proporción de estos animales es muy baja 2-3 /100.000 terneras vacunadas.

La inoculación del ganado con Cepa Cotton 19 induce una protección significativa contra abortos o infecciones causadas por cepas virulentas de *B. abortus* y entrega inmunidad casi de por vida contra la brucelosis. Aun así, en nuestro país, siendo la vida útil del ganado lechero de 12 años, los animales ya no presentan anticuerpos, y si los presentan no se sabe con certeza si se trata de anticuerpos persistentes debido a la vacunación o a una infección, (Solis, T. 2008).

4. Evolución de las inmunoglobulinas en animales vacunados e infectados

La vacunación con la Cepa Cotton 19 estimula la aparición de IgM al cabo de unos 5-7 días y alcanzan su máxima concentración a las 2-3 semanas. Luego su concentración en el suero va reduciéndose pero sin desaparecer durante varios meses. Las IgG aparecen casi al mismo tiempo, o algo más tarde, y alcanzan su máxima concentración de 28 a 42 días después de la vacunación.

Estas inmunoglobulinas desaparecen más rápidamente que las IgM, perdurando unos 6 meses después de la vacunación de terneras jóvenes. La infección natural o experimental con cepas de *Brucella abortus* virulentas va seguida de la formación de IgM e IgG, pero la concentración de IgM declina, mientras que la IgG tiende a persistir todo el tiempo que el animal está infectado.

En animales con Brucelosis crónica la IgG es la inmunoglobulina principal y a veces la única detectable. En consecuencia, la diferencia principal entre animales vacunados e infectados es la perdurabilidad de la IgG en estos últimos, a las pruebas del 2 mercaptoetanol, Rivanol, Fijación de Complemento, (Valero, G. 2008).

Brucella abortus RB51 es una cepa rugosa, resistente a rifampicina, que ha sido derivada de la cepa virulenta *Brucella abortus* 2308. Esta vacuna es recomendada actualmente para el uso como vacuna para terneros a una dosis entre 1×10^{10} y 3.4×10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC), (Rentería, T. *et al.* 2003).

Adicionalmente, origina buena protección contra abortos y no produce un resultado detectable en las pruebas serológicas utilizadas en los programas convencionales de vigilancia contra brucelosis, lo que constituye una ventaja sobre la vacuna cepa 19. La protección que proporciona la vacunación con esta cepa se debe a la activación de linfocitos T. La vacunación induce altos niveles de IFN- γ , lo cual es fundamental en las etapas primarias de la infección. La vacunación del ganado permite la diferenciación entre bovinos vacunados y aquellos que no fueron vacunados.

5. Presentación gráfica de la relación de la edad de vacunación y el nivel y persistencia de IgG

La vacunación de terneras con Cepa Cotton 19 es obligatoria para todos los hatos del país. En los hatos donde se está en proceso de erradicar la infección o ya fue erradicada, interesa evitar al máximo la interferencia que puedan tener los anticuerpos originados por la vacunación con el diagnóstico de la enfermedad, (Valero, G. 2008). Anteriormente se expresó que cuanto más joven es el animal al

vacunar tanto más rápidamente desaparecen los anticuerpos post vacunales, (Solis, T. 2008).

La relación del tenor y persistencia de los anticuerpos IgM e IgG en relación a la edad de vacunación. Los gráficos 1 y 2 muestran la diferencia en el aspecto mencionado, cuando se vacunan terneras de 4 a 6 meses o de 8 meses de edad.

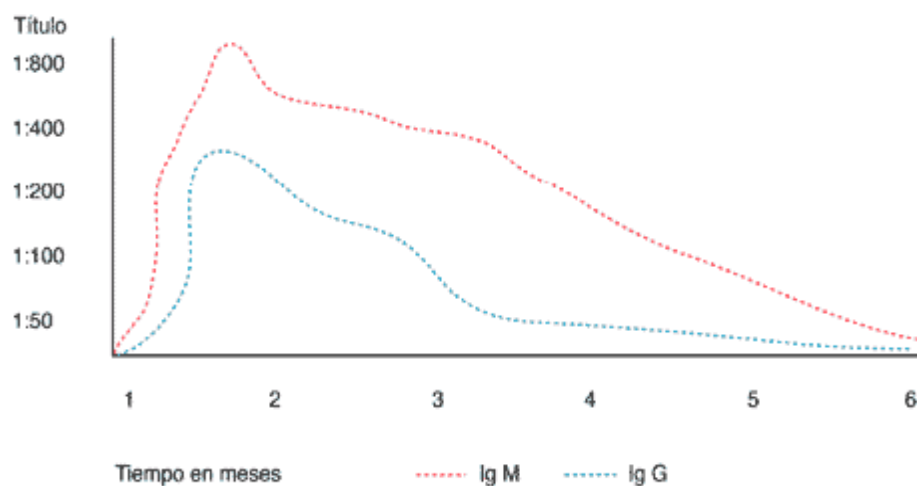


Gráfico 1. Representación esquemática de los resultados de la prueba de aglutinación con sueros de terneras vacunadas con Cepa Cotton 19 entre 4 y 6 meses de edad, (Valero, G. 2008).

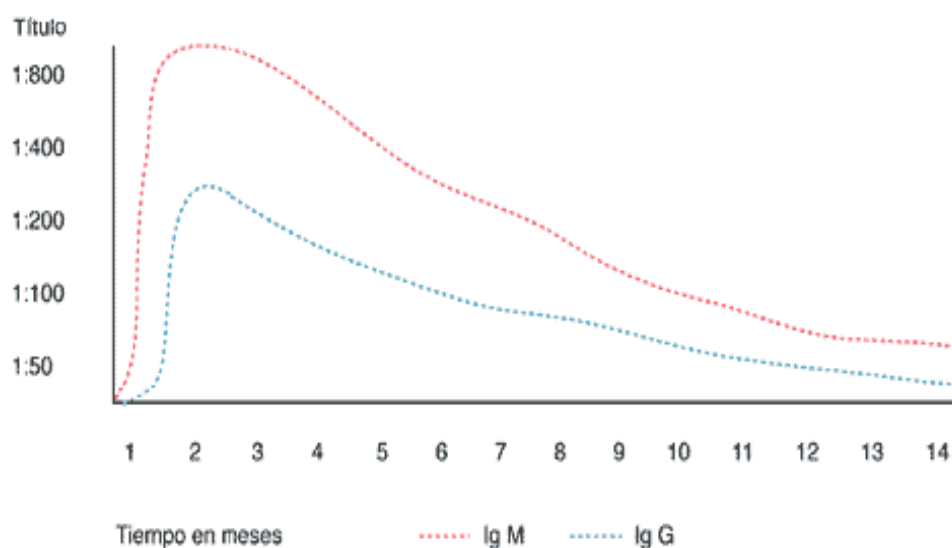


Gráfico 2. Representación esquemática de los resultados de la prueba de aglutinación con sueros de terneras vacunadas con la vacuna Cepa Cotton 19 a los 8 meses de edad, (Valero, G. 2008).

Según se puede observar, los anticuerpos a títulos significativos no solo desaparecen más rápidamente en terneras vacunadas entre 4 y 6 meses de edad, sino que el nivel de la IgG es mucho menor y menos persistente que cuando se vacunan animales a los 8 meses y con más razón a mayor edad. Vacunando a edad temprana no solamente se reduce el riesgo de títulos persistentes a la prueba de seroaglutinación, sino también a las pruebas complementarias. De ahí la recomendación de vacunar a temprana edad en los establecimientos donde se está erradicando la brucelosis, (Ruiz, M. 2006).

6. Pautas de IgM e IgG en animales infectados no vacunados y vacunados

El gráfico 3, representa solo un animal y las pautas de la seroaglutinación pueden variar en diferentes individuos, de acuerdo a la dosis de exposición y vía de inoculación, el ejemplo ilustra que las inmunoglobulinas M se forman como una respuesta específica y son importantes para el diagnóstico, especialmente al principio de la infección. Cuando una hembra vacunada se infecta por una cepa virulenta, los anticuerpos IgG reaparecen más pronto debido a la memoria inmunológica, (Manrique, J. 2010).

