



UNIVERSIDAD DE LAS AMERICAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESTUDIO DE PREVALENCIA DE BRUCELLA spp. EN CANINOS (Canis familiaris), EN EL SECTOR DE ANCHOLAG, PARROQUIA JUAN MONTALVO, EN EL CANTÓN CAYAMBE, PROVINCIA DE PICHINCHA, ECUADOR.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad a los requisitos para optar por el título de Título profesional de Médico Veterinario Zootecnista.

Profesor guía.

Freddy Proaño Pérez, Ph.D.

Autor:

Nicole Marie Kressler Beraha

2014

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema y tomando en cuenta la Guía de Trabajos de Titulación correspondiente.

Freddy Proaño Pérez, Ph.D.

CI. 100208116-2

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Yo Nicole Marie Kressler Beraha “Declaro que este trabajo es original, de mi (cuenta) autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Nicole Marie Kressler Beraha

CI. 171171872-

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellos han colaborado en mi formación y me han acompañado en el camino. A la Universidad de las Américas, con todos sus profesionales, por impartir conocimientos y prepararnos de forma integral. En especial a Freddy Proaño Pérez por guiar este estudio de manera profesional.

A mi madre por su apoyo incondicional, la confianza depositada y su amor sin medidas. A Lauren y Stefano por ser tan buenos amigos, además de familia, y siempre velar por mi seguridad y apoyarme a lo largo del camino. A mi sobrina Roberta por darme tantas alegrías.

A Mónica Ortiz, Andrés Struve, Teresa Alvear y Fabián Alvear por su amistad, apoyo, confianza y crecimiento personal que cada uno me ha brindado. A Stephany Loor sin quien no hubiera logrado terminar mis proyectos, gracias por las madrugadas, las trasnochadas, los viajes a Cayambe y la tranquilidad que me ha dado.

Un agradecimiento especial a las comunidades de Ancholag Alto, San Luis de Chaguarpungo y Santa Anita de Ancholag por su colaboración en la realización de este estudio.

DEDICATORIA

A mi familia

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue identificar la prevalencia de *Brucella* spp. en las poblaciones canina de tres comunidades indígenas localizadas en el sector de la hacienda Ancholag, parroquia Juan Montalvo, en el cantón Cayambe, provincia de Pichincha, Ecuador.

La brucelosis es una enfermedad con distribución mundial que representa grandes pérdidas económicas en el sector pecuario. Se conoce que el género *Brucella* tiene marcada preferencia por un determinado huésped, sin embargo pueden infectar a otras especies en forma cruzada, entre ellas los caninos y el humano. La infección en humanos se presenta frecuentemente de manera accidental, causada al ingerir alimentos contaminados con *Brucella*, o por el contacto con materiales infectados.

El estudio se realizó en 118 caninos que tienen contacto habitual con ganado, a los cuales se les aplicó las pruebas Rosa de Bengala (RB) y Suero Aglutinación en tubo (SAT), además de una encuesta con el fin de determinar los factores de riesgo que influyen en el área de estudio. Se obtuvo una prevalencia general del 5.08%, es decir que 6/118 casos fueron positivos a las pruebas RB y SAT.

Los factores de riesgo asociados a la positividad de las pruebas serológicas aplicadas son, el consumo de productos de partos y abortos por medio de los caninos que muestra un 25% de probabilidades de presentar la infección en comparación a aquellos animales que no han consumido dichos productos, y haber presentado alguna anomalía durante el parto o gestación, o abortos, las probabilidades de infección son de 7.31 veces. El aborto presentado en estos animales es un factor importante para la diseminación de la enfermedad entre perros, animales de producción y humanos.

ABSTRACT

The purpose of this study was to identify the prevalence of *Brucella* spp. in canine populations of three indigenous communities located in the area of Hacienda Ancholag, in the Juan Montalvo parish, Cayambe District, province Pichincha, Ecuador.

Brucellosis is a disease with worldwide distribution that represents great economic losses in the livestock sector. It is known that the *Brucella* genus has strong preference for a particular host, but can cross-infect other species, including canines and humans. Infection in humans often occurs accidentally, caused by consuming contaminated food with *Brucella*, or by contact with infected materials.

This study was conducted in 118 dogs who have regular contact with livestock, to which the Bengal Rose test (RB) and Serum Agglutination Test (SAT) were applied, along with a survey to determine the risk factors influencing the study area. An overall prevalence of 5.08% was obtained, that is to say that 6/118 cases were positive for the RB and SAT tests.

Risk factors associated with the positivity of serological tests applied are the consumption of birth and abortion materials by canines, having a 25% chance of infection in comparison with those that have not consumed such products; if the animals have filed an abnormality during pregnancy or birth, or abortions, the chances of infection are 7.31 times. The abortion presented in these animals is an important factor for the spread of the disease among dogs, farm animals and humans.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
GENERALIDADES	1
1.1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.2.JUSTIFICACIÓN	3
1.3. OBJETIVOS	3
1.3.1 Objetivos específicos.....	3
1.4. HIPOTESIS	4
CAPÍTULO II.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. HISTORIA	5
2.2. ETIOLOGÍA.....	7
2.2.1 Taxonomía de las especies	7
2.2.3 Transmisión	11
2.2.4. Patogenia.....	13
2.2.5. Resistencia de la bacteria en el ambiente	13
2.2.7. Respuesta inmunológica.....	16
2.3. EPIDEMIOLOGÍA.....	18
2.3.1. Situación de la brucelosis a nivel mundial	18
2.3.3. Situación de la brucelosis en Ecuador	21
2.4. DIAGNÓSTICO	23
2.4.1. Diagnóstico clínico	23
2.4.2. Diagnóstico de laboratorio	27
2.4.3. Control y prevención	36
2.5. TRATAMIENTO.....	38
2.5.1. Humanos	38
2.5.2. Animales	39
CAPÍTULO III	40
MATERIALES Y MÉTODOS	40

3.1. METODOLOGÍA.....	40
3.1.1. Área de estudio.....	40
3.1.2. Población y Muestra	41
3.1.3. Encuesta y toma de muestras	42
3.1.4. Materiales de campo.....	43
3.1.5. Técnicas e instrumentos analíticos	43
3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
CAPÍTULO IV	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	49
4.2. RESULTADO DE LABORATORIO DE LOS ANÁLISIS SEROLÓGICOS.....	52
4.2.1. Resultados de la prueba Rosa de Bengala (RB)	52
4.2.2. Prueba de Sero-Aglutinación en Tubo (SAT).....	54
4.3. RESULTADOS DE LA ENCUESTA.....	56
4.3.1. Contacto y/o convivencia con otros animales	56
4.3.2. Población canina que consume productos de partos y/o abortos de ganado.....	57
4.4. ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTOS MÉDICOS	59
4.5. HABITOS ALIMENTICIOS DE LOS CANINOS.....	61
4.5.1. Consumo de leche cruda/suero de leche por parte de los perros....	61
4.5.2. Alimentación de los caninos	62
4.5.3 Origen del agua de bebida que consumen los caninos	62
4.6. EXPLORACIÓN FÍSICA	63
4.6.1. Signos clínicos no reproductivos asociados a la infección por B. abortus.....	63
4.7. GESTACIÓN Y PARTOS	65
4.7.1. Hembras que han gestado al menos una vez.....	65
4.7.2. Anomalías en los partos	65
4.7.3. Abortos en las perras.....	66

4. 8. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
4.8.1. Análisis estadístico de factores de riesgo	68
CAPÍTULO V	70
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	70
5.1 CONCLUSIONES.....	70
5.2 RECOMENDACIONES.....	71
REFERENCIAS.....	72
ANEXOS	76

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis, también conocida como “fiebre ondulante”, “fiebre de Malta”, o “enfermedad de Bang”, es una enfermedad de distribución mundial que afecta tanto a animales como a humanos (Koneman et al., 2013). Es una enfermedad zoonótica importante en numerosas partes del mundo, especialmente los países Europeos Mediterráneos, el norte y este de África, el Medio Oriente, el sur y centro de Asia y América central y Sur América; sin embargo, muchas veces no es reconocida y no es reportada (OMS, 2006). En el centro y norte de Europa y en Australia la infección por *Brucella abortus* ha sido prácticamente erradicada (OIE, 2013). En Venezuela, se reporta que existe una prevalencia de brucelosis bovina, provocada particularmente por *B. abortus*, que se acerca al 10.5% (Vargas, 2002). En Brasil, se estima una prevalencia nacional aproximada del 4-5% de brucelosis bovina (Samartino, 2007). Estudios preliminares sugieren que la seroprevalencia de brucelosis en el humano es del alrededor del 2%, en las provincias del noroeste del Ecuador (Ron- Román et al, 2010).

Esta enfermedad está causada por bacterias del genero *Brucella*, son cocobacilos gran negativos pertenecientes la familia *Brucellaceae*, que se caracterizan por producir abortos, neonatos débiles, metritis, subfertilidad o infertilidad en los animales infectados, con la menor producción en leche y lana que ello conlleva, y por lo tanto produce importantes pérdidas económicas a nivel de la industria pecuaria (Bowden et al., 2007). El género *Brucella* está compuesto únicamente por bacterias patógenas de mamíferos, en los cuales producen enfermedades crónicas. De las especies que integran el género (9 especies y 15 biodiversidades), al menos cuatro son patógenas para el hombre (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis*) (Bowden et al., 2007).

En seres humanos la infección se presenta frecuentemente de manera accidental, causada al ingerir alimentos contaminados con *Brucella*, como

placentas, fetos, y productos lácteos no pasteurizados; o por abrasiones en la piel al manejar animales infectados (ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos y, en raras ocasiones perros). Sin embargo, pueden contaminarse también al inhalar el microorganismo (Willey et al., 2008). A pesar del esfuerzo que se realiza para controlar la enfermedad, existen regiones en donde la infección persiste en animales domésticos y consecuentemente la transmisión al humano se presenta de forma frecuente (OMS, 2006).

Se conoce que el género *Brucella* tiene marcada preferencia por un determinado huésped, sin embargo pueden infectar a otras especies en forma cruzada, entre ellas los caninos y el humano (Romero-Cabello, 2007). La infección en caninos tiene importancia epidemiológica debido a que estos contribuyen con la propagación de la bacteria, y el humano se puede llegar a contaminar a través de los caninos.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Con este estudio se pretende determinar la prevalencia de *Brucella* spp. en la población canina que se encuentran en contacto habitual e ingieren productos provenientes del ganado bovino, en el cual se sospecha la presencia de la enfermedad. Los bovinos son los hospedadores principales de la bacteria, sin embargo los caninos pueden contagiarse y a su vez transmitir al humano o mantener la enfermedad en la localidad. El estudio se desarrolló en la parroquia Juan Montalvo en el cantón Cayambe debido a que es un sector de pequeños productores de leche, en donde anteriormente no se han realizado estudios de prevalencia de *Brucella* spp. en caninos, por lo que es importante realizar ésta investigación a fin de determinar la presencia de la bacteria. Se escogió el sector de la Hacienda Ancholag, que cuenta con 3 comunidades indígenas, debido a la acogida de las personas para la realización del estudio. Al establecer si los caninos son reservorios de la bacteria, se podría determinar las cepas que se encuentran presentes en el área de estudio, y justificar que los caninos podrían ser utilizados como centinelas en la determinación de áreas donde la enfermedad podría estar presente.

1.3. OBJETIVOS

Identificar la prevalencia de *Brucella* spp. en la poblaciones caninas de tres comunidades indígenas localizadas en el sector de la hacienda Ancholag, parroquia Juan Montalvo, en el cantón Cayambe, provincia de Pichincha, Ecuador.

1.3.1 Objetivos específicos.

- Identificar la presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp. mediante la aplicación de las pruebas diagnósticas serológicas: Suero Aglutinación en Tubo (SAT) y Rosa de Bengala (RB), en la población canina de estudio.

- Determinar y analizar de los factores de riesgo que predisponen a la presencia de *Brucella* spp. en caninos mediante la correlación entre los resultados serológicos y aplicación de encuestas epidemiológicas.
- Realizar el aislamiento de *Brucella* spp. de los caninos positivos a las prueba de SAT y RB, para determinar las cepas que se encuentran presentes en el área de estudio.

1.4. HIPOTESIS

Existe la posibilidad de detectar brucelosis en la población canina que mantiene contacto habitual con ganado posiblemente infectado con *Brucella abortus* del sector de la hacienda Ancholag en la parroquia Juan Montalvo, en el cantón Cayambe, provincia Pichincha, Ecuador.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. HISTORIA

La brucelosis fue descrita por primera vez en el mundo por Marston en 1859, en la isla de Malta en el mar Mediterráneo. Allí, se presentó una epidemia de “fiebre del Mediterráneo” entre la población civil y miembros de la Armada Británica, con algunos casos fatales, de los cuales Sir David Bruce logró el aislamiento de una bacteria (que denominó *Micrococcus melitensis* en 1887), a partir del bazo de soldados infectados. En 1905, Horrocks demuestra la presencia de *M. melitensis* en la leche de cabra, que era consumida por las personas afectadas. Esto permite establecer la primera cadena epidemiológica (Bowden et al., 2007). El mismo año, en Dinamarca, Bang aísla de vacas una bacteria asociada con el aborto, que denomina *Bacterium abortus*, y demostró que era la causa de la enfermedad en humanos conocida como la enfermedad de Bang, brucelosis o aborto epizootico del ganado bovino (Merchant y Packer, 1980). En 1914 en los Estados Unidos de América, Traum se atribuye el aislamiento de una bacteria causante de abortos en cerdas, denominada *B. suis*. En 1918, la bacterióloga Alice Evans muestra la estrecha relación morfológica, fisiológica y serología existente entre las bacterias aislada por Bruce y por Bang, y propone agruparlas en un mismo género. Es en 1920 cuando Meyer y Shawn proponen la creación del género *Brucella* (Bowden et al., 2007).

El primer caso de fiebre ondulante humana producida por *B. abortus* fue estudiado por Keefer, en Sudáfrica en 1924. Este descubrimiento estimuló las investigaciones, dando por resultado el descubrimiento de numerosos otros casos, no solo en los Estados Unidos, sino en otros países. Pudo comprobarse que las tres especies (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*) afectan al hombre (Merchant y Packer, 1980).

En 1929, Huddleson desarrolla en Estados Unidos, medios bacteriológicos que permiten la diferenciación del género en tres especies (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*). La cepa vacunal de *B. abortus* S19 es aislada en 1923 por Buck, en tanto su poder protector en bovinos se demuestra en 1930. Wilson y Miles proponen en 1932 un esquema antigénico, basado en la existencia de dos antígenos, A y M, presentes en proporciones variables en las tres especies conocidas en esa época (Bowden et al., 2007).