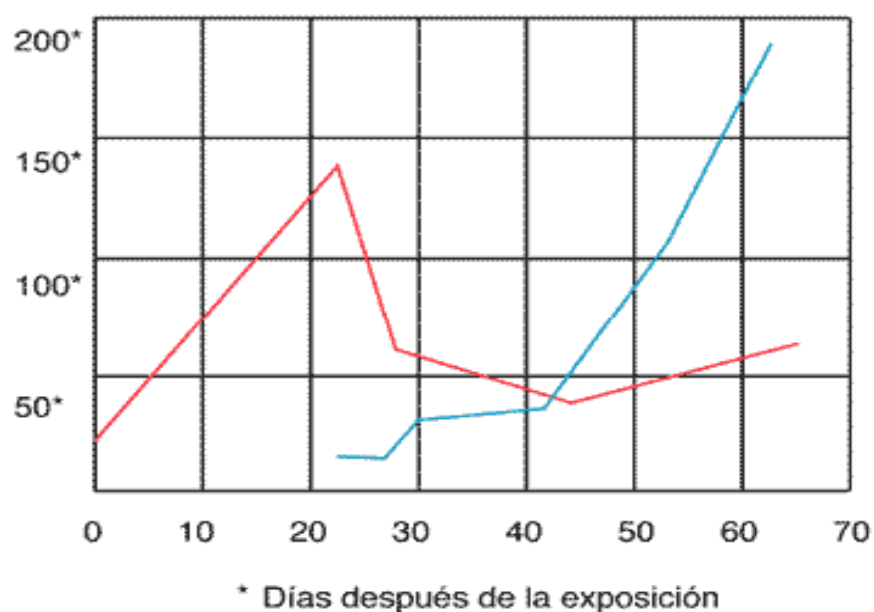


Gráfico 3. Desarrollo secuencial de IgM y IgG en una vaquillona, sin antecedentes de vacunación, expuesta a una cepa de B. abortus.

F. PLAN DE CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA

La Brucelosis bovina según Escobar, F. (2011), puede controlarse con un programa de vacunación eficaz, o bien erradicarse usando un programa de prueba y sacrificio. La vacuna con cepa Cotton 19 disminuye marcadamente la incidencia de abortos, pero no disminuye con ello el nivel de infección a una tasa correspondiente. Aún con el programa de vacunación generalizada habrá focos de infección que se perpetúen indefinidamente. La erradicación total es una de las alternativas de control mediante la vacunación y en algunos países ya se ha alcanzado este estado de la enfermedad y en otros se están llevando a cabo programas de erradicación. Se dispone actualmente de un modelo de informático para analizar la rentabilidad de ciertos programas de erradicación.

Para poder lograr la erradicación se debe insistir en que la detección de animales positivos a las pruebas serológicas, tiene que ir seguida del sacrificio de los reactores positivos. Esta decisión imperativa de eliminar los reactores es la que define la marcha de una campaña de erradicación.

El Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) a través de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro – AGROCLAIDAD- presenta el Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina, que recoge las actividades que se deben ejecutar para disminuir la prevalencia de Brucelosis Bovina en el Ecuador, hasta alcanzar niveles compatibles con la erradicación.

Este Programa, que nació como una propuesta de la Autoridad Sanitaria Nacional (AGROCALIDAD), en cumplimiento de su obligación institucional, fue analizada y consensuada con las organizaciones de ganaderos e industriales de la leche y la carne, así como con algunas instituciones universitarias y centros de investigación agropecuarios, quienes presentaron observaciones y sugerencias que fueron incorporadas en el presente documento, (Agrocalidad, 2009).

1. Estrategias De Prevención Y Control

a. Estrategia Nacional

El éxito del Programa se basa en la ejecución de estrategias diferenciales, para cada una de las regiones epidemiológicas señaladas, las que sin embargo tienen aspectos comunes de acción, que se indican a continuación:

La vacunación con vacuna Cepa 19 se aplicará en terneras nacidas en la propiedad, una sola vez a la edad de 3-6 meses. La vigilancia epidemiológica se basará en el diagnóstico de predios y animales mediante las pruebas de Ring-Test en leche y de aglutinación en suero sanguíneo (Rosa de Bengala) y como pruebas confirmatorias el ELISA Competitivo (c-ELISA) y otras pruebas autorizadas por la OIE.

La eliminación de vacas positivas guardará flexibilidad en atención a los períodos de lactancia o gestación, para luego ser destinadas a sacrificio sanitario en camales autorizados para el efecto. La compra de hembras con fines de reemplazo se hará solo de predios libres y con resultados negativos a pruebas serológicas.

Vacas en producción infectadas se separarán del resto de bovinos sanos en la propia finca hasta terminar la lactancia, momento en el que se destinará a sacrificio en camal sanitario. La compra de hembras con fines de reemplazo, se hará solo cuando estas hayan sido vacunadas a la edad de terneras (3 a 6 meses) y presenten resultados negativos a la serología complementaria, 30 días previos al ingreso de la finca, (AGROCALIDAD. 2009).

b. Estrategias Regionales

Las estrategias diferenciadas para cada región son las siguientes:

1) Regiones de alta prevalencia (Sierra norte y Costa)

La estrategia se orienta a la creación de una sólida inmunidad poblacional mediante la ejecución de campañas sistemáticas de vacunación, acciones de vigilancia epidemiológica, dirigidas a la identificación y certificación de fincas libres, eliminación obligatoria de reactores positivos, control sanitario de ingreso y egreso de animales, y actividades de educación sanitaria.

2) Regiones de baja prevalencia (Sierra sur y Amazonia)

Hace relación especial a la vigilancia epidemiológica orientada a la identificación, mantenimiento y ampliación de micro áreas y predios libres de la enfermedad, vacunación en áreas infectadas, eliminación obligatoria de reactores positivos, control de ingreso y egreso de animales, y educación sanitaria.

3) Región indemne (Galápagos)

En las Islas Galápagos se realizará una encuesta sero-epidemiológica de acuerdo con las directivas de la OIE para determinar zonas libres, actividades de vigilancia epidemiológica, control de ingreso y egreso, y movilización de ganado.

- La vacunación con vacuna Cepa 19 para la prevención de brucelosis se aplicará en terneras nacidas en la propiedad, una sola vez a la edad de 3-6 meses.
- La vigilancia epidemiológica se basará en el diagnóstico de predios y animales mediante las pruebas de Ring-Test en leche y de aglutinación en suero sanguíneo (Rosa de Bengala) y como pruebas confirmatorias el ELISA Competitivo (c-ELISA) y otras pruebas autorizadas por la OIE.
- La eliminación de vacas positivas guardará flexibilidad en atención a los períodos de lactancia o gestación, para luego ser destinadas a sacrificio sanitario en camales autorizados por AGROCALIDAD.
- La compra de hembras con fines de reemplazo se hará solo de hatos libres y con resultados negativos a pruebas serológicas de brucelosis.

- A nivel nacional, en base a la solicitud de los ganaderos interesados, se realizará la Certificación de Fincas Libres de Brucelosis Bovina, para lo cual se deberán cumplir los requisitos de ingreso y permanencia en el programa respectivo.

c. Vigilancia Epidemiológica

El Sistema de Vigilancia Epidemiológica prevé la incorporación de las siguientes fuentes de información:

- Red de laboratorios veterinarios: reportarán información periódica sobre los resultados de las pruebas diagnósticas realizadas, individualmente o a nivel de rebaños, cepas aisladas e identificación de serotipos, entre otros aspectos.
- Industrias lácteas: informarán sobre la nómina de abastecedores de leche cruda, realización de pruebas de anillo en bidones y los resultados del diagnóstico.
- Los camales sanitarios: informarán mensualmente el número de bovinos brucelósicos sacrificados, destinos de las carcasas y las fincas de origen de esos animales.
- Ministerio de Salud Pública: a través de la Dirección de Epidemiología comunicará a AGROCALIDAD/Nivel Central, casos de brucelosis en humanos, número de personas afectadas, ocupación y localidades en las cuales fueron diagnosticadas.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca: la estructura operativa del Programa incorpora a los diferentes niveles de AGROCALIDAD/MAGAP desde los cuales se generará información sobre la conducta de la enfermedad, así como sobre las diferentes acciones de prevención y control, las mismas que serán difundidas nacional e internacionalmente.

- Las Organizaciones de Ganaderos, los Veterinarios y Profesionales afines al sector debidamente autorizados informarán a AGROCALIDAD/-Coordinaciones Provinciales sobre las fincas atendidas con vacunación, número de vacunaciones realizadas, retenciones placentarias y abortos asistidos, el material biológico colectado y resultados de laboratorio obtenidos

Las actividades sanitarias de control de movilización de ganado, las realizará AGROCALIDAD en colaboración con los ganaderos e industriales que participen en el Programa, se vincularán a las estrategias regionales de control de la brucelosis, que son: control estricto de la salida de animales del predio, control estricto del ingreso de animales al predio, constatación sanitaria de los predios de origen, revisión de los certificados de vacunación, análisis de los resultados de diagnóstico, destino de los animales: para cría, para feria o con destino al camal, y su permiso sanitario de movilización.

a. Diagnóstico e Identificación de Animales Positivos

Dada la existencia de numerosos laboratorios veterinarios de diagnóstico de brucelosis, entre los cuales están los del AGROCALIDAD/MAGAP, INHMT/MSP, AHFE, Pasteurizadora Quito, CIZ, Universidades, industrias lácteas, laboratorios particulares, la actividad inicial en este componente será la estructuración de una Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico de Brucelosis, la selección y calificación de un laboratorio de referencia nacional, mismo que se integrará al Consorcio Internacional de Laboratorios de Diagnóstico de Brucelosis, coordinado por PANAFTOSA/OPS.