Las vacunas muertas surgen a partir de 1945, con la cepa *B. abortus* 45/20 propuesta por Mc Ewen y Priestly. Por otra parte, Elberg obtiene la cepa mutante *B. melitensis* Rev. 1, probada como vacuna viva en cabras, en 1957. En esa época, Renoux en Túnez, pone a punto la vacuna muerta *B. melitensis* H38, y Stonner y Lackman aíslan *B. neotomae* de la rata *Neotoma lipidiae* en Estados Unidos (Bowden et al., 2007).

El primer aislamiento de *B. ovis* en el carnero es atribuido a McFarlen, Salisbury, Osborn y Jebson en Nueva Zelanda en 1950, pero es Buddle el que propone su denominación como tal. En 1968, Carmichael y Bruner, en Estados Unidos, aíslan por vez primera *B. canis* en una perra (Bowden et al., 2007).

García Ortiz (1987), cita en su libro La brucelosis en América y su relación con la infección humana, que el primer caso de brucelosis en bovinos en Ecuador se diagnosticó en 1927, sin embargo el primer caso en humanos diagnosticado en Ecuador se realizó en 1934 por el Dr. Valenzuela, en un paciente de la zona rural en la provincia de Pichincha. A partir de este año se inician estudios en el área de brucelosis en el Ecuador, llegando, en 1974 a plantearse un plan de contingencia y el acuerdo ministerial N. 220 en el cual se pone en vigencia el reglamento sobre el control y erradicación de la brucelosis en las especies animales susceptibles con el objetivo de erradicar la enfermedad en el país en el año 1992. A pesar del plan de contingencia propuesto, no se ha erradicado la enfermedad hasta la fecha actual (García-Ortiz, 1987).

En 1994, se aisló una especie de *Brucella* que no había sido reconocida antes en mamíferos marinos y un delfín en Escocia y California respectivamente. Con posterioridad, se aislaron otras cepas en focas, marsopas y nutrias, que correspondían al menos a dos biovariedades primariamente halladas en focas y cetáceos, denominadas tentativamente *Brucella maris*. También se caracterizaron cepas obtenidas de fetos abortados de delfín nariz de botella y se propuso el nombre *Brucella delphini* para ellos. Algunos controles serológicos de especies de focas, marsopas, delfines y ballenas han mostrado que los anticuerpos contra las especies de *Brucella* se distribuyen ampliamente entre los mamíferos marinos. El análisis molecular mostró que las cepas aisladas en ballenas, focas, marsopas y delfines son especies de *Brucella* pero son diferentes entre ellas, y de las otras especies de *Brucella* en muchos aspectos, como la estructura LPS y OMP. Sin embargo el elemento de inserción IS711, que se encuentra en todas las especies de *Brucella*, también se halla en los aislamientos marinos (Koneman et al., 2013).

2.2. ETIOLOGÍA

2.2.1 Taxonomía de las especies

Las bacterias del género *Brucella* desde el punto de vista filogenético, tendrían un origen común con microorganismos del suelo en estado libre. Análisis del ácido nucleico del gen 16S ribosomal (16S rRNA), la composición lipídica y ciertos aspectos de su fisiología y biología general sitúan a *Brucella* dentro de la subdivisión $\alpha 2$ de la Clase Proteobacteria, en la que están también otros patógenos intracelulares animales (*Rickettsia*), así como destacados patógenos y endosimbiontes de vegetales (*Agrobacterium* y *Rhizobium*), las propias mitocondrias y ciertas bacterias de la tierra (Young, 1997).

Por lo tanto, la asociación intracelular con eucariotas, es una tendencia evolutiva compartida con otros miembros de la subdivisión $\alpha 2$. Esto es coherente con algunas hipótesis sobre la patogenicidad y explica las reacciones cruzadas con proteínas de otros miembros de la subdivisión en pruebas serológicas y moleculares (Díaz et al., 2001).

Según Bowden (2007), y Osterman y Meriyón (2006), el género *Brucella* está compuesto por 9 especies distintas y 15 biovariedades: *B. abortus* (bovinos) (7 biovariedades), *B. canis* (caninos), *B. ceti* (delfines, marsopas, ballenas), *B. melitensis* (ovejas, cabras) (3 biovariedades), *B. microti* (zorros rojos, roedores de campo), *B. neotomae* (roedores), *B. ovis* (ovejas), *B. pinnipedialis* (focas), *B. suis* (porcinos) (5 biovariedades) (Bowden et al., 2007; Osterman y Meriyón, 2006).

Esta clasificación se basa principalmente en diferencias de patogenicidad y preferencia de hospedador para cada una de las especies. Se han separado en dos grupos principales debido a la apariencia de las cepas en cultivo, en lisas y rugosas (Koneman et al., 2013). Además existen estudios moleculares, particularmente de polimorfismo del ADN del locus *omp2* y sitios de restricción infrecuentes (IRS-PCR), que han permitido la diferenciación entre cepas de *Brucella* de mamíferos terrestres y mamíferos marinos, lo que ha facilitado, bajo la clasificación molecular, proponer dos nuevas especies de acuerdo a su hospedador preferencial; así *B. pinnipediae* (para aislados de pinnípedos) y *B. cetaceae* (para aislados de cetáceos) (Cloeckaert et al., 2003).

Algunos estudios sobre las relaciones genéticas de las brucelas revelaron otras características singulares del género. A diferencia de otras bacterias, algunas especies de *Brucella* spp. tienen dos cromosomas, menos *B. suis* biodiversidad 3, que tiene un solo cromosoma (Koneman et al., 2013).

El ser humano es susceptible a la infección por *B. melitensis*, *B. suis* (excepto por la biovariedad 2), *B. abortus* y *B. canis*. No se han comprobado casos humanos por *B. ovis* o *B. neotomae*. La especie más patógena e invasiva para el hombre es *B. melitensis*, seguida en orden decreciente por *B. suis*, *B. abortus* y *B. canis* (Sierra-López, 2008).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género Brucella.

Reino	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Alphaproteobacteria
Clase	Rhizobiales
Familia	<i>Brucellaceae</i>
Genero	<i>Brucella</i>
Especies	<i>Brucella melitensis</i> <i>Brucella ceti</i> <i>Brucella pinnipedialis</i> <i>Brucella microti</i> <i>Brucella abortus</i> <i>Brucella suis</i> <i>Brucella canis</i> <i>Brucella neotomae</i> <i>Brucella ovis</i>

Tomado de: National Library of Medicine, 2011.

2.2.2 Morfología y tinción

Los microorganismos del genero *Brucella* son cocobacilos pequeños, aerobios, gramnegativos que tienen un tamaño de 0.6 a 1.5 μm de largo por 0.5 a 0.7 μm de ancho, son inmóviles, no forman esporas, no se tiñen de forma bipolar y carecen de cápsula (Merchant y Packer, 1980). Son poco antigénicos y resistentes a los antibióticos (Gutiérrez -Pabello, 2010). Estas bacterias se tiñen de rojo con el método de Macchiavello, y con el método de Ziehl-Neelsen modificado; excepto *B. ovis*, se tiñen de color rojo cereza con el método de tinción de Koster (Biberstein y Chung Zee, 1994). A las pruebas de identificación bioquímica es oxidasa positivo, catalasa positivo, y productor de ureasa y ácido sulfhídrico (Romero-Cabello, 2007).

Brucella abortus, *B. suis* y *B. melitensis* son casi idénticas en tamaño y forma. La pared células de las *Brucellae* se halla compuesta de tres capas que son rígidas y que cuando se rompen aparecen como delgadas membranas colapsadas (Merchant–Packer, 1980). La membrana externa contiene distribuidos asimétricamente fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS) que es considerado el principal antígeno. El espacio periplasmático comprendido entre la membrana interna y externa contiene enzimas y proteínas relacionadas con el transporte de solutos y un gel glucopéptídico, denominado peptidoglucano, responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria (Bowden et al., 2007).

Por lo general forma colonias que aparecen aisladas, pero pueden presentarse en pares o pequeños grupos. No son pleomórficas, salvo en cultivos viejos (Bowden et al., 2007), crece lentamente en cultivo y por lo general requiere una semana o más para tal efecto, necesita medios de cultivo selectivos, es aerobio estricto, el crecimiento de algunas cepas exigen la adición de dióxido de carbono (5-10% de CO₂ para cultivo) y no fermentan hidratos de carbono (Murray et al., 2006). Crecen a temperaturas que varían entre 20-40°C y con un pH óptimo de 6,6 a 7,4 (Bisping y Amsterberg, 1988).

Las colonias adoptan morfologías lisas (translucidas, homogéneas) y rugosas (opacas, granulares o pegajosas) determinadas por el antígenos O del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular. El antisuero frente a una forma (lisa) no produce una reacción cruzada con la otra (rugosa). Las especies de *Brucella* pueden caracterizarse en mayor medida por la producción relativa de epítomos antígenos, conocidos como antígenos A y M, que residen en la cadena polisacáridica O del LPS liso (Murray et al., 2006).

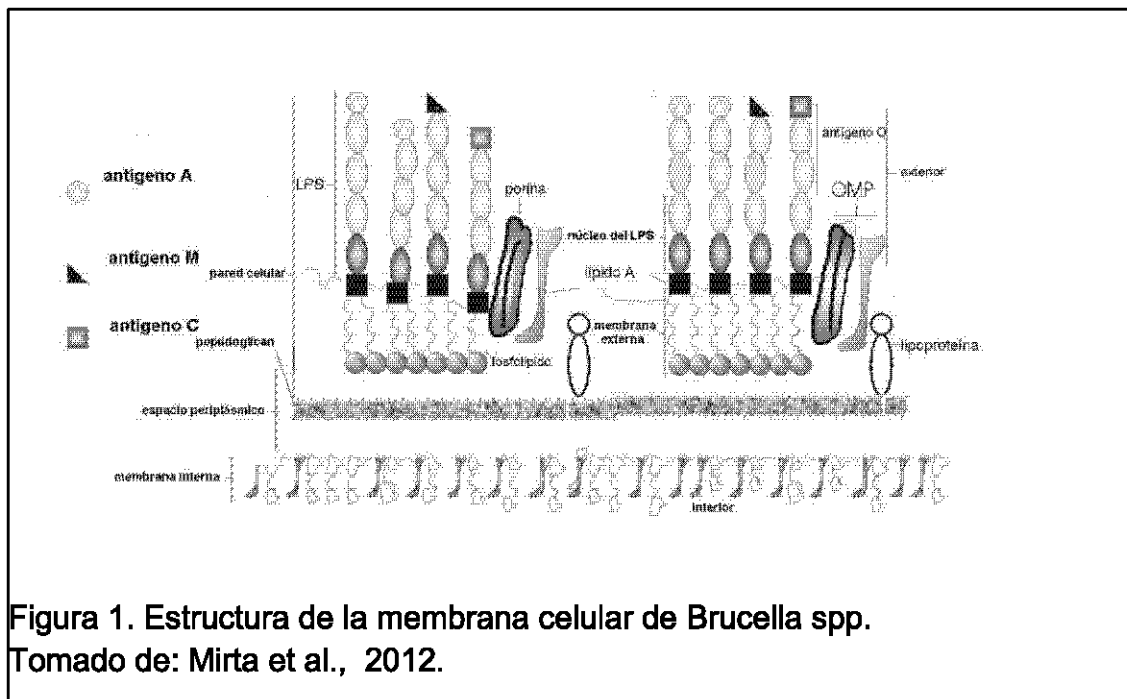


Figura 1. Estructura de la membrana celular de *Brucella* spp.
Tomado de: Mirta et al., 2012.

2.2.3 Transmisión

Las infecciones por *Brucella* están diseminadas por todo el mundo. *B. abortus* se encuentra en todas partes donde hay ganado bovino. La frecuencia de la infección, especialmente en el ganado bovino es proporcional al tráfico comercial; en ciertas partes del sur de los Estados Unidos y zona de los ranchos, ha habido poco trasiego de ganado y el porcentaje de infección es pequeño (Merchant- Packer, 1980).

En lo que respecta al ganado, la enfermedad se trasmite por ingestión, penetración a través de la piel intacta y conjuntiva, y la contaminación de la ubre durante el ordeño. La bacteria no se multiplica en el ambiente, simplemente persiste y la viabilidad de la bacteria fuera del hospedador depende de las condiciones ambientales presentes (Sierra-López, 2008). Las formas más comunes de propagación es el pastoreo en praderas infectadas, o consumir alimentos o agua contaminada por secreciones y membranas fetales de vacas infectadas, y el contacto directo con fetos abortados y con terneros neonatos infectados. Dentro del rebaño se puede producir una transmisión tanto vertical como horizontal (Radostis et al., 2002).

La transmisión horizontal suele ser por contaminación directa, y aunque existe la posibilidad de que la infección se propague por moscas, garrapatas, perros, y otros vectores, estos no son significativos para aplicar medidas preventivas. Existen pruebas de transmisión horizontal de perro a perro, perro a bóvido, bóvido a perro y perro a persona. La forma más probable y eficaz de transmisión bóvido a perro es por exposición a fetos abortados o membranas placentarias abortadas, ya que los perros las suelen ingerir (Radostis et al., 2002).

La infección vertical se puede producir en terneros de vacas infectadas, pero su frecuencia es baja. La infección se produce in-útero y puede permanecer latente en el ternero durante los primeros meses de vida; el animal puede permanecer serológicamente negativo hasta su primer parto, momento en el cual empieza a eliminar la bacteria (Radostis et al., 2002).

El hombre se infecta de los animales por contacto directo con secreciones de animales infectados a través de abrasiones o heridas en la piel, o indirectamente por ingestión de productos de origen animal, como también por la inhalación de aerosoles infectantes. La importancia relativa del modo de transmisión y de las puertas de entrada del agente etiológico, varía con el área epidemiológica, los reservorios animales y los grupos ocupacionales expuestos al riesgo (Sierra-López et al., 2008).

En un estudio realizado en las Pampas Argentinas de brucelosis en el zorro gris pampeano (*Pseudalopex gymnocercus*), se obtuvo que es susceptible a la infección por *Brucella abortus*, con una tasa de incidencia representativa, donde este puede ser uno de los vectores de transmisión al ganado vacuno de la región, pero el papel que juegan los zorros grises y otros animales silvestres en la epizootiología de la brucelosis aún se encuentra en estudio (Martino, 2001).

2.2.4. Patogenia

B. abortus tiene predilección por el útero gestante, la ubre, los testículos y las glándulas sexuales accesorias masculinas, os ganglios linfáticos, la capsula y la bolsa articular. Tras la invasión inicial, la bacteria se suele localizar en los ganglios linfáticos regionales y se extiende a otros tejidos linfáticos incluyendo el bazo, los ganglios linfáticos mamarios e iliacos (Radostis et al., 2002).