Los laboratorios autorizados por AGROCALIDAD desarrollarán las siguientes pruebas:

Pruebas de tamizaje: Pruebas de anillo en leche (ring test).

Rosa de bengala en suero sanguíneo.

b. Certificación de Predios Libres

El objetivo de este componente es lograr la disminución progresiva de bovinos infectados de brucelosis en las ganaderías que manifiesten por escrito su interés de participar en el programa, hasta conseguir niveles de ocurrencia de la enfermedad y condiciones operativas compatibles con su erradicación, mediante la Certificación de Predios Libres, en el marco del Programa Nacional ejecutado por AGROCALIDAD.

A pesar de ser una decisión voluntaria, para participar en el Programa, los ganaderos deben cumplir algunos requisitos orientados a regular, tanto su ingreso como su permanencia, a fin de alcanzar los beneficios que el Programa promueve, (AGROCALIDAD. 2009).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO

El trabajo experimental se realizó en dos etapas:

Primera Etapa: El trabajo de campo se lo realizó en la hacienda “La Isabela de Sasaput” de propiedad del ingeniero Carlos Larrea, ubicada en el Cantón Chambo Provincia de Chimborazo.

Segunda Etapa: Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Diagnostico Animal- AGROCALIDAD, ubicada en la Avenida Atahualpa y Rumiñahui segundo piso edificio Solíz en el cantón Ambato Provincia de Tungurahua.

Las condiciones meteorológicas del cantón Chambo, se indican en el cuadro 4.

Cuadro 4. CONDICIONES METEOROLÓGICAS DEL CANTÓN CHAMBO

PARÁMETRO	PROMEDIO ANUAL
Temperatura (°C)	14
Humedad relativa (%)	80
Precipitación (mm/año)	900
Altitud (msnm)	2652

Fuente: Colegio Nacional Chambo. (2016).

El tiempo de duración de la investigación fue de 60 días, en base a los siguientes parámetros: la identificación de los animales a prueba; toma de muestras de sangre, análisis de laboratorio para la determinación de brucelosis bovina, interpretación de los resultados y elaboración del plan de erradicación.

B. UNIDADES EXPERIMENTALES

En el desarrollo de la presente investigación se utilizaron 32 animales de las distintas categorías: vaconas vientre, vacas secas y vacas en producción pertenecientes a “La Hacienda la Isabela de Sasaput” del cantón Chambo.

C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES

Los materiales, equipos e instalaciones que se emplearon para el desarrollo de la presente investigación se distribuyeron de la siguiente manera:

1. Materiales

- Libreta de apuntes.
- Esfero gráfico.
- Marcador permanente.
- Botas.
- Cámara fotográfica.
- Tubos para recolección de muestras.
- Gradilla.
- Guantes quirúrgicos.
- Frascos de vidrio.
- Caja refrigerante.
- Jeringas.
- Agujas desechables.
- Alcohol.
- Algodón.
- Overol.
- Pipeta.
- Tubos de ensayo.
- Mascarilla.
- Probeta.
- Papel absorbente.

2. Equipos

- Centrifuga.
- Refrigeradora.
- Agitador de placa alveolada (Rosa de Bengala).
- Cámara para lectura del test Rosa de Bengala.
- Analizador de ELISA.

3. Reactivos

- Antígeno Rosa de Bengala.

4. Instalaciones

- Corral de “La Hacienda la Isabela de Sasaput” en el cual se realizó el muestreo.
- Instalaciones del laboratorio Agrocalidad Ambato para la determinación de *Brucellaabortus*.

D. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

La presente investigación se desarrolló de acuerdo a la disponibilidad de semovientes esto es: 5 vaconas vientre, 11 vacas secas y 16 vacas en producción: a los cuales se muestrearon individualmente con el propósito de diagnosticar los positivos, falsos positivos y negativos, resultados que fueron utilizados para la elaboración de un plan de erradicación de animales infectados.

En este estudio se realizó el diagnóstico de la brucelosis por lo que se empleó una estadística descriptiva para determinar: Porcentajes, frecuencias absolutas, relativas e histogramas.

E. MEDICIONES EXPERIMENTALES

Se llevaron a cabo las siguientes mediciones experimentales tanto para vaconas vientre, vacas secas y vacas en producción:

- Número y Porcentaje de reactores positivos a la prueba Rosa de Bengala.
- Número y Porcentaje de reactores positivos a la prueba ELISA competitivo (c-ELISA).

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA

Para el análisis de los datos obtenidos se aplicaron los siguientes análisis estadísticos.

- Estadística descriptiva para determinar porcentajes, frecuencias relativas y absolutas.
- Histogramas.

G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para el diagnóstico de la brucelosis en “La Hacienda la Isabela de Sasaput” del cantón Chambo, se realizó el siguiente procedimiento:

1. De campo

- Selección de los animales.
- Traslado de los animales al corral.
- Ingreso de los animales a la manga.
- Identificación por número de los animales.
- Identificación del tubo a ser ocupado.
- Lavado y desinfección de la zona a muestrear (caudal).

- Extracción de la muestra de sangre (5-10ml) por el método vacuntainer.
- Colocar en una gradilla.
- Desinfectar la zona de muestreo.
- Soltar al animal.
- Transporte de las muestras en un termo de refrigeración al Laboratorio de Diagnóstico Animal de AGROCALIDAD para el diagnóstico de brucelosis.

2. De laboratorio

En el laboratorio se realizó lo siguiente:

- Recepción de la muestra.
- Registro de las muestras de acuerdo al caso y código del laboratorio.
- Centrifugación de la sangre (1000 rpm, 10 min, temperatura ambiente).
- Recolección de suero en micro tubos.
- Se realizó la prueba Rosa de Bengala detectando así la presencia de anticuerpos circulantes, ocasionados por infección natural.

Para la realización de la prueba se consideraron los siguientes puntos:

- Antígeno autorizado de *Brucella abortus* cepa 1119-3 al 8% de concentración celular, teñido con rosa de bengala en ácido láctico. El antígeno debe tener un pH de 3,65 (+/- 0,05).
- Suero de bovino sospechoso, no hemolizados.
- Micropipeta de 20 a 200 microlitros con sus respectivas puntillas, o bien pipetas de 0,1 ml.

- Placa de vidrio o acrílico transparente, con cuadrilla de 3 x 3 cm. Cada cuadro se utilizó para un solo suero. La placa mide 48 x 33 cm.
- Sueros control positivo y negativo.
- Palillos de madera y/o agitador múltiple de aluminio de 5 ramas.
- Aglutinoscopio, el cual es una caja de lectura con fondo negro mate con iluminación interior a base de focos, del tamaño de las placas: 48 x 33 x 12 cm.
- Cronómetro.
- El antígeno y los sueros se mantuvieron en refrigeración (4° C), pero al momento de comenzar a trabajar, tanto los antígenos como los sueros deben estar a temperatura ambiente, por lo que es recomendable sacarlos de refrigeración aproximadamente 30-60 min. previos a la realización de la prueba. El antígeno no debe congelarse.

Para la investigación se realizó el siguiente procedimiento:

- Utilizar solo la cantidad de antígeno que se va a usar en el día.
- Colocar 30 microlitros de cada muestra de suero en cada uno de los cuadros.
- Agitar el antígeno y agregar 30 microlitros del antígeno sobre cada gota de suero. Inmediatamente después de que se agregó la última gota del antígeno, mezclar el suero y el antígeno por rotación con un palillo o bien con el mezclador, de modo que se obtenga una mezcla homogénea.
- Mezclar por rotación manual de la placa por 4 min. Y proceder a realizar la lectura en el aglutinoscopio iluminado.

Para la lectura de los resultados se valoraron los siguientes puntos:

- Negativo: se aprecia un color rosado uniforme sin aglutinación ni formación de gránulos.
- Positivo: se consideró positivo todos aquellos sueros que presentaron

aglutinación, desde muy ligera hasta la formación de gránulos grandes. La aglutinación perceptible se considera positivo. Los gránulos se aprecian teñidos y el líquido tomó un color semitransparente.