Todas las bacterias del género son parásitos intracelulares facultativos de las células epiteliales y de los fagocitos profesionales. Después de que penetran en la piel o las mucosas, se multiplican en los macrófagos de los sinusoides hepáticos, bazo, medula ósea y otros componentes del sistema reticuloendotelial y finalmente darán origen a granulomas. La supervivencia intracelular se facilita por la inhibición del sistema de mieloperoxidasa de la fusión de fagosoma-lisosoma. Esto se continúa con la formación de un fagosoma de replicación y con multiplicación continuada en las vesículas relacionadas con el retículo endoplasmático. Las brucelas también son capaces de inhibir la apoptosis, con lo que prolongan su supervivencia en la célula hospedadora en donde se replican (Ryan y Ray, 2010).

El LPS de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* contienen dos determinantes antigénicos importantes denominados A (por "abortus") y M (por "melitensis"). Además de proporcionar marcadores para las determinaciones de las biovariedades, estas moléculas cumplen un papel en la virulencia del microorganismo (Koneman, 2013).

2.2.5. Resistencia de la bacteria en el ambiente

En el medio, *Brucella* sobrevive por periodos relativamente largos, teniendo en cuenta que es una bacteria no esporulada. En el suelo húmedo y el estiércol usado como abono, se registran tiempos de sobrevivencia de hasta 80 días. En el polvo, según la humedad del ambiente, entre 15 y 40 días. Esto hace que *Brucella* spp. pueda diseminarse eficientemente de un medio infectado a uno indemne; los recipientes de leche o agua, las camas, los

instrumentos contaminados, los zapatos, perros y aves les sirven de vehículo (Bowden, et al, 2007).

Tabla 2. Tiempo de supervivencia de B. abortus en el ambiente.

Material	Tiempo de supervivencia
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15-40 días
Leche a temperatura ambiente	2-4 días
Fluidos y secreciones en verano	10-30 minutos
Lanas de depósitos	110 días
Agua a 37° C y pH 7.5	Menos de 1 día
Agua a 8° C y pH 6.5	Más de 57 días
Fetos mantenidos a la sombra	6-8 meses
Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Manteca a 8° C	1-2 meses
Cuero manchado con excremento de vaca	21 días
Paja	29 días
Grasa de ordeño	9 días
Heces bovinas naturales	1-100 días
Tierra húmeda a temperatura ambiente	66 días
Tierra desecada a temperatura ambiente	4 días

Tomado de: Castro et al., 2005.

Por otro lado se postula que las brucelas pueden permanecer viables en orina, leche, agua y tierra húmeda hasta por 4 meses. Menciona que resisten a la congelación y a la descongelación, pero que son destruidas por temperaturas de pasteurización, es decir el calentamiento a 60° C durante 10 minutos (Biberstein y Chung Zee, 1994). Son sensibles a los desinfectantes de los grupos de los fenoles, halógeno, cloro, amonio cuaternario y aldehído (Radostis et al., 2002).

2.2.6. Mecanismos de defensa y curación

La respuesta del hospedador a la infección por *Brucella* spp. es variable, dependiendo de varios factores: 1. El hospedador (idiosincrasia, edad, sexo, estado reproductivo, estado inmunológico), y 2. Del agente (dosis infectante, virulencia de la cepa) (Bowden et al., 2007).

Para la curación (eliminación total de los microorganismos en el hospedador) depende de la inmunidad mediada por células. En caninos infectados con *B. abortus* es posible que exista bacteriemia durante meses y años sin pruebas de curación o de que se desarrolle un estado de inmunidad (Biberstein y Chung Zee, 1994).

Durante la diseminación en el organismo, las bacterias que se localizan extracelularmente están expuestas a los mecanismos normales de defensa antibacterianos del hospedero donde quedan atrapados y mueren dentro del sistema retículo-endotelial. La acción bactericida se divide en dos partes: pre-fagocítica y post-fagocítica (Whatmore et al., 2007).

- Fase pre-fagocítica: la bacteria se expone a factores séricos (anticuerpos específicos, proteínas no inmunoglobulinas brucélicas), que se encuentran en el suero bovino normal. En individuos inmunizados los anticuerpos vacunales juegan un papel importante en la expulsión de la *B. abortus*.
- Fase post-fagocítica: donde los microorganismos pueden quedar expuestos a la acción bactericida intracelular como la formación de peróxido, superóxido de hidrógeno, halogenación por el sistema mieloperoxidasa-peróxido de hidrógeno haluro, catiónicas y enzimas digestivas. Desafortunadamente en el caso de cepas virulentas de *B. abortus* los procesos bactericidas intracelulares puede evitarse mediante la liberación de factores de virulencia bacterianos (Whatmore et al., 2007).

Las placentas y membranas fetales de bovinos, cerdos, ovejas y cabras contienen eritrol, un factor de crecimiento para brucelas. En esas especies la proliferación de microorganismos en las hembras gestantes conduce a

placentitis y aborto. En la placenta humana no hay eritrol, y en los humanos la infección no produce abortos (Brooks et al., 2002).

2.2.7. Respuesta inmunológica

2.2.7.1. Respuesta humoral

Al momento de ingresar la bacteria ya sea por vía conjuntival, genital, inseminación artificial, ectoparásitos y siendo la principal la venérea; en la respuesta inmunológica los fagocitos desarrollan su defensa por un estallido oxidativo, acidificando los fagosomas a un pH bajo con lisosomas que vierten péptidos antimicrobianos dentro del agente (Restrepo- Salazar et al., 2008).

La cinética de anticuerpos (Ac) medida con las pruebas serológicas clásicas refleja la evolución temporal de la respuesta de los anticuerpos anti-LPS (Bowden et al., 2007).

La inmunoglobulina específica M (IgM) constituye la primera línea de defensa ante la infección, manteniéndose presente por varias semanas o meses, al momento que empieza a disminuir, los anticuerpos IgG incrementan su presencia y se mantienen en la sangre en bajas cantidades por meses o años. Los anticuerpos IgG están presentes en infecciones recurrentes (Smits et al, 2003).

Tras un primer contacto con *Brucella* por vacunación, la serología se vuelve positiva a la primera o segunda semana, con un predominio de Ac de clase IgM durante las primeras semanas. La respuesta de IgG comienza tempranamente, antes que la IgM llegue a su pico, y puede alcanzar su máximo entre la tercera o cuarta semana. Tras la exposición a cepas virulentas, la respuesta serológica se manifiesta luego de 4-10 semanas. La infección crónica se caracteriza en el bovino por la síntesis prolongada de IgG1. Los niveles de Ac IgG2 pueden variar de acuerdo con el individuo, en tanto que los de Ac IgG1 sufren una disminución en el periodo próximo al parto, debido a la derivación suero-calostro propia de la Ig (Bowden et al., 2007).

La respuesta inmunitaria humoral ha mostrado ser ineficaz en la eliminación de la infección, lo que origina que la evolución de la enfermedad dependa fundamentalmente de los sistemas de defensa celular tanto específicos como inespecíficos (Orduña et al, 2001c).

Debido a que las bacterias del género son parásitos intracelular es necesario la respuesta inmune mediada por células. La inmunidad se basa principalmente en la producción de interferón- γ (IFN- γ) y anticuerpos IgG2. La producción del interferón resulta en la activación de las células del sistema inmune innato que contribuyen a la activación de la inmunidad tipo 1, y los anticuerpos IgG2 son efectivas opsoninas que promueven la fagocitosis de las bacterias (Baldwin y Goenka, 2004).

2.2.7.2. Respuesta celular

Los linfocitos de animales infectados reaccionan precozmente frente a *Brucella* spp., como se ha observado realizando pruebas de blastogénesis. Estas respuestas son detectables incluso antes que los Ac séricos. Sin embargo, debido a la variedad de los antígenos y métodos empleados, y de las respuestas individuales, este método no ha permitido diferenciar entre animales vacunados y animales infectados, ni resolver el problema de las reacciones cruzadas (Bowden et al., 2007).

Los animales vacunados o infectados por cepas virulentas desarrollan una reacción de hipersensibilidad tipo IV (mediada por células) cuando son inyectados intradérmicamente con extracto de *Brucella* spp. Esta respuesta evidencia un contacto previo con *Brucella* spp. pero no está relacionada con la protección (Bowden et al., 2007).

2.2.7.3. Respuesta inmune de la defensa

Tanto los anticuerpos como los linfocitos T colaboran en la resistencia, los Ac son especialmente eficaces en las primeras etapas de la infección, siendo que los Ac anti-LPS-S eficaces frente a especies en fase lisa, mientras que los Ac anti-LPS-R t anti-PME lo son frente a infecciones por especies rugosas (Bowden et al., 2007).

Los linfocitos T actúan a través de la secreción de linfoquinas activando los macrófagos, los cuales tendrían finalmente el control de la infección. Resultados obtenidos en pruebas demuestran la participación de linfocitos citotóxicos CD4+ CD8+ en la lisis de células infectadas por *Brucella* spp. (Bowden et al., 2007).

2.3. EPIDEMIOLOGÍA

2.3.1. Situación de la brucelosis a nivel mundial

La infección por *Brucella* tiene una distribución universal (Murray et al., 2006). Las zonas de mayor riesgo son aquellas donde no existen programas de control animal o son muy precarios, incluyendo la zona mediterránea (Portugal, España, el sur de Francia, Italia, Grecia, Turquía, norte de África), Suramérica, América central, Europa del este, Asia, África, el Caribe y Oriente Medio (Willey, et al, 2009). Cada año se reportan más de 500.000 casos, mientras que la incidencia de la enfermedad en Estados Unidos es mucho más baja (104 infecciones en el año 2004) (Murray et al., 2006).

La brucelosis es una enfermedad de gran importancia en la salud humana, por ser considerada una zoonosis. La incidencia y la prevalencia de la brucelosis tienen importantes variaciones geográficas. Las zonas de mayor prevalencia corresponden a la región del Mediterráneo, Asia occidental, algunas partes de África y América (Estados Unidos, México, Brasil, Perú, Colombia y Argentina). *B. melitensis* es la especie más difundida seguida de *B. abortus* y *B. suis*. (OIE, 2013)

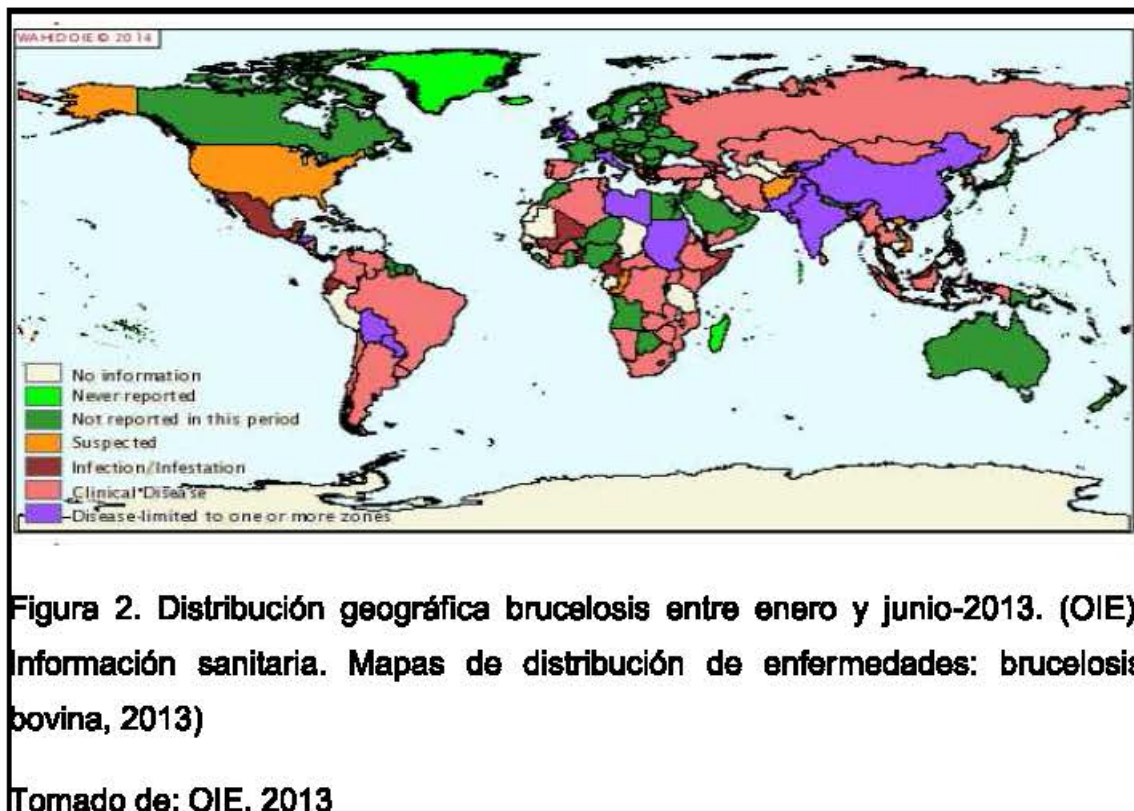
En el centro y norte de Europa y en Australia la infección por *Brucella abortus* ha sido prácticamente erradicada. En Norteamérica, es especialmente prevalente en las zonas agrícolas del norte y centro de México, siendo la prevalencia en América central del 4 a 8%, mientras que en Estados Unidos ha disminuido considerablemente los últimos años (OIE, 2013).

En Europa el zorro gris y el rojo son conocidos como reservorios de la enfermedad, por lo que poseen métodos de erradicación no solo del ganado

doméstico infectado sino también en el silvestre, por lo que la prevalencia de la enfermedad son mucho más bajas que en la zona de la Pampa Argentina (Pavlov, 2002).

En el año 2005, doce de los Estados miembros de la Unión Europea obtuvieron el certificado de “oficialmente libres de brucelosis”, mientras que en los trece estados restantes, se encontró que el 0.26% de los rebaños estaban infectados o eran positivos a brucelosis bovina. En España, este porcentaje ascendía el 1.26% (Sierra-López et al., 2008).

En humanos, en Estados Unidos, el número de casos ha disminuido de forma estable desde un máximo de más de 6000 casos al año en el decenio de 1940-1949 hasta las cifras actuales de 100 casos por año. El 50%-60% de éstos, ocurre en empleados de haciendas, inspectores de camales, veterinarios y otras personas que manipulan ganado; el 8%-10% de casos se da por consumo de productos lácteos no pasteurizada (Ryan y Ray, 2010).



2.3.2. Situación de la brucelosis en América Latina

En Sudamérica se encuentra en varios países, donde en muchos casos es endémica y es considerado un problema sanitario importante. Las zonas de mayor riesgo son aquellas donde no existen programas de control animal o son muy precarios, entre éstos se encuentran América central y Suramérica. Entre los países más afectados encontramos México, Argentina y Perú (Sierra-López et al., 2008).

Los países latinoamericanos en donde se registran el mayor número de casos de brucelosis humana son Argentina, México y Perú (Sierra-López et al., 2008).

En un estudio realizado en perros urbanos de una zona de Buenos Aires, se determinó la prevalencia de anticuerpos contra *Brucella* spp, así como también el aislamiento de la bacteria y la recopilación de datos clínicos por su riesgo de infección hacia los seres humanos (Badakhsh, 2005).

Estudios realizados en la prevalencia de *Brucella canis* en el zorro gris de las Pampas Argentinas en el cetro-oeste, se demostró que no se ha expuesto a esta especie por lo que no resulta susceptible a la enfermedad por lo que no se encuentra diseminada en esta área, y que son mucho más susceptibles a *Brucella abortus* al ingerir los fetos y placentas abortadas por los vacunos infectados (Rementzova, 2001).

En Venezuela, se reporta que existe una prevalencia de brucelosis bovina, provocada particularmente por *B. abortus*, que se acerca al 10.5% (Vargas, 2002).

En el estudio publicado el año 2007, se estima una prevalencia nacional aproximada del 4-5% de brucelosis bovina en Brasil (Samartino, 2007). En Perú en el mismo año, se han registrado 1,166 casos de brucelosis humana, presentando un 95% de los casos en las provincias de Lima y el Callao, se encontró una prevalencia del 0.26% de brucelosis caprina en la provincia del Callao (Toledo et al, 2007).

En un estudio realizado por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) en el año 2008, se registra una prevalencia de *B. abortus* en el ganado del 4%, en lo que respecta al humano, la seroprevalencia de la enfermedad es del 4% también, lamentablemente no existe información sobre si la casuística en seres humanos estuvo relacionada con casos en bovinos u otras especies por consumo de lácteos crudos, por manipulación de fetos y órganos de la reproducción a nivel de mataderos, por manejo del germen a nivel de laboratorio o por accidentes de vacunación de campo (Orejuela et al., 2009).

2.3.3. Situación de la brucelosis en Ecuador

En Ecuador la brucelosis bovina se encuentra ampliamente difundida, en diferentes regiones, y su prevalencia varía de acuerdo a varios factores, entre ellos a los distintos sistemas de producción ganadera existentes (Ron-Román et al., 2012).

En el año 1979, el Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria (SESA), ahora Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro

(Agrocalidad), realizó un estudio en el que diferenció regionalmente la prevalencia de la enfermedad.

- **Región uno de Alta Prevalencia:** localizada en las provincias del norte de la sierra ecuatoriana, es decir la cuenca lechera nacional, conformada por: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo, con una prevalencia de 1.97% a 10.62%.
- **Región Dos de Alta Prevalencia:** conformada por las provincias del Litoral: Esmeraldas, Manabí, Santa Elena, Guayas, Los Ríos, El Oro y Sto. Domingo de los Tsáchilas, con una prevalencia entre 4,2% a 10,62%.
- **Región Tres de Baja Prevalencia:** conformada por las provincias de Bolívar, Cañar, Azuay, Loja, con una prevalencia de 1.3% a 2.6%.
- **Región Cuatro de Baja Prevalencia:** no se dispone de información sobre las provincias Amazónicas, pero se estima que dados los sistemas de producción existentes, los niveles de ocurrencia deben ser igualmente bajos.
- **Región Cinco Indemne:** en 1997, se realizó una encuesta serológica por muestreo en 114 propiedades de las islas Santa Cruz, Isabela, San Cristóbal, y Floreana, resultando 507 muestras negativas a la prueba Rosa de Bengala, con cuya base se considera a las Islas Galápagos como zona Indemne a Brucelosis Bovina. (PNSA-MAG, 1979, citado en Agrocalidad, 2009)

En un estudio realizado en el cantón Gualaquiza de la Provincia de Morona Santiago en brucelosis bovina se determinó que la prevalencia de la enfermedad es de 2,22% en 225 bovinos en el año 2010 (Espinoza, 2010).

En el 2008, un estudio realizado en caninos en el cantón Mejía, provincia de Pichincha, reporto una prevalencia aparente de anticuerpos contra *Brucella* spp. del 30.46%, en este estudio se pudo aislar *B abortus* en 5 perros con resultados positivos a la serología, de una población total de 151 perros (Benítez, 2008).

En humanos, la brucelosis ha sido reportada con una incidencia baja (entre 1990 y 2007, infectó a no más de 0.21 por cada 100,000 personas, mientras que en el mismo lapso de tiempo, en Carchi, cuatro casos positivos fueron detectados (0.62 por cada 100,000 personas). Sin embargo, estudios preliminares realizados por el Centro Internacional de Zoonosis (CIZ) sugieren que la seroprevalencia de brucelosis en el humano es del alrededor del 2%, en las provincias del noroeste del país; además, se realizó el reporte de un caso clínico en un trabajador de finca de la provincia del Carchi, con orquitis unilateral, estudiado en el año 2010, se reportó una elevación de IgM e IgG poco tiempo después de la finalización del tratamiento, por lo que se instauró antibióticoterapia para tratar una posible recaída (Ron-Román et al., 2012).

2.4. DIAGNÓSTICO

2.4.1. Diagnóstico clínico

La brucelosis no presenta un cuadro clínico característico que permita una detección precoz del paciente infectado, lo que favorece la evolución de afecciones crónicas, complicando las alternativas terapéuticas y la curación definitiva. Los síntomas que conducen a sospechar de brucelosis son los abortos tardíos y la infertilidad en las hembras; y epididimitis, prostatitis e infertilidad en los machos; en ambos sexos discoespondilitis, uveítis anterior y linfadenopatía, sobre todo, sin son generalizadas. Sin embargo se confirma por serología, pero el diagnóstico definitivo solo puede establecerse por el aislamiento bacteriológico (Gómez y Guida, 2010).

El periodo de incubación por lo general dura de 1 a 3 semanas, alrededor del 50% de los pacientes infectados por *Brucella* desarrollan la enfermedad septicémica, cuyos síntomas aparecen hasta 2 meses después de la exposición. Los síntomas son de aparición repentina e insidiosa, son inespecíficos y consisten en malestar general, escalofríos, sudoración, fatiga, debilidad, mialgias, pérdida de peso, artropatías y tos no productiva. Casi todos los pacientes presentan fiebre, la cual puede ser intermitente en los no tratados, de ahí el nombre fiebre ondulante (Sierra-López et al., 2008). Los

sujetos quejados de enfermedad avanzada pueden mostrar síntomas digestivos (70% de los pacientes), lesiones osteoesqueléticas o derrames articulares (20-60%), síntomas respiratorios (25%) y, con menor frecuencia, manifestaciones cutáneas, neurológicas o cardiovasculares. Los pacientes que no reciben un tratamiento adecuado pueden padecer infecciones crónicas (Murray et al, 2006).

La brucelosis humana inicia con malestar general, escalofríos y fiebre 7-21 días después de la infección. Es común la aparición de diaforesis profusa avanzada la tarde o al inicio de la noche, conforme la temperatura se ubica en el intervalos de 39.4°C a 40°C. El patrón de fiebre nocturna periódica (fiebre ondulante) por lo común continúa por semanas, meses o incluso 1 o 2 años. Los pacientes sufren enfermedad crónica con dolor generalizado, cefalea y anorexia. Menos el 25% de los pacientes muestran aumento detectable en el tamaño de los órganos retículo-endoteliales, los cuales son el sitio primario de la infección. De tales manifestaciones la esplenomegalia es la más común, seguida de linfadenopatía y hepatomegalia. En ocasiones se desarrolla infección localizada en pulmón, hueso, tejido cefálico, corazón y aparato genitourinario. Estos casos por lo común carecen de los síntomas sistémicos pronunciados de la enfermedad (Ryan y Ray, 2010). La mortalidad es baja, inferior al 2%. Las secuelas de la brucelosis son variables e incluyen hepatitis granulomatosa, artritis periférica, espondilitis, anemia, leucopenia, trombocitopenia, meningitis, uveítis, neuritis óptica, papiledema y endocarditis (Willey et al., 2008).

En bovinos el periodo de incubación es de 1 a 6 semanas. El inicio de la enfermedad presenta malestar, fiebre, dolor y sudoración. Por lo general la fiebre se eleva en la tarde, desciende en la noche y por lo general el descenso se presenta con diaforesis profusa. Existe hipertrofia de ganglios linfáticos y es posible palpar el bazo. La hepatitis a veces se acompaña de ictericia. El dolor profundo y los trastornos motores, particularmente en los cuerpos vertebrales sugieren osteomielitis. En el caso de cronicidad, se caracteriza por debilidad, mialgias y dolor, fiebres de poca intensidad, nerviosismo y otras

manifestaciones inespecíficas compatibles con síntomas psiconeuróticos. Sin embargo el síntoma principal en hembras gestantes, es el aborto en el último tercio de la gestación y suele darse por lo general en la primera gestación post infección (Brooks et al, 2002).

En caninos el signo clínico principal de la brucelosis en las hembras es la pérdida de la gestación, que puede ocurrir en fases tempranas (día 20), dando lugar a la reabsorción fetal o, más comúnmente, (75% de los casos aproximadamente) en el último tercio de la gestación (día 45-59), resultando en abortos. Las hembras no grávidas pueden ser asintomáticas o mostrar linfadenopatía regional. En los machos la enfermedad afecta principalmente la porción del tracto reproductivo que participa en la maduración, el transporte y almacenamiento de espermatozoides. Se observa epididimitis, orquitis, dermatitis escrotal, atrofia testicular e infertilidad. El semen de perros infectados con *Brucella* spp. Se caracteriza por disminución de recuento espermático (oligospermia), pobre motilidad espermática (astenospermia) y aumento de las anomalías morfológicas (teratospermia). Las infecciones crónicas en ambos sexos pueden resultar en uveítis, esplenitis granulomatosa, discoespondilitis, dermatitis granulomatosa, meningoencefalitis y nefritis. La bacteriemia puede persistir durante años y los perros asintomáticos permanecen infecciosos durante largos periodos de tiempo (Bonagura y Twedt, 2010).

2.4.1.1. Lesiones anatomopatológicas

La lesión más común de la brucelosis es el piogranuloma, sin embargo el órgano que experimenta los mayores cambios patológicos es la placenta. Normalmente, la placenta está engrosada y recubierta con un exudado purulento de color amarillo-pardo y la consistencia gelatinosa que le confiere un aspecto resistente y coriáceo. Los cotiledones afectados son blandos, necróticos y también están recubiertos con exudado. En las hembras, la principal manifestación clínica de la brucelosis es el aborto, que con frecuencia va acompañado de la retención de placenta. En los machos, la principal

manifestación clínica son la orquitis, la epididimitis o ambas (Biberstein y Chung Zee, 1994).

En el caso de fetos abortados, el feto no presenta lesiones patognomónicas, pero es común encontrar bronconeumonía. La placenta se observa edematosa con lesiones infamatorias y cotiledones necrosados. El feto puede permanecer muerto en el útero alrededor de 24 a 72 horas, iniciando un proceso de autólisis que producirá endotoxinas secundariamente a la muerte del feto (Whatmore, et al. 2006).

2.4.1.2. Recolección de las muestras (especímenes)

Los líquidos a recoger en animales vivos son: sangre, leche, semen y exudado vaginal en las hembras que han abortado recientemente. En los animales muertos, los tejidos más apropiados para contener microorganismos son los del sistema macrofágico. Los tejidos de elección son los ganglios linfáticos supramamarios, retrofaríngeos, ilíacos internos, lumbares y mesentéricos. El bazo, el hígado y el útero también deben ser sembrados, al igual que el líquido articular de las articulaciones que presentan aumento de tamaño y cualquier otro tejido u órgano con una lesión evidente. Los productos del aborto son las fuentes de microorganismos más ricas y de aquí que habitualmente los aislamientos se puedan llevar a cabo a partir de la placenta, de las membranas y líquidos fetales, y del contenido estomacal del feto (Biberstein y Chung Zee, 1994).

Todos los tejidos y líquidos deben ser introducidos en bolsas de plástico impermeables, o en recipientes de plástico o metálicos, que deben ser manipulados con gran cuidado (Biberstein y Chung Zee, 1994). Las muestras a remitir deben ser enfriadas inmediatamente luego de su extracción y si han de ser enviadas a sitios alejados (12 horas o más de viaje), deben ser congeladas. Deben transportarse en envases estancos. Es conveniente un recipiente impermeable en el que irá envuelta la muestra, rodeado de un material absorbente y todo condicionado en un recipiente sólido apto para su transporte (Bowden et al., 2007).

1. Leche: deberá obtenerse de todos los cuartos de la vaca y de cada mama en las ovejas y cabras; en total 20 ml aproximadamente.
2. Hisopados vaginales: el periodo postparto o post-aborto es el ideal; se extiende por 4-6 semanas.
3. Sangre: 10ml, con citrato de sodio como anticoagulante. En el caso de los perros, las muestras de sangre se inyectan directamente en el frasco de medio bifásico.
4. Membranas fetales: especialmente cotiledones, o porciones de éstos; se eligen aquellos que macroscópicamente aparecen como más afectados. Estas muestras pueden contener un muy alto número de bacterias, por lo que deben manipularse con sumo cuidado.
5. Fetos: contenido estomacal, trozos de bazo, ganglios, pulmón
6. Tejidos sólidos: fragmentos de bazo, ganglios linfáticos, pulmón o cotiledones fetales son macerados en solución salina estéril antes de su siembra. La homogenización de estos tejidos aumenta las probabilidades de aislamiento, respecto de la simple siembra por contacto o frotamiento entre el tejido y la superficie del medio de cultivo (Bowden, et al, 2007).

2.4.2. Diagnóstico de laboratorio

A partir de las 2 semanas post infección, comienzan a detectarse anticuerpos contra *Brucella*. Tradicionalmente se utilizan en la práctica métodos directos e indirectos de identificación (Gómez y Guida, 2010).

Cualquier prueba serológica o combinación de pruebas que existen actualmente mide la respuesta de un solo animal en un momento dado y no describe el estado del rebaño, las limitaciones propias de cada prueba se pueden reducir al mínimo si se realizan según la secuencia recomendada y en combinación con la consideración de datos epidemiológicos precisos. Ninguna prueba es absolutamente precisa, y los grados de sensibilidad varían (Radostis, et al., 2002).