A veces pueden formarse algunas partículas de diferente tamaño que forman parte del suero (glóbulos de grasa y fibrina), pero que no tiene que ver con la aglutinación. Los sueros que pasan de 4 min. se resecan y pueden aparentar unos pequeños grumos en la orilla. Todos los sueros con resultados positivos deberán pasar a una segunda prueba confirmatoria. En el caso de los bovinos, la prueba confirmatoria es el rivanol o la fijación de complemento, (Ruiz, M. 2006).

H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

- Muestreo de campo y análisis de laboratorio: el muestreo se realizó a todos los animales de edades susceptibles a la brucelosis, de La Hacienda “La Isabela de Sasaput” del cantón Chambo, posteriormente se llevó al laboratorio para realizar los respectivos análisis.
- Se diseñó un plan integral de erradicación de la enfermedad en base a los resultados del diagnóstico, tomando en consideración indicadores ambientales, genéticos o de raza del ganado, manejo alimenticio y reproductivo, profilaxis y tratamiento.
- Este plan se recomendó para su aplicación en la Hacienda “La Isabela de Sasaput” del cantón Chambo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. DIAGNÓSTICO DE LA PRESENCIA DE CASOS POSITIVOS DE BRUCELOSIS (*Brucellaabortus*), EN LA HACIENDA “LA ISABELA DE SASAPUT” DEL CANTÓN CHAMBO.

Analizando el hato lechero de la Hacienda “La Isabela de Sasaput”, se determinó la siguiente población para el diagnóstico de *Brucellaabortus*, señalado en el cuadro 5.

Cuadro 5. POBLACION BOVINA LECHERA DE LA HACIENDA “LA ISABELA DE SASAPUT” CHAMBO.

CATEGORÍAS	NÚMERO
Vacas vientre	5
Vacas secas	11
Vacas en producción	16
TOTAL	32

Fuente: Hacienda la Isabela de Sasaput. (2015).

1. Prueba serológica de Rosa de Bengala

Realizado los exámenes serológicos a los 32 semovientes pertenecientes a La Hacienda “La Isabela de Sasaput” por el método de Rosa de Bengala, se obtuvieron los siguientes resultados detallados en el cuadro 6.

Cuadro 6. RESULTADOS SEROLÓGICOS DE PRESENCIA DE *BRUCELLA* POR EL MÉTODO ROSA DE BENGALA EN LOS ANIMALES DE LA HACIENDA “LA ISABELA DE SASAPUT” CHAMBO.

CATEGORIAS	NÚMERO	ROSA DE BENGALA	
		NEGATIVOS	POSITIVOS
Vacas vientre	5	5	0
Vacas secas	11	9	2
Vacas en producción	16	11	5
TOTAL	32	25	7

Fuente: Laboratorio Agrocalidad, Ambato. (2015).

De acuerdo a los análisis reportados por el laboratorio de Agrocalidad se pudo determinar que la mayor prevalencia de brucelosis en la Hacienda “La Isabela de Sasaput” Chambo fue en los animales en producción con un porcentaje de 31,25 % (5 vacas), en vacas secas con un porcentaje de 18,18 % (2 vacas), observando ausencia de *Brucella* en las vaconas vientre, (gráfico 4), quizás esto se deba a que las dos primeras categorías tienen una actividad sexual frecuente y se encuentran más propensas a contraer esta enfermedad; así lo cita Cano, J. (2014), quien menciona que la brucelosis bovina afecta a bovinos de todas las edades, pero persiste con mayor frecuencia en animales sexualmente adultos, principalmente en ganaderías de cría y leche, debido a estos problemas es notorio la disminución de la producción de leche, pérdidas de crías, incremento de días abiertos, etc, ocasionando así considerables pérdidas económicas para los productores.

A esto se suma que la inmunidad se ve afectada transcurridos los 5 años pos vacunales, ya que aumenta el riesgo de contagio por los siguientes factores como: la calidad inmunogénica y manejo de las cepas vacúnales utilizadas en el país (CEPA 19), el manejo deficiente de la cadena de frío de las vacunas, la alta permanencia de las vacas declaradas como positivas antes de que puedan ser descartadas del hato, (Sánchez, C. 2012).

Datos similares obtuvo Manrique, J. (2010), quien reporta una prevalencia de 46 % de 292 animales en vacas productoras mayores a cinco años, por otro lado Sánchez, C. (2012), en un estudio realizado de prevalencia e incidencia de *Brucella* en 10 comunidades de Cayambe registró la presencia del 30 % prevalencia de *Brucella* en un hato lechero con animales mayores a 5 años, afirmando de esta manera lo anteriormente mencionado, que la mayor presencia es en animales adultos.

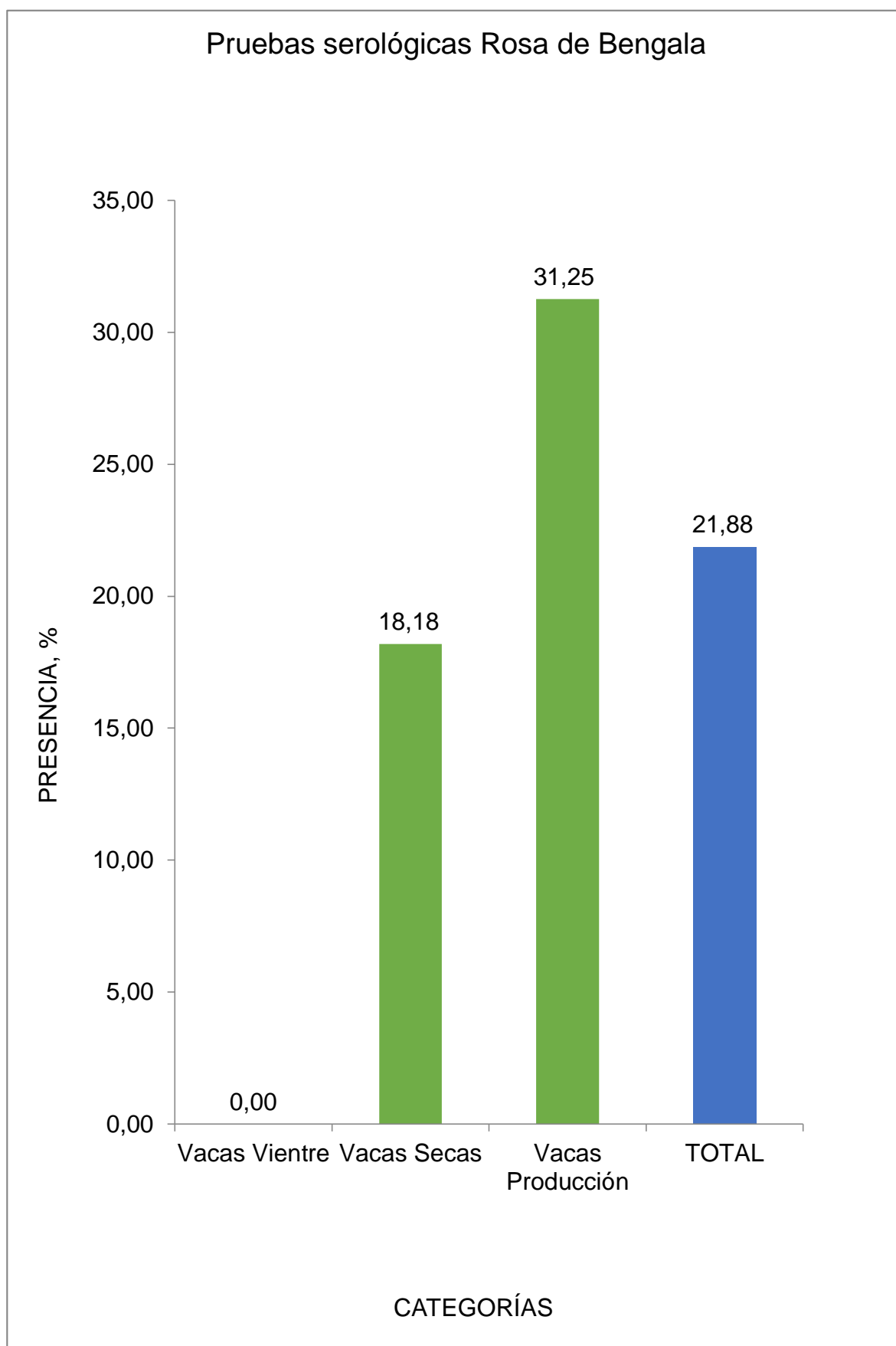


Gráfico 4. Porcentaje de presencia de *B. abortus* en los semovientes de la Hacienda “La Isabela de Sasaput” del cantón Chambo.