2.4.2.1. Métodos indirectos

Aunque el diagnóstico de certeza, de especificidad absoluta, es el bacteriológico, las dificultades propias de su implementación hacen que la serología sea el recurso diagnóstico más utilizado.

2.4.2.1.1. Aglutinación lenta en tubo de Wright (SAT)

La más antigua (1897), es aun utilizada para el diagnóstico de brucelosis animal y humana, así como para el control de reproductores en operaciones de importación y exportación, es una prueba semi-cuantitativa, a pH neutro, muy sensible a anticuerpos de clase IgM, también detecta IgG2. Su especificidad y sensibilidad son relativamente bajas. (Bowden et al., 2007)

Se realizan diluciones crecientes del suero a investigar que se enfrentan con cantidades constantes de antígeno observándose la presencia o no de aglutinación luego de un período de incubación. De esa forma se determina el título como la máxima dilución aglutinante (Lucero et al, 2008).

La prueba de aglutinación en suero (SAT) se mantiene como la herramienta más popular para el diagnóstico de brucelosis que detecta anticuerpos del tipo IgM. En animales títulos de aglutinación mayores a 1:160 se consideran como diagnósticos en conjunto con una presentación clínica compatible. Sin embargo, en áreas donde la enfermedad se considera endémica, usar títulos de aglutinación mayores a 1:320 para el diagnóstico puede ser mucho más específico. (Papás, et al, 2005)

2.4.2.1.2. Prueba de aglutinación con y sin 2-mercaptuetanol (2-ME)

Es una variante de la anterior que emplea el tratamiento previo con 2-ME como agente reductor, está orientada a neutralizar la actividad aglutinante de los anticuerpos de clase IgM, que predominan tras una vacunación. Esta prueba actúa mediante la despolarización reductora (Bowden, et al., 2007). Se realizan simultáneamente las pruebas de aglutinación en tubo con y sin tratamiento del suero con 2-ME. La diferencia de título obtenida entre ambas pruebas corresponde a los anticuerpos IgM, cuando los títulos son mayores de 1:20 el resultado es positivo (Lucero et al, 2008).

2.4.2.1.3. Reacción de Huddleson, Antígeno Tamponado en Placa (BPA)

Son pruebas de lectura rápida (8 minutos) de aglutinación en placa, que emplea suspensiones de *Brucella* ajustadas a pH 3,65 a 3.8. En esas condiciones son detectados los anticuerpos de clase IgG1. Son pruebas de elección como tamiz o criba, dada su sensibilidad, costo operativo y sencillez (Bowden, et al., 2007).

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. Mide los anticuerpos de clase IgM, IgG1, IgG2 e IgA. Los títulos significativos son los mayores de 1:40. En ocasiones se observa el fenómeno de prozona, donde puede estar ausente la aglutinación en los títulos más altos a causa de un exceso de anticuerpos. Este hecho debe tenerse en cuenta para evitar falsos resultados negativos por esa causa (Lucero et al, 2008).

2.4.2.1.4. Prueba de Rosa de Bengala

Utiliza como antígeno en una suspensión bacteriana a la que se ha añadido el colorante rosa de bengala, enfrentándola al suero sin diluir del enfermo. Proporciona una aproximación diagnóstica en pocos minutos con una sensibilidad y especificidad muy altas. Presenta elevado grado de correlación con la seroaglutinación y, por su simplicidad, es muy útil como prueba de despistaje inicial o screening, ya que sus resultados se informan como positivos o negativos. Sus falsos negativos se limitan a enfermos con procesos de pocos días de evolución y a algunos casos de enfermedad de curso muy prolongado (Sierra-López, 2008).

2.4.2.1.5. Prueba de Coombs

La prueba de antiglobulina (prueba de Coombs) es utilizada como prueba complementaria, sobretodo en el diagnóstico de brucelosis humana (Bowden, et al., 2007). Se utiliza para demostrar la presencia de anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes, fundamentalmente IgG. El suero de Coombs (inmunoglobulina humana) se encargaría de facilitar la aglutinación de los anticuerpos no aglutinantes del suero problema, fijados a la suspensión

antigénica de *B. abortus*. El título obtenido es, por ello, como mínimo el de la aglutinación y generalmente es mucho más elevado, tanto más cuanto mayor es el tiempo de evolución de la enfermedad. Pueden persistir en ocasiones de forma prolongada y con titulación elevada, incluso en pacientes con tratamiento adecuado y buena evolución clínica. Hay que citar como posibles falsos positivos las reacciones cruzadas con *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis* y *Yersinia enterocolitica* (Montes, 2000).

2.4.2.1.6. Fijación de complemento

Aparece como la menos afectada por los anticuerpos residuales postvacunales, puede considerarse como la prueba más específica, y sigue siendo la prueba de referencia de brucelosis a nivel internacional. Ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad ya que detecta IgG1 a niveles muy bajos. (Bowden, et al., 2007). Se incuban diluciones crecientes del suero a investigar sobre una impronta de *Brucella*. Se agrega luego el anticuerpo anti-especie marcado con una sustancia fluorescente y se observa en un microscopio de fluorescencia, determinándose el título (Lucero et al, 2008).

2.4.2.1.7. Prueba de anillo en leche, PAL o ring test

Se emplea para la vigilancia de los rebaños sanos y rebaños infectados. Solo produce resultados satisfactorios con leche bovina. Cuando se realiza con leche proveniente de tanque de recolección, permite detectar un gran número de animales positivos, con una precocidad superior a las pruebas realizadas en suero. La limitación que presenta es la restricción a hembra en lactación, pero también se la puede utilizar individualmente con el fin de identificar las vacas positivas (Bowden, et al., 2007).

La prueba se diseñó para detectar la presencia de anticuerpos en leche. Estos anticuerpos reaccionan con el antígeno coloreado con hematoxilina formando un complejo antígeno-anticuerpo que se adhiere a la superficie de los glóbulos de grasa presente en la leche, y asciende con ellos a la superficie, formando una capa o anillo de crema de color púrpura azulado. La intensidad de la coloración puede variar dependiendo del grado de reacción. Si la muestra no contiene anticuerpos específicos, el antígeno no se fijará a los glóbulos

grasos y permanecerá uniformemente distribuido, coloreando la columna de leche, mientras que la capa de crema forma un anillo de color blanco natural (Amaya et al., 2009).

2.4.2.1.8. ELISA (indirecto y competitivo)

Se usa eficazmente en los programa de erradicación, después de finalizar las vacunaciones, como prueba de detección o como prueba suplementaria a la fijación de complemento. Esta ampliamente aceptada como prueba para el diagnóstico serológico de brucelosis bovina, debido a su capacidad para detectar anticuerpos de todos los isotipos, a diferencia del resto de las pruebas. La sensibilidad y especificidad de ELISA indirecto es excelente, pero no puede distinguir la respuesta inmunitaria inducida por la vacunación con *Brucella abortus* cepa19, y la infección natural con la bacteria. La prueba de ELISA competitiva puede diferencia entre respuestas inducidas (Radostis, et al, 2002).

Es una técnica altamente sensible, específica y versátil, emplea muy pequeña cantidad de suero y da muy buenos resultados aun en presencia de hemólisis.

2.4.2.1.8.1. ELISA indirecto (ELISA-I)

El antígeno se fija a placas de poliestireno, luego se incuba con el suero a investigar, posteriormente con un anti-especie conjugado con una enzima, se agrega el sustrato correspondiente y se mide el color desarrollado a la longitud de onda determinada. Pueden usarse conjugados que reconozcan las distintas clases de inmunoglobulinas. Los antígenos pueden ser particulados o solubles, LPS u otras proteínas bacterianas. Se ha obtenido un antígeno libre de LPS (antígeno CP), que es altamente eficaz en detectar la respuesta a IgG durante una infección activa evitando al mismo tiempo las reacciones cruzadas debidas al LPS. Detecta anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes. La interpretación de esta prueba debe ser aún convalidada.

2.4.2.1.8.2. ELISA competitivo (ELISA-C)

Se emplea un anticuerpo monoclonal que reconoce el epitope O del LPS-S, que compite con los anticuerpos del suero por la unión al antígeno fijado en la placa. El revelado se efectúa con un anticuerpo anti-ratón conjugado con una enzima. Detecta anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes. Se consideran positivos aquellos sueros con un porcentaje de inhibición mayor del 28% (Lucero et al, 2008).

2.4.2.1.9. Polarización de fluorescencia (FPA)

Se trata de un inmunoensayo homogéneo en el cual los anticuerpos al unirse con el antígeno, cambian la velocidad de rotación de la molécula. Al incidir en ella un haz de luz fluorescente polarizada, el ángulo de difracción cambia en función del anticuerpo unido. Este cambio es medido por un detector que lo traduce en una señal. La especificidad y la sensibilidad de la prueba son en algunos casos superiores a los de ELISA. (Bowden, et al., 2007). Esta técnica puede realizarse en sangre entera y leche. El antígeno empleado para esta prueba es PSO de *B. abortus* conjugado con isotiocianato de fluoresceína. La interpretación de esta prueba es similar al ELISA-I. (Lucero et al, 2008).

2.4.2.1.10. Prueba de inmunodifusión en agar (IDAG)

Se enfrenta el suero problema con un extracto salino obtenido a partir de la especie. Debido a la baja sensibilidad de la prueba se ha desarrollado un ELISA que detecta anticuerpos anti-LPS-R (Bowden, et al., 2007) Es una técnica de doble difusión en geles. Se efectúa la reacción de doble difusión del suero a investigar frente a un suero control observando las reacciones de identidad. Los anticuerpos detectados son IgG e IgM. (Lucero et al, 2008).

2.4.2.2. Métodos directos

Están basados en la identificación de *Brucella* spp. o de sus componentes en los tejidos de los animales.

2.4.2.2.1. Cultivo in vitro

Se basa en el aislamiento e identificación del agente causal. Si bien es considerado el diagnóstico de certeza, en el caso de brucelosis no es tan práctico y sencillo de realizar, por lo que no se presta para su empleo en gran escala, como lo requiere un programa de control. Es de utilidad cuando se necesita completar una investigación epidemiológica, en el examen de reproductores machos utilizados en inseminación artificial o para detectar animales con infección crónica o latente, que no pueden ser identificados por pruebas serológicas (Montes, 2000).

El cultivo de *Brucella* puede tener diferentes objetivos: aislamiento e identificación, mantenimiento de cepas de laboratorio (con fines de investigación), o bien preparación en masa de células para vacunas o para antígenos de diagnóstico. Excepto en el tercer caso, se utilizan principalmente medios sólidos; estos favorecen la identificación, tienden a evitar la disociación o cambio de fase, y limita el crecimiento de otros microorganismos indeseables de rápido desarrollo. (Bowden, et al, 2007).

En todos los casos es recomendado el cultivo. Las mejores muestras provienen de médula ósea, sangre en forma seriada, orina y punción de ganglios linfáticos, aunque el mejor de todos es el mielocultivo, ya que se puede encontrar el bacilo, aún en las etapas asintomáticas. Los medios de cultivo más adecuados para el crecimiento de las brucelas son: el medio Ruiz-Castañeda, agar suero dextrosa, agar suero infusión de papa, agar tripticasa, agar *Brucella* suero o agar suero de carnero al 5%. Se incuba el medio de cultivo a 37°C, con un ambiente de 5 al 10% de CO₂, y se revisa dos veces por semana, haciendo subcultivos en medios frescos, sin reportar negativos antes de cuatro semanas. Las colonias en primoaislamiento desarrollan colonias lisas. La identificación se hace con reacciones bioquímicas, donde la prueba de oxidasa es positiva y no hay fermentación de la lactosa ni la glucosa. Se confirma en sueros específicos, con suero antibrucela (Romero-Cabello, 2007).

Los cultivos microbiológicos de la bacteria se realizan a partir de órganos y ganglios linfáticos del feto, de la placenta, de la leche, moco vaginal o exudado uterino. Las pruebas microbiológicas presentan la ventaja de

identificar directamente la bacteria, y limitar así la posibilidad de resultados positivos falsos (Radostits, et al., 2002).

Se incuban sangre o tejidos en caldo triptosa-soya y sobre agar tionina-triptosa. Con intervalo de varios días se siembran subcultivos sobre medio sólido de composición similar. Todos los cultivos se incuban en 10% de CO₂ y deben observarse al menos tres semanas antes de desechar el subcultivo como negativo (Jawetz, et al, 2002).

El procesado de muestras contaminadas (hisopados vaginales, esperma, tejidos placentarios, macerados, etc.) requiere el uso de medios selectivos para inhibir el desarrollo de aquellos contaminantes de crecimiento rápido que podrían dificultar el aislamiento de *Brucella*. Los medios selectivos se logran incorporando antibióticos a los medios base citados arriba. Existen varias fórmulas, como las de Kuzdas y Morse, de Farrell, y de Thayer-Marin. El medio de Farrell incluye cicloheximida, bacitracina, polimixina B, vancomicina, ácido nalidixico y nistatina. Este medio resulta, sin embargo, inhibidor para *B. ovis*, por lo que para el aislamiento de esta especie se prefiere el medio de Thayer-Martin. Recientemente se ha recomendado la utilización del medio de Skirrow (en su origen, destinado al aislamiento de *Campylobacter*) para el aislamiento de *Brucella* (Bowden, et al, 2007).

En brucelosis humana, el hemocultivo para búsqueda de *Brucella* se realiza en los llamados "frascos de Castañeda". En ellos, la muestra de sangre es vertida directamente en la fase líquida. Los frascos son "acostados", con lo que se inunda la superficie del medio sólido, y de inmediato son vueltos a la posición vertical e incubados. Periódicamente, cada 5 días, se observa la superficie de la fase sólida en búsqueda de colonias. Si no las hay, se vuelve a bañar la superficie del medio sólido y se vuelven a incubar parados. El ciclo se repite hasta la obtención de colonias o su descarte (Bowden, et al, 2007).

La mayoría de las cepas de *Brucella* crecen bien en medios base disponibles comercialmente, como los de tripticasa-soya, triptona-soya, Bacto-triptosa. También pueden emplearse los medios base para agar sangre. En el caso de *B. ovis* y la biodiversidad 2 de *B. abortus*, debe agregarse un 2-5% de

suero (equino o bovino). El agar-papa ha sido muy utilizado en el cultivo de la cepa *B. abortus* S19, para la producción de vacuna en pequeña escala (Bowden, et al, 2007).