2. Pruebas serológicas de Elisa competitiva

De acuerdo con los resultados de los exámenes serológicos realizados a los 7 semovientes positivos a la técnica de Rosa de Bengala pertenecientes a “La Hacienda la Isabela de Sasaput” por el método de Elisa Competitiva, se obtuvieron los siguientes resultados detallados en el cuadros 7.

Cuadro 7. RESULTADOS SEROLÓGICOS DE PRESENCIA DE BRUCELLA POR MÉTODO ELISA COMPETITIVA EN LOS ANIMALES DE LA HACIENDA “LA ISABELA DE SASAPUT” CHAMBO.

CATEGORIAS	NÚMERO	ELISA COMPETITIVA	
		POSITIVOS	NEGATIVOS
Vacas secas	2	2	0
Vacas en producción	5	5	0
TOTAL	7	7	0

Fuente: Laboratorio Agrocalidad, Ambato. (2015).

La técnica de Elisa Competitiva, se la realizó con la finalidad de eliminar falsos positivos lo cual es aseverado por Gómez, L. (2006), al indicar que el diagnóstico por Elisa Competitiva mejora la diferenciación entre la respuesta vacunal y la infecciosa y disminuye la presencia de falsos positivos, por reacciones inespecíficas cruzadas con otros microorganismos.

Al analizar los resultados de Elisa Competitiva de la Hacienda la Isabela de Sasaput, se ratificaron los resultados previos obtenidos con la técnica de Rosa de Bengala pudiéndose observar que la mayor incidencia fue en hembras en producción con el 31,25% y en vacas secas con un porcentaje de 18,18%. Posiblemente uno de los factores de la incidencia de esta enfermedad sea la

introducción de nuevos animales a la granja sin establecer normas de cuarentena lo que permite el ingreso de vacas infectadas por *Brucella abortus*.

Rentería, *et al.* (2003), mencionan algunos factores determinantes para la presencia de brucelosis en los hatos ganaderos, tales como: La compra e introducción de animales infectados aparentemente sanos, sin exámenes de laboratorio que demuestren la ausencia de la enfermedad, el contacto de animales sanos con animales infectados en ferias, el escaso control sobre la movilización de los animales, la incidencia y el mal manejo de los abortos sumado al grado de hacinamiento en sistemas intensivos.

Ayala, E. y Tobar, L. (2013), encontraron 11 casos positivos a la Prueba de aglutinación mediante Rosa de Bengala los mismos que al ser sometidos a la prueba de Elisa Competitiva, determinaron 5 casos positivos equivalente al 45,5 %. Por otro lado Ortiz, D. (2015), al evaluar la prevalencia de *Brucella* en el camal de Ambato encontró 3 casos positivos mediante la técnica de Rosa de Bengala que al ser confirmados por la prueba de Elisa competitiva se obtuvo el 100 % de casos positivos (3 vacas), datos un tanto similares a los de nuestra investigación.

Además, esta prueba por su alta sensibilidad y especificidad ha llegado a ser la técnica de inmuno-ensayo más utilizada, con aplicaciones para el diagnóstico serológico de rutina. Elisa de competición (ELISA), posee además otra ventaja; permite diferenciar animales vacunados de infectados. Las placas tapizadas por un lipopolisacárido (S-LPS), de la bacteria, junto con un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo de la porción O-polisacárido del antígeno S-Lipopolisacáridos, proporciona esa especificidad, (Cano, C. 2012).

B. PLAN DE ERRADICACIÓN DE LA BRUCELOSIS EN BASE AL DIAGNÓSTICO EN LA HACIENDA “LA ISABELA DE SASAPUT” DEL CANTÓN CHAMBO.

1. Plan sanitario

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa, causada por diferentes especies del genero *Brucella*, siendo una enfermedad que merma la producción láctea, además de provocar abortos inesperados; siendo los de mayor incidencia en el ganado bovino.

En el Ecuador existen entidades públicas como AGROCALIDAD y MAGAP, que son las encargadas de ejecutar programas sanitarios para la erradicación de las enfermedades de alto riesgo entre las que se cataloga a la Brucelosis.

El control, se basa en restringir la movilización de ganado (ingresos de ganado a los hatos), limitar el acceso a las aéreas pecuarias a personas ajenas al centro de producción, controlar plagas y fauna que podría convertirse en hospedero reservorio, controlar la calidad higiénica del agua y de los alimentos destinados al ganado, entre otros.

Para un mejor control, es importante que se definan las zonas donde se atenderán los posibles casos clínicos, de tal manera que se facilite el tratamiento veterinario y se limite el contagio o difusión de la enfermedad. Se recomienda que toda unidad pecuaria cuente con Zonas de Aislamiento, con el propósito de contribuir a la prevención, control o erradicación de la enfermedad; con la zona de enfermería, para animales con enfermedades no contagiosas o de diseminación controlable; y la zona de segregación, recomendada para aquellos animales con enfermedades exóticas, u otra casuística de alto riesgo para el resto del hato de rápida difusión, que cause alta morbilidad y mortalidad pudiendo generar una epidemia, o que inhiba la habilidad productiva del ganado.

a. Propósitos a lograr mediante la implementación de un plan de control y erradicación de la Brucelosis bovina

- Evitar pérdidas económicas ocasionadas por esta enfermedad
- Obtención de la certificación de Buenas prácticas ganaderas, o finca libre de brucelosis mediante el cumplimiento de las medidas sanitarias propuestas en el presente Plan sanitario
- Implementar medidas sanitarias de prevención, control y erradicación de la enfermedad

b. Actividades de diagnóstico y control de la brucelosis

- Realizar periódicamente un diagnóstico serológico en la hacienda, pudiendo ser semestral, con ello conocer y actuar sobre algún caso infeccioso.
- La vacunación se realizará a los animales de acuerdo al calendario sanitario propuesto en el plan de control y erradicación detallados en los cuadros 8 y 9.
- Se pedirá el apoyo y participación de entidades públicas (MAGAP y AGOCALIDAD) sanitarias para la trazabilidad y vigilancia efectiva de la epidemiología en la hacienda la Isabela de Sasaput.

c. Proceso de diagnóstico para Brucelosis Bovina

Las pruebas diagnósticas de brucelosis se efectúan inicialmente mediante Ring Test a cada miembro en etapa reproductiva del hato lechero. En los casos positivos se realizarán las pruebas de Rosa de Bengala con suero sanguíneo y como prueba confirmatoria el análisis con ELISA Competitivo

La hacienda “La Isabela de Sasaput” deberá llevar obligatoriamente registros sobre los resultados de los diagnósticos realizados y proporcionar la información sanitaria de forma oportuna.

Si hay presencia de abortos es necesario tomar en cuenta las siguientes medidas; los restos de abortos como fetos, placentas y membranas fetales, deberán ser incineradas o enterradas en lugares donde no contaminen con materia orgánica, fuentes de agua o mantos freáticos.

Los animales sospechosos deberán aislarse del resto del hato informando al supervisor sanitario (AGROCALIDAD) responsable del área para que en el transcurso de 2 a 3 días, tome las muestras para el diagnóstico confirmatorio respectivo.

d. Control de movilización de animales

La hacienda la Isabela de Sasaput deberá llevar un control estricto del ingreso de nuevos animales, basado en los registros sanitarios del lugar de procedencia, revisión de los certificados de vacunación, análisis de los resultados de laboratorio y permiso sanitario de movilización con la finalidad de evitar la introducción de la enfermedad a la hacienda .

e. Educación sanitaria

Se deberá incentivar al personal de la hacienda “La Isabela De Sasaput”, con charlas de capacitación sobre los peligros de esta enfermedad de los bovinos y el riesgo de contagio a los humanos. El personal será informado sobre los componentes de Certificación de predio libre de Brucelosis Bovina el cual será un trabajo compartido entretodos, para lo cual:

- El personal de la hacienda “La Isabela de Sasaput”, debe manifestar en forma voluntaria su deseo expreso de participar en los programas de certificación de predio libre de brucelosis.
- Las entidades públicas y privadas formarán un equipo técnico responsable de llevar a cabo las tareas sanitarias de campo, coordinarán la realización de los análisis serológicos, la identificación de animales positivos y realizarán la administración financiera del programa de erradicación de la enfermedad, para posteriormente determinar bajo los parámetros planteados la certificación y declarar a la hacienda un predio libre de brucelosis.

Cuadro 8. CALENDARIO SANITARIO DE EJECUCIÓN EN LA HACIENDA LA ISABELA SE SASAPUT.

TIPO DE VACUNA	CATEGORÍAS	APLICACIÓN
VIRAL (IBR - DVB)	Terneritas(4- 6 meses)	Revacunar a los 21 días en la primera aplicación
	Fierros:	Aplicación cada 6 meses
	Vaconas	4 semanas antes de la primera inseminación
	Todo el Ganado	Cada 6 meses
DESPARASITACIONES		
Interna	Todo el ganado	Cada 6 meses
Externa	Terneros	Una vez al año
TRIPLE	Terneritas	A los tres meses la primera aplicación y el refuerzo a los 21 días
	Vacas parto	21 días antes del parto
	TODO EL GANADO	Cada 5 meses
PARA BRUCELOSIS	TERNERAS(4-8 meses)	Cepa Cotton 19 una sola aplicación en la vida
FIEBRE AFTOSA	Se rige al calendario de AGROCALIDAD	

Cuadro 9. CALENDARIO SANITARIO PROPUESTO PARA LA HACIENDA LA ISABELA DE SASAPUT.

VACUNA	ÍTEM	MESES												OBSERVACIONES
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Bacterianas	BRUCELA				x						X			Cepa Cotton 19 vacunación obligatoria de las terneras entre 3 y 8 meses de edad RB 51 vacunación anual en animales sexualmente activos o en etapa reproductiva
	TRIPLE		X						X					No se recomienda la vacunación en vacas gestantes de más de 7 meses
	LEPTOSPIRA			X						X				A los 4 meses revacunación a los 21 días. Dos veces al año.
Virales	IBR - DVB			X						X				Vacunas inactivadas se aplican en cualquier época de gestación
	AFTOSA RABIA						X						X	Obligatoria en todo el país Vacunar cada año
Parasitarias	NEUMONÍA													A la primera semana de vida
Control leucosis CMT	NEOSPOROSIS			X		x			X				x	VACAS GESTANTES
Desparasitación	Parásitos externos e internos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Vacas de reajo Albendazoles, febendazol, ivermectina y doramectina
	<i>Fasciola hepática</i>			X		X			X				X	Triclabendazol o duplicando la dosis del albendazol.

f. Erradicación de la Brucelosis

Los semovientes positivos a las pruebas serológicas confirmatorias de brucelosis bovina deberán identificarse mediante una marca permanente en el músculo masetero (cachete).

La eliminación deberá realizarse en un lapso no mayor a los 30 días a partir del diagnóstico confirmatorio, siendo su destino exclusivo el camal municipal en la Ciudad de Riobamba, con la supervisión de AGROCALIDAD.

La Hacienda tendrá la capacidad de efectuar y poner en marcha este Plan Sanitario establecido en la presente investigación, basándose en las normas y aspectos sanitarios planteados, con la finalidad de obtener un predio libre de Brucelosis.

Es importante tener en cuenta que la única forma de erradicar la brucelosis en la hacienda "La Isabela de Sasaput", es la eliminación total de los animales positivos, ya que de esta manera se evitará la propagación de la brucelosis y las pérdidas económicas que ocasiona esta enfermedad.

V. CONCLUSIONES

1. De acuerdo al diagnóstico realizado a los 32 animales de la hacienda “La Isabela de Sasaput” Del Cantón Chambo, mediante la técnica de Rosa de Bengala se determinó 7 casos positivos, los mismos que fueron sometidos a la prueba de Elisa competitiva para confirmar el diagnóstico el mismo que resulto positivo por lo que se procederá al sacrificio de estos animales de acuerdo a la normativa vigente.
2. En base a los antecedentes de la Hacienda y los resultados obtenidos se diseñó un Plan de erradicación para esta enfermedad reproductiva de gran impacto en la ganadería lechera Ecuatoriana.

VI. RECOMENDACIONES

1. Aplicar el plan de erradicación planteado en la presente investigación para la hacienda “La Isabela de Sasaput”, el cual involucra tres aspectos importantes; el control (vacunación periódica), un diagnóstico periódico y la eliminación total de los animales detectados como positivos mediante las dos pruebas de laboratorio Rosa de Bengala y Elisa Competitiva.
2. Se recomienda que el personal que maneja los bovinos en la hacienda “La Isabela de Sasaput” tome las debidas precauciones de bioseguridad ya que la enfermedad es zoonótica, además coordinar con los organismos de control como Agrocalidad para realizar el muestreo semestral.
3. Los administradores de la hacienda “La Isabela de Sasaput” al adquirir animales, deben llevarlos al área de cuarentena para comprobar su idoneidad, antes de incorporarlos al hato para evitar la diseminación de la enfermedad en estudio.
4. Hacer extensivo el plan de erradicación planteado en la presente investigación a otras ganaderías de la zona.

VII. LITERATURA CITADA

1. Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro (AGROCALIDAD). (2009). Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina. pp. 4-13. Quito – Ecuador.
2. Agro Meat. (2012). Brucelosis. Recuperado el 10 de septiembre del 2016. Disponible en: <http://www.agromeat.com/82062/%C2%BFcepa-19-o-cepa-rb-51-el-eterno-dilema>
3. Álvarez, E. (2010). Situación de la Brucelosis en América panorama general. en: Diagnóstico de Brucelosis animal. Díaz, E., Hernández, L., Valero, G. & Arellano, B. México. pp. 9-15.
4. Ancha, P. & Cifres, B. (2013). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales, 4ª (ed)., Washington, D.C. Organización panamericana de la Salud.
5. Ayala, E., & Tobar, L. (2013). Incidencia de Brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en los hatos lecheros de la asociación rancheros del Norte, parroquia el Carmelo, cantón Tulcán, provincia del Carchi. (Tesis de grado). Universidad Politécnica Estatal del Carchi. Carchi – Ecuador.
6. Bagchi, T. (2010). Immune mechanisms in murine brucellosis: Studies with strain RB51, a rough mutant of *Brucella abortus*, Ph.D. (thesis), Virginia Polytechnic: Blacksburg, VA 24061, USA.
7. Bautista, M., & Ochoa, B. (2008). Técnicas de Inmunoensayo ligadas a enzimas. en: Diagnóstico de Brucelosis animal. Díaz, E., Hernández, L., Valero, G. & Diagnóstico de Brucelosis animal. Díaz, E., Hernández, L., Valero, G. & Arellano, B. México, pp. 92-94.
8. Bauza, E. (2009). Tratamiento antimicrobiano de la brucelosis. Información terapéutica de la Seguridad Social. Guayaquil - Ecuador. pp. 155-160.

9. Bercovich, Z. (2006). The use of skin delayed-type hypersensitivity as an adjunct test to diagnose brucellosis in cattle: a review. *Veterinary Quarterly*. pp. 123-130.
10. Bofill, P., Rivas A., Ramírez, W. (2010). Brucelosis. en: Manual de enfermedades infecciosas. Primera reimpresión. Talleres gráficos de la dirección de publicaciones del Instituto Politécnico Nacional : pp. 60- 84.
11. Bowden, R. (2006). Brucelosis. en: Temas de microbiología veterinaria. Stanchi, N., Merino, P., Gentilini, E., Reinoso, E. & Pennimped, E. La Plata-Argentina. pp. 341- 367.
12. Blasco, J. (2011). Profilaxis médica de la Brucelosis en los rumiantes: Las vacunas clásicas y las nuevas vacunas. en: Diagnóstico de Brucelosis animal.
13. Blood, D., Henderson J. & Radostits O. (2007). Enfermedades causadas por diversas especies de *Brucella*. in: Medicina Veterinaria. Interamericana, México. pp. 522- 540.
14. Bricker, B., Ewalt, D., Macmillan, A., Foster, G. & Brew, S. (2000). Molecular characterization of *Brucella* strain isolated from marine mammals. *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 3: pp. 1258-1262.
15. Campos, L. (2007). La salud animal en México, informe anual de la dirección general de Salud Animal. D.G.S.A. SAHR, México.
16. Cano, J. (2014). Brucelosis bovina FMVZ – UNAM. Recuperado el 15 de enero del 2016. disponible en www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/.../BRUCELOSIS%20BOVINA.doc.
17. Cano C. (2012). Brucelosis bovina. Ambato. pp. 76 -77 Recuperado el 10 de mayo del 2016. disponible en: <http://fmvz.freeiz.com/fmvz/departamentos/rumiantes/archivos/BRUCELOSIS%20BOVINA.doc>.
18. Carter, G. & Thomas, C. (2008). Bacteriología y Micología Veterinaria. México. Manual Moderno.