Si se aíslan microorganismos parecidos a brucelas deben tipificarse para producción de H₂S, inhibición de colorantes y aglutinación por absorción de suero. Como regla, las brucelas solo pueden cultivarse de pacientes durante la fase aguda de la enfermedad o la recidiva de la actividad. (Jawetz, et al, 2002)

Las brucelas son cocobacilos no hemolíticos pequeños, oxidasa-positivos y gram negativos; no fermenta la lactosa o la glucosa y son aerobios obligados. En general son ureasa-positivos. Las bacterias que satisfacen estos criterios deben someterse a prueba de aglutinación con suero antibrucela liso con controles apropiados, para identificación presunta. En caso de investigar biodiversidad, las pruebas deben realizarse en algún laboratorio de referencia. Los cultivos negativos a brucelas no excluyen la enfermedad. (Jawetz, et al, 2002)

2.4.2.2.2. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Basado en la amplificación del material genético. Este método ha adquirido un gran desarrollo en los últimos años, habiéndose llegado a una sensibilidad en la detección equivalente a unas 100 Brucellas (Montes, 2000).

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de los ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente (Amaya et al., 2009)

2.4.2.2.3. AMOS PCR

La prueba abreviada de AMOS PCR está basada en la inserción del elemento genético IS711 en un único locus cromosomal en *B. abortus* biovariedad 1, 2, y 4 y la doble inserción de IS711 en un locus específico en el cromosoma de *B. abortus* RB51. Un cebador de PCR está

anclado dentro de la secuencia IS711, mientras que los cebadores de diferenciación se localizan en los ADN cromosómicos únicos adyacentes a la inserción. Los cebadores se seleccionaron para amplificar hasta tres productos de diferentes tamaños. Los cebadores amplifican un producto de 498pb presente en *B. abortus* biovariedad 1, 2, y 4 y dos cepas de vacuna, y también amplifican un producto de 364pb de RB51 de *B. abortus*. La identificación de S19 se basa en un par de cebadores de PCR que amplifica una secuencia corta (178pb) del gen (esencial para el catabolismo de eritritol), presente en todas las cepas de *Brucella* excepto S19 de *B. abortus*. Así, ERI, la identificación de S19 se basa en la ausencia de amplificación de este objetivo (Ewalt y Bricker, 2000).

2.4.3. Control y prevención

Según Bowden (2007) “la lucha contra la brucelosis está basada en dos pilares: la detección de los animales infectados y la vacunación”, se pueden describir 3 estrategias principales que, sin embargo no son mutuamente excluyentes: profilaxis sanitaria, médica o mixta (Bowden et al., 2007). En cualquier caso, la detección de los animales infectados es primordial. Aun cuando la eliminación de los animales no se realice sistemáticamente, los cronogramas de vacunación pueden permitir limitar la difusión de la infección de manera económica, asegurando la disminución de la prevalencia (Sierra López, 2010).

Las bacterias de este género son termolábiles, por lo cual la pasteurización constituye un método eficaz para sanear alimentos. Por ser sensibles a la acidificación, la carne se descontamina espontáneamente durante su maduración. Para tratamiento de estercoleras se ha recomendado el xilol (1/1000) y la cianamida cálcica (20kg/m³) durante 2 semanas. Para tratar superficies se las puede bañar durante 1 hora con sosa cáustica (2-3%, formaldehído (2%) o hipoclorito de calcio (2.5%). Además de fenol y amonios cuaternarios. ” (Bowden et al., 2007).

La erradicación de la brucelosis en el ganado bovino puede intentarse mediante el sacrificio de todo animal en el que se demuestre la infección, inmunización activa de los novillos con cepa 19 viva avirulenta, o combinando la prueba para comprobar la infección, la segregación e inmunización. El ganado se examina por pruebas de aglutinación (Brooks, et al., 2002).

El ganado bovino se puede inmunizar con dos productos con la vacuna cepa 19 de *Brucella abortus*, o con la vacuna cepa 45/20 de *Brucella abortus*, en la Tabla 2 se indican las características de cada uno de estos productos. Durante la edad adulta, las vacas inmunizadas son menos sensibles a las cepas de campo virulentas. La inmunidad que inducen protege frente al aborto, pero no frente a la infección (Biberstein y Chung Zee, 1994). Las cabras y ovejas con la cepa Rev. 1 de *Brucella metilenses* (Romero-Cabello, 2007). La inmunización activa de los humanos contra la infección por brucela se encuentra en etapa experimental (Brooks, et al., 2002).

Tabla 3. Comparación entre las cepas 19 y 45/20 de *B. abortus* como agentes inmunizantes

<i>B. abortus</i> , cepa 19	<i>B. abortus</i> , cepa 45/20
<ul style="list-style-type: none"> • Cepa lisa atenuada • Sin adyuvante • Viable • Una única dosis reducida a terneros de 3-7 meses de edad o incluso de 12 meses de edad • Protección contra el aborto de un 70% aproximadamente • Origina respuesta de anticuerpos • A veces eliminada en la leche • Infecciosa para el hombre 	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa rugosa • Adyuvante • Inviable • Dos dosis separadas por un intervalo de 6 meses, los animales deben tener más de 6 meses de edad • Dosis de refuerzo cada 12-18 meses, según los antecedentes del rebaño • Protección contra el aborto de un 70% aproximadamente • Sin respuesta de anticuerpos • No es eliminada en la leche • No infecciosa

Tomado de: Biberstein y Chung Zee, 1994

2.5. TRATAMIENTO

2.5.1. Humanos

El tratamiento es ineficaz debido al secuestro intracelular de las bacterias en los ganglios linfáticos, la glándula mamaria, y los órganos reproductores. Las especies de *Brucella* son intracelulares facultativas, que pueden vivir y multiplicarse en el interior de las células del sistema macrofágico. Los fallos en el tratamiento no se debe a el desarrollo de una resistencia a antibióticos, sino más bien a la incapacidad del medicamento de penetrar a la barrera de la membrana celular (Radostis, et al., 2002).

En el humano son utilizados varios antibióticos, solos o en forma combinada, esencialmente con el tiempo y el grado de evolución de la enfermedad. El tratamiento busca reducir la morbilidad, acortar la duración del proceso y reducir la incidencia a complicaciones. (Bowden, et al., 2007). Las tetraciclinas son los antibióticos de primera elección, y pueden utilizarse solas, por cuatro a seis semanas, o combinadas con estreptomycin y sulfadiazina. Actualmente se ha observado que el trimetoprim-sulfametoxazol también es efectivo. El cloranfenicol es de gran utilidad, tal vez de mayor efecto sobre las brucelas que las tetraciclinas, pero su uso se ha limitado por su actividad sobre la medula roja de los huesos, que produce anemias aplásicas. Después de la tetraciclina, se debe usar estreptomycin por dos semanas. También se puede usar la combinación de antimicrobianos como: estreptomycin con doxiciclinas o rifampicina con doxiciclinas. De igual manera se recomienda el tratamiento sintomático (Romero-Cabello, 2007).

En el año 2010, se describió un protocolo de tratamiento en un caso clínico de brucelosis humana, en el cual se le administro el tratamiento antimicrobiano con el esquema descrito por la OMS: Doxiciclina (100mg BID) por 6 semanas, y gentamicina (320mg intravenoso diario) por 10 días. Pese a esta combinación de antibióticos, poco después de la finalización del tratamiento el paciente volvió a presentar molestias, y en los exámenes serológicos se observaba una elevación de IgG e IgM, por lo que se instauró el mismo protocolo medicamentoso para tratar una posible recaída (Ron-Román et al., 2012).

2.5.2. Animales

Debido a las características del control de brucelosis en los rumiantes, al costo y a la dificultad para diagnosticarla con certeza y evaluar la eficacia (aislamiento del germen) el tratamiento antibiótico no se realiza en dichas especies, por lo que se recomienda el sacrificio de los animales afectados (Bowden, et al., 2007).

En caninos se recomienda el tratamiento con antibióticos, se debe retirar a los animales de los programas de crianza y es recomendable la esterilización. El microorganismo no se ha logrado eliminar de próstata a pesar de los distintos tratamientos existentes, y en muchas ocasiones se presentan reinfección (Nelson y Couto, 2010).

El protocolo de antibióticoterapia sugerido es:

- Tetraciclina 30mg/kg, vía oral (VO) dos veces al día (BID) por 28 días; y estreptomina intravenosa (IV), 20mg/kg 1 vez al día (SID) durante 14 días consecutivos al principio del tratamiento.
- Tetraciclina 30mg/kg, VO, TID (3 veces al día) por 30 días; y estreptomina intramuscular (IM), 20mg/kg en los días 1-7 y 24-30 del tratamiento
- Minociclina 55mg/kg BID combinada con estreptomina IM durante 7 días.
- Oxitetraciclina de depósito 20mg/kg IM, 1 vez por semana durante 4 semanas, acompañada con estreptomina SID durante los primeros 7 días, tratamientos de 4 semanas con enrofloxacin (Gómez y Guida, 2010).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. METODOLOGÍA.

3.1.1. Área de estudio

Esta investigación se realizó en poblaciones caninas de las comunidades indígenas Ancholag Alto, San Luis de Chaguarpungo y Santa Anita de Ancholag, ubicadas en el sector de la hacienda Ancholag, en la parroquia rural Juan Montalvo de Cayambe, ubicado a 80Km de la ciudad de Quito, en la provincia Pichincha en la serranía ecuatoriana. Cayambe posee una población de 75000 habitantes. Juan Montalvo es una de las tres parroquias de la ciudad de Cayambe, con aproximadamente 6.000 habitantes. Se encuentra al sur de la ciudad y además comprende los alrededores del sur de la ciudad, desde el volcán Cayambe hasta el río Guachalá. La parroquia es uno de los principales centros de ganadería y de plantaciones de flores para exportación (especialmente rosas) de Ecuador. La provincia de Pichincha es la que mayor producción lechera tiene en el país con un 20.44% (INEC, 2013). Las comunidades que fueron estudiadas son Ancholag alto, San Luis de Chaguarpungo y Santa Anita de Ancholag, cuya ubicación geográfica es de 0.0° 16'94.1" latitud, -78.1°11'29,2" longitud, y una altitud de 2860 metros sobre nivel del mar; ubicadas en el sector de la hacienda Ancholag. La temperatura ambiental promedio del sector es de 12°C (Vascones, 2008). Las comunidades fueron seleccionadas en base a la actividad ganadera existente y el contacto de los caninos con el ganado, además de la colaboración prestada por los habitantes de la zona para la realización del estudio.



Figura 3. Localización geografía satelital del estudio
Tomado de: (googlemaps, 2014)

3.1.2. Población y Muestra

La muestra de estudio estuvo conformada por 118 perros (*Canis lupus familiaris*) de varias razas y con edades entre los 6 meses y 16 años, que tienen contacto con ganado o subproductos del mismo, en 3 comunidades de la parroquia Juan Montalvo en el cantón Cayambe, Pichincha, Ecuador. La selección de los animales muestreados incluyó la totalidad de la población canina de la zona, discriminando a los animales menores a 6 meses de edad debido a que los propietarios previenen el consumo de subproductos de ganado y a la falta de evidencia de contacto entre los mismos. De acuerdo a la encuesta realizada a cada propietario, previa a la toma de muestra, los animales comprendidos en el estudio deambulan libremente por las 3 comunidades, pueden trasladarse a las distintas áreas (ordeño, pastoreo, otras comunidades, otros hogares) sin restricción. Existe contacto directo entre los caninos y el ganado. Los propietarios no llevan a sus mascotas a consultas veterinarias, los animales de compañía no son vacunados y ni esterilizados. Como regla general los animales duermen a la intemperie o en refugios rudimentarios creados por los propietarios.

3.1.3. Encuesta y toma de muestras

Antes de proceder a la toma de muestras de sangre de los caninos, se realizó una exposición informativa con la asistencia del 72.34% (n=34/47 familias) de la población. En este taller se informó sobre la importancia metodología del estudio a realizar: riesgos, transmisión, procedimiento para la toma de muestras y tipo de pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de brucelosis. Explicando claramente que los métodos serológicos utilizados en este estudio, Rosa de Bengala (RB) y Suero aglutinación en tubo (SAT), demuestran la presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp.; lo cual sugiere que el animal puede estar infectado con *Brucella* spp. a pesar de que los animales no presenten sintomatología. Se elaboró una base de datos para iniciar la toma de muestras con citas previamente establecidas. En el momento de la toma de muestras se dialogó con los propietarios de los animales para informales nuevamente sobre el propósito de la investigación y la enfermedad de forma general (ANEXO 6).

Para tomar la muestra de sangre de cada individuo se colocó un bozal en el hocico del perro (ANEXO 1) para evitar mordeduras, seguidamente se colocó un torniquete a nivel del codo, se desinfectó con alcohol el área de donde se tomaría la muestra, y se extrajeron aproximadamente 10ml de sangre, mediante punción de la vena cefálica. La recolección de las muestras se la realizó en tubos Vacutainer de tapa roja (sin anticoagulante). Una vez obtenida la muestra se asignó un código único al animal y se almacenó el tubo para ulterior centrifugación a 3500rpm durante 10 minutos con el fin de extraer el suero sanguíneo, el cual fue almacenado a -20°C en el Centro Internacional de Zoonosis (CIZ) para su posterior análisis. Fue necesario obtener como mínimo 60 µl de suero sanguíneo para realizar las diferentes pruebas inmunodiagnósticas.

Una vez obtenida la muestra del animal, se procedió a realizar una encuesta sobre datos generales del animal como nombre, edad, raza, hábitos alimenticios, e historial reproductivo de cada individuo.

Entre noviembre del 2013 y enero del 2014; un total de 118 muestras sanguíneas fueron recolectadas de los caninos de las comunidades Santa

Anita de Ancholag (n=39), San Luis de Chaguarpungo (n=47) y Ancholag alto (n=32).

3.1.4. Materiales de campo

- Tubos VACUTAINER® sin anticoagulante (tapa roja) de 10 ml.
- Agujas VACUETTE® 21g x 1”.
- Porta agujas VACUETTE® (capuchón).
- Jeringas de 10 ml.
- Guantes de látex para manejo.
- Mascarillas desechables.
- Caja térmica para transporte de muestras.
- Bolsas de basura color rojo.
- Contenedor de material corto-punzante de desecho.
- Overol.
- Botas de caucho.
- Gorra.
- Encuestas (ANEXO 6)

3.1.5. Técnicas e instrumentos analíticos

Una vez obtenidos los sueros de todos los animales, los cuales fueron almacenados a -20°C , se procedió a realizar las dos pruebas serológicas: Prueba de Sero-Aglutinación Lenta en Tubo (SAT), y Prueba de Rosa de Bengala (RB). Los protocolos de las 2 pruebas SAT y RB serán detallados a continuación.

3.1.5.1. Prueba “Rosa de Bengala”

3.1.5.1.1. Reactivos

- Bengatest® (Synbiotics Código # ABGT); suspensión concentrada de *Brucella abortus* cepa 19 de Weybridge, inactivada por calor y fenol al 5%, dispersa en tampón ácido y coloreada con Rosa de Bengala.
- Sueros controles.

3.1.5.1.2. Materiales

- Placas alveoladas de vidrio (VWR, hech 2418).
- Pipeta automática Eppendorf®, calibrada a 30 µl.
- Cuentagotas, calibrado a 30 µl.
- Cronómetro (Hanhart).
- Lupa (10x).
- Vortex (Heidolph, REAX top).
- Agitador automático (VRN-200).
- Peines de madera desechables.

3.1.5.1.3. Procedimiento

Los sueros controles negativo y positivo, así como los sueros a investigar y el antígeno (Bengatest®), fueron mantenidos a temperatura ambiente entre 50 y 60 minutos antes de efectuar la prueba.

- Se identificaron los sueros a investigar y se siguió el protocolo de la hoja de trabajo (ANEXO 3).
- Con una pipeta Eppendorf®, se depositaron sobre la placa 30 µl de suero a investigar previamente homogenizado.
- Se colocaron 30 µl de suero control positivo, suero control negativo, en cada sitio siguiendo la hoja de trabajo diario.
- Una gota (30 µl) de antígeno, fue depositado junto a cada gota de suero.
- Se mezclaron el antígeno y el suero, utilizando para cada muestra, el extremo de un peine plástico, y durante 4 minutos se lo dejó sobre el agitador automático con un movimiento rotatorio en sentido horario.
- Transcurridos los 4 minutos, se procedió a realizar la lectura, la observación de la aglutinación, se efectuó con la ayuda un lente de aumento.

3.1.5.1.4. Interpretación de resultados

Los diferentes grados de aglutinación fueron determinados según los siguientes criterios: el criterio de negatividad (ausencia de anticuerpos), o de positividad (presencia de anticuerpos), estuvo determinado por la ausencia o

presencia de diferentes grados de aglutinación como se muestra en el siguiente cuadro.

Tabla 4. Interpretación para el grado de aglutinación en la prueba Rosa de Bengala

INTERPRETACIÓN	GRADO DE AGLUTINACIÓN
(-)	Sin aglutinación, ni formación de un borde color rosa.
(+)	Presencia de aglutinación fina, y formación de un borde rosado.
(++)	Aglutinación fina y formación de un borde marcado
(+++)	Aglutinación gruesa, y formación de un borde definido.
(++++)	Aglutinación gruesa, formación de un borde definido y aclaración de la muestra.

Tomado de: Ron Román (2003).

3.1.5.2. Prueba de Sero-Aglutinación Lenta en Tubo (SAT)

3.1.5.2.1. Reactivos

Antígeno para sero-aglutinación en tubo, suspensión concentrada de *Brucella abortus* (cepa 119/3), inactivada por calor y fenol al 5% y dispersa en tampón fenolado al 0.5%.

3.1.5.2.2. Soluciones

Solución salina fenolada (Tampón SAT-EDTA) (T-SAT).

- Cloruro de sodio 0.85% (w/v) (8.5g/litro)
- Fenol 0.5% (w/v) (0.5g/litro)
- EDTA 5 mM (1.8612g/litro)
- Agua destilada ajusta a 1 litro

El pH de esta solución fue ajustado a 7.2 ± 0.1 , con una solución de NaOH 1M.

Solución de antígeno (T-Ag).

- Antígeno
- 62.9 ml
- Tampón
- SAT-EDTA 487.1 ml

En esta solución el antígeno alcanzó una dilución de 1/8.75 y fue conservada entre 4°C y 8°C; posee una estabilidad de máximo 90 días.

3.1.5.2.3. Materiales

- Placas de microtitulación, con fondo cónico "U".
- Pipeta multicanal Transferpette® 20-200 µl.
- Pipeta Eppendorf®, calibrada a 32 µl.
- Sistema de espejo de aumento para la lectura de placas.

3.1.5.2.4. Procedimiento

Un sistema de diluciones de los sueros a investigar así como de los sueros controles fueron efectuados sobre la microplaca de titulación, de la siguiente manera:

- En las primeras cúpulas se colocó 168 µl de tampón SAT-EDTA, y en las otras dos cúpulas se colocó 100 µl del tampón (prueba de rutina).
- A las primeras cúpulas se añadió 32µl del suero a investigar y se homogenizó todo el contenido, obteniendo una dilución de 1/12.5.
- Una vez homogenizado, se tomó 100 µl del contenido de las primeras cúpulas y se colocó en las cúpulas siguientes, se homogenizó y se obtuvo una dilución 1/25 (ANEXO 5).
- De igual manera se toma 100 µl del contenido de las cúpulas número dos y se colocó en las cúpulas número tres, se homogenizó y se obtuvo una dilución final de 1/50.
- Para realizar la prueba complementaria de titulación de SAT-EDTA, las diluciones continuaron hasta las cúpulas número 12 obteniendo de este modo una dilución final de 1/25.600.
- Posteriormente se colocó 100 µl de la solución de antígeno en cada cúpula, y se dejaron reposar antes de incubarlas.
- Las placas se incubaron durante 20 horas a 37° C en ambiente húmedo.
- Para evitar confusiones el protocolo de las diluciones se sigue de acuerdo a la hoja de trabajo para esta prueba.

3.1.5.2.5. Lectura de placas e interpretación de resultados

La lectura de las placas se realizó con la ayuda de un dispositivo de fondo oscuro provisto por el espejo de aumento iluminado con luz artificial directa.

- Resultados negativos: cuando el antígeno forma en el centro de la cúpula, un punto compacto, con un borde neto.
- Resultado positivo: cuando se forma una fina capa de sedimento, repartido uniformemente sobre todo el fondo de la cúpula, o cuando existe la formación de una gran zona de sedimentación, rodeada por un espacio de líquido completamente transparente.

Los diferentes porcentajes de aglutinación fueron determinados en comparación con diluciones controles del antígeno, con porcentajes de aglutinación de entre 0, 25, 50 y 75%. Los resultados fueron expresados en Unidades Internacionales de aglutinación (UI), en base a la siguiente Tabla.

Tabla 5. Relación entre el grado de translucidez y unidades internacionales de Aglutinación (UI) para la prueba SAT-EDTA

DILUCIÓN DEL SUERO	PORCENTAJE DE TRANSLUCIDEZ DE LA MUESTRA		
	25%	50%	75%
1/12.5	15 UI	20 UI	25 UI
1/25	30 U	40 UI	50 UI
1/50	60 UI	80 UI	100 UI
1/100	120 UI	160 UI	200 UI
1/200	240 UI	320 UI	400 UI
1/400	480 UI	640 UI	800 UI
1/800	960 UI	1280 UI	1600 UI
1/1600	1920 UI	2560 UI	3200 UI
1/3200	3840 UI	5120 UI	6400 UI
1/6400	7680 UI	10240 UI	12800 UI
1/12800	15360 UI	20480 UI	25600 UI
1/25600	30720 UI	40960 UI	51200 UI

UI: Unidades Internacionales de aglutinación

Fuente. Ron Román (2003).

3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de asociaciones entre variables categóricas se realizaron las pruebas de Chi Cuadrado (X^2), para determinar la fuerza de asociación de esta prueba se aplicará el Odds Ratio en los factores que influyan en el contagio de la enfermedad, y se realizará Análisis Gráfico de Correspondencias. Para determinar la prevalencia de la brucelosis se dio un intervalo de confianza mediante un valor Z para proporciones (Galindo, 2006). Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico Microsoft Excel®, versión 2010 para Windows.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

El universo poblacional de este estudio está compuesto por 118 caninos que habitan en 3 comunidades indígenas (Santa Anita de Ancholag, Ancholag Alto y San Luis de Chaguarpungo), de la parroquia Juan Montalvo, ubicado en el cantón Cayambe, provincia de Pichincha.

Con el objetivo de identificar los factores de riesgos se aplicó una encuesta (ANEXO 6) en cada una de las propiedad y se consideró la totalidad del universo (n=118) de la población canina mayor a seis meses de edad de las tres comunidades. Los resultados de cada comunidad fueron analizados de forma individual, además de la totalidad de la población estudiada. La población canina estuvo distribuida en un 33.05% (n=39) en Santa Anita de Ancholag, el 27.11% (n=32) en Ancholag Alto y el 55.46% (n= 47) en San Luis de Chaguarpungo. La distribución por genero fue 38,98% (n=46) hembras y 61,02% (n=72) machos, en el Gráfico 4, se detallan los resultados por comunidad.

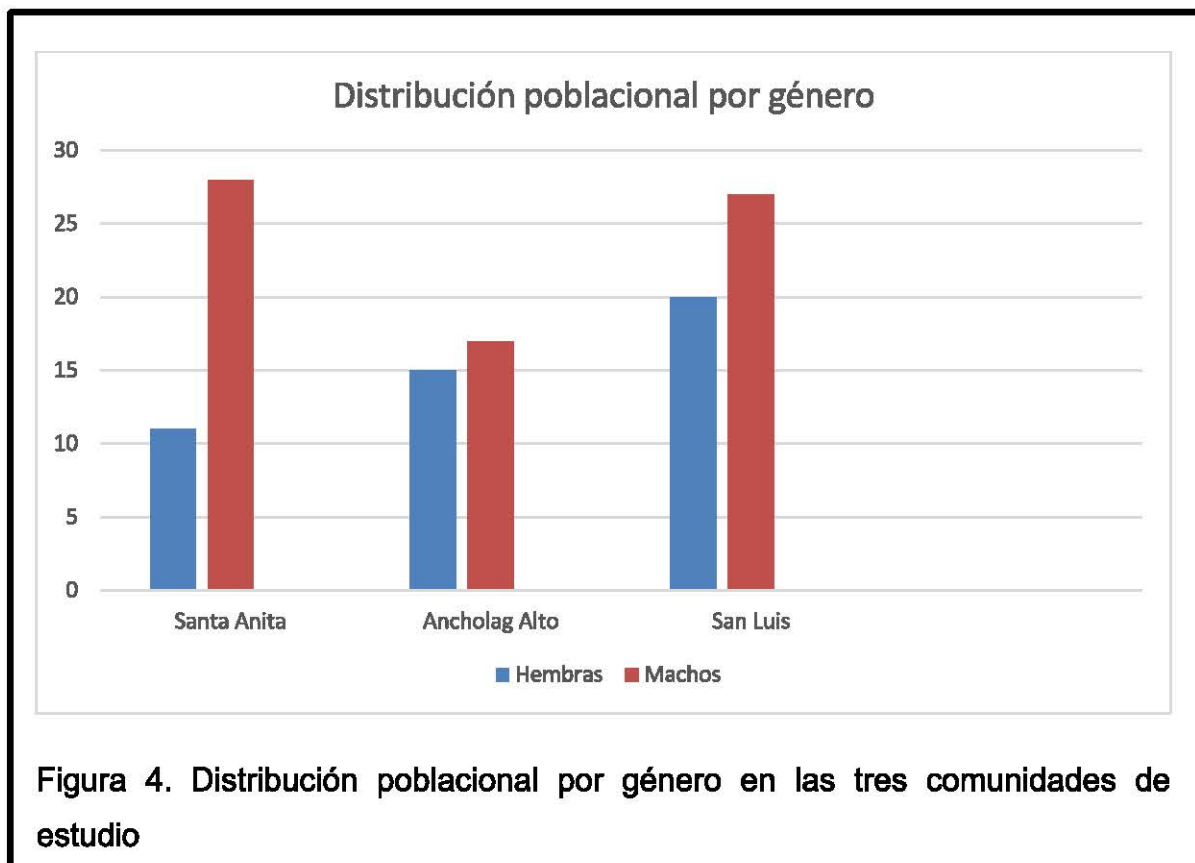


Figura 4. Distribución poblacional por género en las tres comunidades de estudio

La edad promedio de la población en estudio fue de 3.13 años (edad mínima 6 meses y máxima 16 años) y una desviación estándar (SD) ± 2.65 , y una varianza de ± 7.02 . Se ha podido evidenciar que la edad es un factor que estaría directamente relacionado con la positividad a las pruebas de diagnóstico serológico RB y SAT. Se pudo determinar que el grupo de animales con edades comprendidas entre 5 y 10 años, es el grupo que presenta más casos positivos (5 de 6) a las 2 pruebas. Con estos resultados se puede considerar que los animales de mayor edad corren un riesgo mayor de presentar la enfermedad.

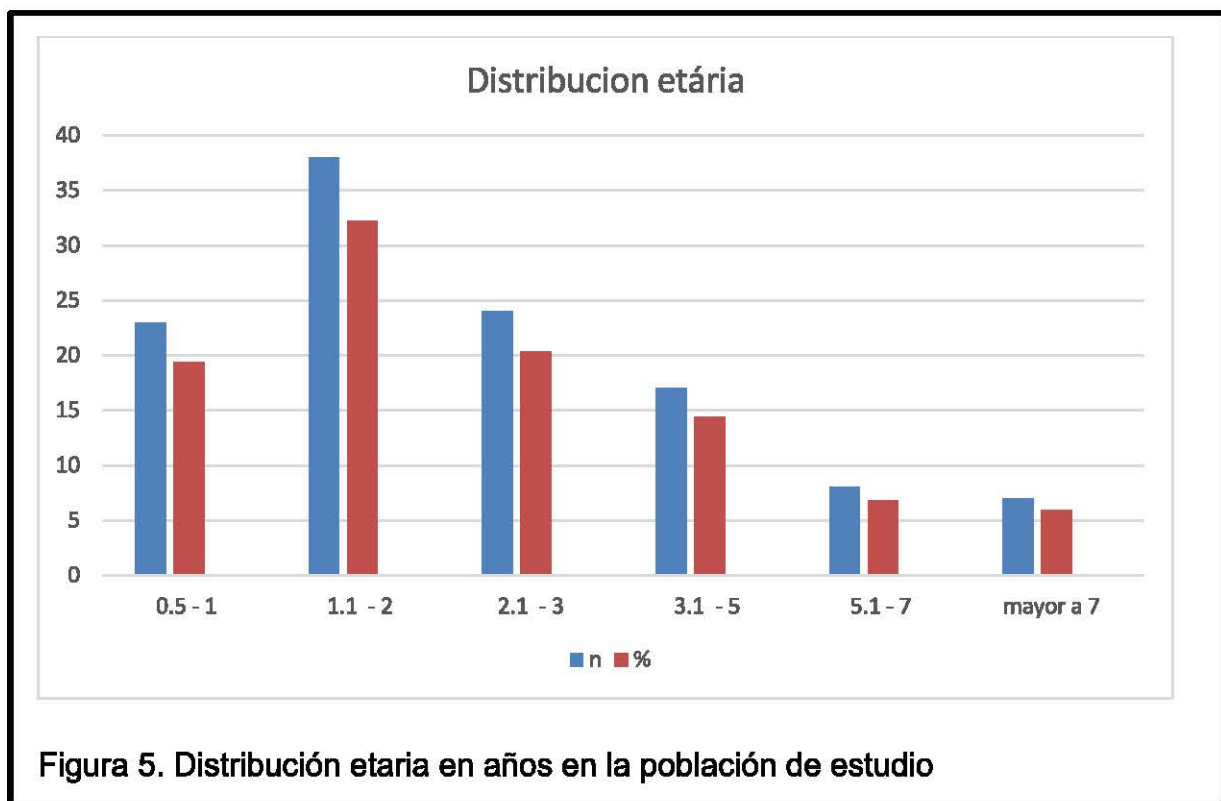


Figura 5. Distribución etaria en años en la población de estudio

Se observa que la distribución etaria presenta una mayor densidad poblacional de individuos de entre 1 y 2 años de edad, esto posiblemente se debe a las condiciones ambientales en las que viven los animales, las mismas que fueron descritas anteriormente al analizar las encuestas realizadas a los propietarios de los animales muestreados.