19. Casillas, F. (2005). Impacto de la Brucelosis en la salud pública en México. Memorias del XI foro Nacional de Brucelosis, México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México, Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica. México
20. Castro, H., González, S. & Prat, M. (2005). Brucelosis: una revisión práctica. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. pp. 203-16.
21. Contreras, F. (2006). Evaluation of the bovine Brucellosis Eradication Campaign in Dalrimpe Shire, Queensland. Master in Sciences Degree dissertation, James Cook University of North Queensland.
22. Edifarm. (2009). Vademécum Veterinario. In Edifarm, *Brucelosis bovina*. p. 126. Quito.
23. Escobar, F. (2011). Incidencia – Prevalencia y Plan de Control de Brucelosis Bovina en Hatos Lecheros de la Sierra Norte Ecuatoriana. Facultad de Ciencias Pecuarias Escuela de Ingeniería Zootécnica. (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba – Ecuador.
24. Fedepale. (2009). 5to. Congreso Ordinario. Informe departamento técnico, Control de Brucelosis Bovina. Santa Cruz - Bolivia. p. 27.
25. Flores C. (2012). Uso de la vacuna elaborada con Cepa Cotton 19 en dosis reducida, para el control de la brucelosis en la República Mexicana Memorias del Simposium Internacional de Medicina Veterinaria Preventiva. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey NL.
26. Franco, F. & Loza, C. (2009). Brucelosis bovina en el cantón Flavio Alfaro mediante las pruebas Rosa de Bengala y Elisa Competitivo. Calceta, Manabí - Ecuador. pp. 30-32.
27. García, C. (2005). Prevalencia de la brucelosis bovina en el área de influencia de la ciudad de La Paz - Bolivia.
28. Gómez, L. (2006). Manual de Inmunología Veterinaria. Madrid. Pearson.

Educación. p. 325.

29. Guzmán, O. (2009). El Agropecuario Ganadero. el Agropecuario Ganadero. Madrid. p. 21.
30. Grandy, V. (2005). Brucelosis Bovina, Área Integrada de la provincia Valle grande del Departamento de Santa Cruz. (Tesis de grado), Universidad Autónoma Gabriel Rene Moreno. F. M. V. Z. Santa Cruz - Bolivia. p. 44.
31. Lidivet. (2006). Anuario 2002. Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Veterinario y el Centro de Medicina Tropical de la Universidad de Edimburgo. Santa Cruz - Bolivia. p. 11.
32. López, A., López, R., Ocampo, D., Monroy, Y. & Domínguez, F. (2008). Brucelosis: Avances y perspectivas Instituto nacional de diagnóstico y referencias epidemiológicas "Dr. Manuel Martínez Báez". México: INDRE.
33. López, G. (2007). Estudio de brucelosis causado por *Brucella ovis* en ovinos y personal en riesgo. (Tesis doctoral) Universidad Politécnica de Valencia. Valencia - Argentina. pp. 15-19.
34. Luna, M., Arango, J., C.J. & López Merino, A. (2007). Estudio de Brucelosis en Hatos Lecheros en una zona Conurbada de la Ciudad de México, Vet. Méx.
35. Martínez, C.G. (2008). Brucelosis Bovina *Brucella abortus* (Tesis de maestría). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán - México.
36. Melean, A. (2010). Situación de la brucelosis bovina en las provincias Andrés Ibáñez, Warnes, Obispo Santiestevan y el municipio de Portachuelo de la provincia Sara del departamento de Santa Cruz. (Tesis de grado). Universidad Autónoma Gabriel Rene Moreno. Facultad de ciencias veterinarias.
37. Manrique, J. (2010). Estudio epizootológico de Brucelosis bovina en el departamento de Santa Cruz. Universidad Autónoma Gabriel Rene Moreno. Facultad de Ciencias Veterinarias. p. 43.

38. Ocadiz, J. (2009). Epidemiología en animales domésticos, control de enfermedades. 2ª. (ed). Editorial Trillas. Perú.
39. Ortiz, D. (2015). Prevalencia de brucelosis en bovinos del camal Municipal frigorífico de Ambato. Tesis de la Universidad Técnica de Ambato. pp. 50-52.
40. Pachame, A. (2005). Revista del Colegio de Veterinarios, de Argentina. 21:pp. 50- 56.
41. Programa nacional de control de brucelosis bovina (2010). Control de brucelosis bovina. Ecuador.
42. Redvet. (2005). Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. Vol.VI N 9. Recuperado el 11 de noviembre del 2016, disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090905.html>.
43. Rentería, T., Nielsen, K., Licea, A., Montaña, M. & Moreno, J. (2003). Evaluación de un programa de control de la brucelosis bovina en hatos lecheros de Baja California. Técnica Pecuaria México. pp. 275-282.
44. Rivera, G. (2012). Causas frecuentes de abortos bovinos Ref. Investig. Vet. Perú. pp. 117-122.
45. Ruíz, M. (2006). Brucelosis 3ª. (ed). México D.F. La prensa médica mexicana.
46. Samartino, L. (2008). Jornada de actualización sobre brucelosis bovina, Roche. INTA, Caselar, Argentina. p. 1.
47. Sánchez, C. (2011). Prevalencia de brucelosis bovina mediante el Método Card – Test (Rosa de Bengala) en la comunidad de Pesillo Cayambe –Ecuador. (Tesis de Ingeniería Agropecuaria). Universidad Politécnica Salesiana - Quito.
48. Solé, V. (2013). Descripción de la situación epidemiológica de los predios en cuarentena por brucelosis bovina en el año 2010 y análisis del instrumento oficial utilizado para recolección de información. (Tesis de grado). Universidad de Chile Facultad de Ciencias Veterinarias y

Pecuarias. Chile.

49. Solís, T. (2008). Cineteca de Anticuerpos en terneras Inmunizadas contra Brucella, mediante la vacuna Cepa 19. Recuperado el 23 de noviembre del 2016, disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2507/1/T-ESPE-IASA%201-003803.pdf>.
50. Tecno Vet. (2010). Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Recuperado el 5 de junio del 2016. Disponible en: <http://www.tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/5203/5085>.
51. Valero G. (2008). Diagnóstico Veterinario, Requisitos, procesos, interpretación ventajas y desventajas de técnicas diagnósticas. Primera edición. Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C., México, DF.
52. Villagas, L., Alzina, A. & Evia, V. Manual de técnicas de análisis de muestras del laboratorio de Inmunología. México.

ANEXOS

Anexo 1. La Hacienda La Isabela De Sasaput Del Cantón Chambo.



Potrerros de la Hacienda Isabela De Sasaput Del Cantón Chambo.



Anexo 2. Fotos trabajo de campo en la Hacienda Isabela De Sasaput Del Cantón Chambo.



Hato existente de la Hacienda



Toma de muestras de sangre



Traslado de muestras al laboratorio

Anexo 3. Fotos trabajo en laboratorio en La Isabela De Sasaput Del Cantón Chambo.



Identificación de las muestras de sangre de los semovientes



Preparación para el envío de las muestras a los laboratorios de Agrocalidad

Anexo 4. Resultados del Laboratorio

 AGROCALIDAD AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO ANIMAL Av. Atahualpa y Rumiñahui 2do Piso Edificio Solís Ambato- Tungurahua Teléf.: 03-2412315	PGT/DA/09-FO07
	INFORME DE DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS	Rev. 3 Hoja 1 de 1

Informe N°: LDR-TUNGURAHUA-DA Eb-15-024
 Fecha emisión Informe: 28/02/2015

DATOS DEL CLIENTE

Persona o Empresa solicitante: Dra Myriam Carrera

Dirección: Uruguay y Luis A. Falconí

Provincia: Chimborazo Cantón: Riobamba

Teléfono: 0995870204

Correo Electrónico: millisuvet@hotmail.com

N° Orden de Trabajo: 06-2015-004

N° Factura/Documento: 10719

DATOS DE LA MUESTRA:

Tipo de muestra: Suero Sanguíneo	Conservación de la muestra: Refrigeración
Diagnóstico: Negativo/Positivo	N° Muestras: 32
Motivo del análisis: Cliente Externo	Raza: No reporta
Vacunas: NO REPORTA	Fecha de vacuna: S/F
Propietario del Predio: Carlos Larrea	Predio: La Isabela de Sasapud
Dirección del Predio: Sasapud	
Provincia: Chimborazo	Coordenadas: X: 772632
Cantón: Chambo	Y: 9806198
Parroquia: Chambo	Altitud: 3170
Muestreado por: Diego Merino	
Fecha de muestreo: 23/02/2015	Fecha de inicio de diagnóstico: 28/02/2015
Fecha de recepción de la muestra: 28/02/2015	Fecha de finalización de diagnóstico: 28/02/2015

RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO

MÉTODO:

CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	ESPECIE	EDAD (MESES)	SEXO	TIPO DE VACUNA	TEMPERATURA AL MOMENTO DE MUESTREO °C	ROSA DE BENGALA
1	011	Bovino	168 m	F	N/R	37.8	NEGATIVO
2	015	Bovino	156 m	F	N/R	38.5	POSITIVO
3	025	Bovino	144 m	F	N/R	38.9	NEGATIVO
4	033	Bovino	132 m	F	N/R	38.7	NEGATIVO
5	057	Bovino	120 m	F	N/R	39	NEGATIVO
6	069	Bovino	96 m	F	N/R	38.7	NEGATIVO
7	070	Bovino	96 m	F	N/R	38.6	NEGATIVO

Nota: El resultado corresponde únicamente a la muestra entregada por el cliente en esta fecha. Está prohibida la reproducción parcial de este informe.

 AGROCALIDAD AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO ANIMAL					PGT/DA/09-F007	
	Av. Atahualpa y Rumiñahui 2do Piso Edificio Solís Ambato- Tungurahua Teléf.: 03-2412315					Rev. 3	
	INFORME DE DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS					Hoja 1 de 1	

8	100	Bovino	60 m	F	N/R	38.7	NEGATIVO
9	103	Bovino	60 m	F	N/R	38.6	NEGATIVO
10	107	Bovino	60 m	F	N/R	38.8	POSITIVO
11	110	Bovino	48m	F	N/R	39	NEGATIVO
12	111	Bovino	48 m	F	N/R	38.5	NEGATIVO
13	112	Bovino	48 m	F	N/R	38.7	NEGATIVO
14	115	Bovino	36 m	F	N/R	39	NEGATIVO
15	116	Bovino	36 m	F	N/R	38.8	NEGATIVO
16	117	Bovino	36 m	F	N/R	39.2	NEGATIVO
17	118	Bovino	36 m	F	N/R	38.7	POSITIVO
18	119	Bovino	36 m	F	N/R	39	NEGATIVO
19	120	Bovino	36 m	F	N/R	38.6	NEGATIVO
20	123	Bovino	20 m	F	N/R	38.7	NEGATIVO
21	125	Bovino	24m	F	N/R	39.1	NEGATIVO
22	128	Bovino	24m	F	N/R	38.7	NEGATIVO
23	133	Bovino	24 m	F	N/R	38.8	NEGATIVO
24	433	Bovino	120 m	F	N/R	39	NEGATIVO
25	431	Bovino	144 m	F	N/R	38.9	POSITIVO
26	434	Bovino	72 m	F	N/R	38.7	NEGATIVO
27	435	Bovino	60 m	F	N/R	38.5	POSITIVO
28	437	Bovino	48m	F	N/R	38.6	POSITIVO
29	438	Bovino	48 m	F	N/R	39.1	NEGATIVO

Nota: El resultado corresponde únicamente a la muestra entregada por el cliente en esta fecha.
 Está prohibida la reproducción parcial de este informe.

 AGROCALIDAD AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	LABORATORIO DE DIAGNOSTICO ANIMAL				PGT/DA/09-F007	
	Av. Atahualpa y Rumiñahui 2do Piso Edificio Solís Ambato- Tungurahua Teléf.: 03-2412315				Rev. 3	
	INFORME DE DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS				Hoja 1 de 1	

30	8255	Bovino	36m	F	N/R	38.7	POSITIVO
31	DOMINGA	Bovino	35m	F	N/R	39	NEGATIVO
32	GLORIA	Bovino	20m	F	N/R	38.6	NEGATIVO

Límites de referencia:

Analizado por: Dra. Gabriela Ordóñez

Observaciones:


Anexo Gráficos o Anexo Documentos:



Ing. Verónica Ojeda
**Responsable de Laboratorio
 Diagnóstico Animal**

Nota: El resultado corresponde únicamente a la muestra entregada por el cliente en esta fecha.
 Está prohibida la reproducción parcial de este informe.

Informe de diagnóstico de laboratorio prueba Rosa de Bengala

 AGROCALIDAD AGENCIA ECUATORIANA DE AGROALIMENTOS DE LA CIUDAD DEL AGRI	LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO ANIMAL Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAGAP, Tumbaco - Quito Teléf.: 02-2372-842/2372-844/2372-845 INFORME DE DIAGNÓSTICO DE BOVINOS	PGT/DA/09-FC06 Rev. 2 Hoja 1 de 1
	Informe N°: LN-DA-Eb15-990 Fecha emisión Informe: 04/03/2015	
	DATOS DEL CLIENTE Persona o Empresa solicitante: AGRICALIDAD TUNGURAHUA Dirección: NO INFORMA Provincia: TUNGURAHUA Cantón: NO INFORMA Teléfono: 032412315 Correo Electrónico: tungurahua@agrocalidad.gob.ec N° Orden de Trabajo: 18-2015-043 N° Factura/Documento: 10719-F	

DATOS DEL CLIENTE

Persona o Empresa solicitante: AGRICALIDAD TUNGURAHUA

Dirección: NO INFORMA

Provincia: TUNGURAHUA

Cantón: NO INFORMA

Teléfono: 032412315

Correo Electrónico: tungurahua@agrocalidad.gob.ec

N° Orden de Trabajo: 18-2015-043

N° Factura/Documento: 10719-F

DATOS DE LA MUESTRA:

Tipo de muestra: SUERO SANGUINEO	Conservación de la muestra: REFRIGERACIÓN
Diagnóstico: BRUCELOSIS BOVINA	N° Muestras: 07
Motivo del análisis: CLIENTE EXTERNO	Raza: NO INFORMA
Vacunas: NO INFORMA	Fecha de vacunas: NO INFORMA
Propietario del Predio: CARLOS LARREA	Predio: LA ISABELA DE SASAPUD
Dirección del Predio: NO INFORMA	
Provincia: CHIMBORAZO	Coordenadas: X: 0772832 Y: 9806198
Cantón: CHAMBO	Altitud: 3170
Parroquia: CHAMBO	
Muestreo por: DIEGO MERINO	Fecha de inicio de diagnóstico: 04/03/2015
Fecha de muestreo: 23/02/2015	Fecha de finalización de diagnóstico: 04/03/2015
Fecha de recepción de la muestra: 04/03/2015	

RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO

MÉTODO: ELISA COMPETITIVO, AGLUTINACIÓN

CÓDIGO MUESTRA	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	EDAD (MESES)	SEXO	TEMPERATURA AL MOMENTO DE MUESTREO °C	SÍNTOMAS	IBR COMPETITIVO	PI%	DIARREA VIRAL BOVINA (COMPETITIVO)	PI%	NEOSPORA CANINUM	PI%	LEUCOSIS VIRAL BOVINA	PI%	BRUCELOSIS		PI%
														INDICE DE BIENEFIA	ELISA COMPETITIVO	
DA-B1503-6323	015	156	HEMBRA	38.5	NO	POSITIVO	POSITIVO	45,65
DA-B1503-6324	107	60	HEMBRA	38.6	NO	POSITIVO	POSITIVO	96,93
DA-B1503-6325	118	36	HEMBRA	38.7	NO	POSITIVO	POSITIVO	47,76
DA-B1503-6326	171	144	HEMBRA	38.9	NO	POSITIVO	POSITIVO	61,14
DA-B1503-6327	435	60	HEMBRA	38.5	NO	POSITIVO	POSITIVO	52,30
DA-B1503-6328	437	48	HEMBRA	38.6	NO	POSITIVO	POSITIVO	51,28
DA-B1503-6329	8255	36	HEMBRA	38.7	NO	POSITIVO	POSITIVO	97,18

Limites de Referencia:

DIARREA VIRAL BOVINA (COMPETITIVO)		BRUCELOSIS VIRAL BOVINA (COMPETITIVO)		LEUCOSIS BOVINA		NEOSPORA CANINUM	
RESULTADO	VALOR	RESULTADO	VALOR	RESULTADO	VALOR	RESULTADO	VALOR
NEGATIVO	> 50	NEGATIVO	≥ 55	NEGATIVO	< 30	NEGATIVO	< 50
SOSPECHOSO	≥ 40 - ≤ 50	SOSPECHOSO	> 45 - ≤ 55	SOSPECHOSO	NO APLICA	SOSPECHOSO	NO APLICA
POSITIVO	≤ 40	POSITIVO	≤ 45	POSITIVO	≥ 30	POSITIVO	≥ 50

Analizado por: Dr. Patricio Sandoval V.

Observaciones: Anexo límites de referencia

Nota: El resultado corresponde únicamente a la muestra entregada por el cliente en esta fecha. Está prohibida la reproducción parcial de este informe.



Dr. Patricio Sandoval V.
 Responsable de Laboratorio
 Diagnóstico Animal

B-1503-137

Informe de diagnóstico de Brucelosis por Elisa Competitiva