Las condiciones de vida de los animales descritas anteriormente (contacto con otros animales, alimentación, traslado a otras comunidades, atención veterinaria, refugio), posiblemente influyen en el periodo de vida y estado de salud de los animales, siendo los más vulnerables los cachorros y animales mayores, lo cual justificaría que la mayor densidad poblacional sea de animales de entre 1 y 3 años.

Por otro lado, se encontraron 17.79% (n=21) de caninos puros (puros o sin mezcla: se refiere a un animal que proviene del cruce de ejemplares de la misma raza, presentando características fenotípicas definidas) (Nicholas, 1987), y un 82.21% (n=97) entre animales mestizos y criollos (mestizo o

cruzados: se refiere a un animal que proviene del cruce de dos razas distintas y presenta características fenotípicas correspondientes a cada raza; criollo: se refiere a un animal que proviene de cruces de animales mestizos perdiendo toda característica fenotípica racial) (Nicholas, 1987).

4.2. RESULTADO DE LABORATORIO DE LOS ANÁLISIS SEROLÓGICOS

4.2.1. Resultados de la prueba Rosa de Bengala (RB)

Los resultados de la prueba RB muestran una mayor incidencia de animales positivos en la comunidad de San Luis de Chaguarpungo, con 2.54% (n=3) animales positivos, todos con 2 cruces (++) de aglutinación a la prueba, y en Santa Anita de Ancholag 1.69% (n=2) positivos con 3 cruces (+++) de aglutinación. La presencia de 2 cruces (++) indica una presencia mediana de anticuerpos aglutinantes en sangre, mientras que la presencia de 3 cruces (+++) indica abundante presencia de anticuerpos aglutinantes, indicando un grado mayor o más avanzado de infección (ver Tabla 6). Anteriormente se ha descrito como realizar la interpretación por grados de aglutinación en la prueba de RB.

Tabla 6. Resultados de la prueba serológica Rosa de Bengala (RB)

LOCALIDAD	RESULTADO					
	Negativo		Positivo		Total	
	n	%	N	%	N	%
Ancholag alto	32	27.11%	0	0.00%	32	27.11%
San Luis	44	37.28%	3	2.54%	47	39.83%
Santa Anita	37	31.35%	2	1.69%	39	33.05%
Total	112	94.91	5	4.24%	118	100%

Tabla 7. Resultados de la prueba serológica Rosa de Bengala (RB) por grado de aglutinación

LOCALIDAD	RESULTADOS				Total
	Positivo (+)	positivo (++)	positivo (+++)	positivo (+++)	
Ancholag alto	0	0	0	0	0
San Luis	0	2	0	0	2
Santa Anita	0	0	3	0	3
Total	0	2	3	0	5

La presencia de 3 casos positivos en San Luis de Chaguarpungo puede estar relacionada con la mayor densidad poblacional canina del área ($n=47$), la disposición de los productos de abortos del ganado y el contacto con otros animales, principalmente con los caninos del Santa Anita de Ancholag, que presentan solamente 2 casos positivos a esta prueba, pero con mayor grado de aglutinación, posiblemente tratándose de casos con mayor presencia de anticuerpos debido a mayor grado de infección o cronicidad de la misma. Se sospecha que los casos positivos de Santa Anita de Ancholag pueden estar relacionados con la disposición de los productos de abortos del ganado y con el contacto con otros animales entre las comunidades y la ciudad de Cayambe. Sin embargo, la ausencia de casos positivos en Ancholag Alto podría deberse a la distancia que esta localidad se encuentra de las otras 2 comunidades, y de la ciudad de Cayambe, y posiblemente a la falta de contacto de los animales de Ancholag Alto con los animales infectados de las otras comunidades, justamente por la distancia que los separa.

En el estudio realizado por Benítez en el año 2008 en el cantón Mejía, en la provincia de Pichincha, se encontró una prevalencia en caninos aparente de anticuerpos contra *Brucella* spp. del 15.89%, realizando la prueba RB. Por otra parte, en el año 1978, en un estudio realizado por Zambrano-Rodríguez, en el cantón Rocafuerte, en la provincia de Manabí, se determinó una prevalencia de 3.05% en caninos, mediante la aplicación de la prueba diagnóstica de Seroaglutinación Rápida (SAR); mientras que, en el año 1997, en un estudio desarrollado por Martínez y Proaño, en la provincia de Pichincha, se determinó una prevalencia del 10.89% en caninos mediante la aplicación de la prueba RB. No se cuenta con estudios actualizados de prevalencia de *Brucella* spp. a nivel nacional en caninos.

En bovinos, una reacción positiva a la prueba de Rosa de Bengala corresponde por lo menos a un título 1/100 a la prueba lenta de tubo y/o rápida de placa para animales vacunado cuando eran terneras. Para esta prueba no existe la clasificación de sospechoso que es frecuente a la prueba de placa y tubo. Un falso positivo se puede presentar cuando existe contaminación de la

muestra (Morena y Andrade, 2006). Los resultados falsos negativos a esta prueba se presentan en animales que han sido recientemente infectados así como en otros casos con enfermedad de curso muy prolongado.

4.2.2. Prueba de Sero-Aglutinación en Tubo (SAT)

Se realizó una prueba de sero aglutinación en tubo de rutina en la cual se detectaron los casos positivos, éstos posteriormente fueron sometidos a una prueba de sero aglutinación en tubo de titulación en la que se midieron los valores de anticuerpos aglutinantes en unidades internaciones (UI).

El 5.93% (n=7) de los casos mostró resultados positivos a SAT, lo cual indica una prevalencia del 5.93% en el sector de la Hacienda Ancholag. En Ancholag alto, la prevalencia es de 0.84% (n=1) en Santa Anita de Ancholag y San Luis de Chaguarpungo es del 2.54% (n=3), respectivamente.

Tabla 8. Resultados de la prueba serológica de rutina de Suero Aglutinación en Tubo (SAT)

LOCALIDAD	RESULTADOS					
	N	Negativo %	n	Positivo %	N	Total %
Ancholag alto	31	26.27%	1	0.84%	32	27.11%
San Luis	44	37.29%	3	2.54%	47	39.83%
Santa Anita	36	30.50%	2	1.69%	39	33.05%
Total	111	94.07%	6	5.08%	118	100%

Los resultados obtenidos en la prueba de SAT están en concordancia con los obtenidos en la prueba de RB; sin embargo, tomando en cuenta que la prueba de SAT tiene mayor sensibilidad que la prueba de RB se logró detectar 2 casos positivos más, uno en Ancholag alto y otro en Santa Anita de Ancholag. En Santa Anita la prevalencia es del 1.69%, mientras que San Luis presentan una prevalencia del 2.54% y en Ancholag alto la prevalencia es del 0.84%. Los resultados obtenidos pueden estar relacionados a la distancia existente entre las tres comunidades, las comunidades de San Luis y Santa Anita se encuentran relativamente cerca entre ellas aproximadamente un

kilómetro. Otro factor de influencia en estos resultados puede ser la falta de utilización de métodos de eliminación de los cadáveres de animales fallecidos (porcinos, ovinos, bovinos y equinos) y los productos de abortos del ganado, tomando en cuenta que Ancholag Alto es la única comunidad que entierra el 100% de los mismos.

En la prueba SAT de titulación se midió la presencia de anticuerpos aglutinantes en UI, lo cual ayuda a determinar la presencia de la enfermedad y descartar casos falsos positivos. Los valores mayores a 60UI indican positividad a la prueba. Se debe determinar la presencia del efecto prozona que es la ausencia de reacción debido a exceso de anticuerpos y puede ocurrir durante la infección primaria tardía o la infección secundaria. En ninguno de los animales muestreados se presentó dicho efecto.

En la prueba de SAT de titulación se obtuvieron 6 casos, dando a entender que uno de los resultados positivos a la prueba de SAT screening es un falso positivo, posiblemente por contaminación de la muestra o el animal se encuentra en etapas tempranas de la enfermedad (Ron-Román, 2003).

Benítez en el año 2008, en un estudio realizado en el cantón Mejía, provincia de Pichincha, encontró un 11.92% de prevalencia en caninos utilizando la prueba diagnóstica de SAT. En comparación con dicho estudio, en éste no se realizó la prueba ELISAI.

Tabla 9. Resultados de la prueba de titulación de Suero Aglutinación en Tubo (SAT)

LOCALIDAD	TITULOS							Total
	75 (25 UI)	75/50/25 (60UI)	75/75 (50UI)	75/75/50 (80IU)	75/75/75 (100UI)	75/75/75/50 (160 UI)		
Ancholag alto	0	0	0	1	0	0	1	
San Luis	0	1	0	0	1	0	2	
Santa Anita	1	0	1	0	0	1	3	
Total	1	1	1	1	1	1	6	

Títulos iguales o mayores a 60 UI son positivos.

4.3. RESULTADOS DE LA ENCUESTA

Se realizaron un total de 118 encuestas, es decir una encuesta individual por canino muestreado, en las cuales se indagó respecto a los hábitos alimenticios y comportamentales de los animales, número de gestaciones/partos y contacto con animales de producción. Todos los animales comprendidos en el estudio tienen contacto habitual o esporádico con el ganado bovino, se discriminó los animales menores a 6 meses de edad debido a que los propietarios evitan el contacto de los mismos con el ganado con el fin de evitar accidentes.

Los resultados obtenidos en la encuesta pueden presentar un rango de error, debido a que son los propietarios de los animales quienes han transmitido esta información y no se la ha obtenido por observación directa de los animales.

4.3.1. Contacto y/o convivencia con otros animales

De 118 perros a los cuales se realizaron las pruebas serológicas RB y SAT para la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp., el 99.15% (n=117) tiene contacto habitual con el ganado bovino y el 0.85% (n=1) contacto esporádico.

Los caninos del área mantienen contacto y/o conviven con otros animales, a más de ganado bovino, que los habitantes de las comunidades mantienen en traspatios, y éstos podrían ser reservorio de la bacteria, por otro lado se ha podido evidenciar que dichas explotaciones de traspatio no cuentan con sistemas de bioseguridad. Para obtener ésta información se aplicó una encuesta (ANEXO 6) mediante la que se encontró que en las 3 comunidades el 27.11% (n=32) de perros tienen contacto con ovinos, de los cuales un 28.13% (n=9) en Santa Anita de Ancholag, 50% (n=16), en Ancholag Alto y 21.88% (n=7) en San Luis de Chaguarpungo. El 12.71% (n=15) tienen contacto con equinos entre las 3 comunidades, de éstas Santa Anita de Ancholag 40% (n=6), en Ancholag Alto 20% (n=3), y en San Luis de Chaguarpungo 40% (n=6); por último, los caninos que tienen relación con porcinos son el 24.57% (n=29), de éstos en Santa Anita de Ancholag son 17.24% (n=5), en Ancholag

Alto existen 41.38% (n=12), y en San Luis de Chaguarpungo 41.38% (n=12). No existe contacto con caprinos ni con camélidos, de acuerdo a la información proporcionada en la encuesta.

Tabla 10. Contacto de perros con otras especies de animales de producción en el área de estudio

LOCALIDAD	Contacto con							
	Ovinos		Equinos		Porcinos		Bovinos	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ancholag alto	16	50,00%	3	20,00%	12	41,38%	32	27,12%
San Luis	7	21,88%	6	40,00%	12	41,38%	47	39,83%
Santa Anita	9	28,13%	6	40,00%	5	17,24%	39	33,05%
Total	32	100,00%	15	100,00%	29	100,00%	118	100,00%

El contacto con animales de producción es un factor que influencia en el contagio de la enfermedad. Se conoce que el hospedador principal para *B. abortus* son los bovinos, sin embargo la bacteria puede afectar a cualquier mamífero, entre ellos el perro y el hombre. Las infecciones en otros mamíferos se da de forma facultativa, principalmente por el consumo de alimentos, agua o pastos contaminados (Romero Cabello, 2007).

4.3.2. Población canina que consume productos de partos y/o abortos de ganado

Los caninos que mantienen contacto habitual o esporádico con el ganado, (n=118), están de igual manera en contacto con los productos de los partos o abortos de los mismos, y muchas veces existe consumo de estos productos por parte de los perros. El 16.95% (n=20) no han consumido productos abortados, de los cuales 2.54% (n=3) se encuentran en Ancholag Alto, 9.32% (n=11) en San Luis de Chaguarpungo y 5.08% (n=6) en Santa Anita de Ancholag. Los propietarios del 27.97% (n=33) no han podido constatar el consumo de abortos por parte de su animal ya que los caninos deambulan libremente por los poteros, de éstos 7.63% (n=9) se encuentran en Ancholag Alto, 6.78% (n=8) en San Luis de Chaguarpungo y 13.56% (n=16) en Santa Anita de Ancholag.

De los 118 animales muestreados, el 55.08% (n=64) ha consumido productos de abortos, de los cuales el 16.95% (n=20) se encuentran en Ancholag Alto, 23.73% (n=28) en San Luis de Chaguarpungo y 14.41% (n=17) en Santa Anita de Ancholag.

Tabla 11. Distribución de población canina que consume productos de partos y/o abortos de ganado

LOCALIDAD	CONSUMO DE ABORTOS							
	No		No se evidencia		Si		Total	
	N	%	n	%	n	%	n	%
Ancholag alto	3	2,54%	9	7,63%	20	16,95%	32	27,12%
San Luis	11	9,32%	8	6,78%	28	23,73%	47	39,83%
Santa Anita	6	5,08%	16	13,56%	17	14,41%	39	33,05%
Total	20	16,95%	33	27,97%	65	55,08%	118	100,00%

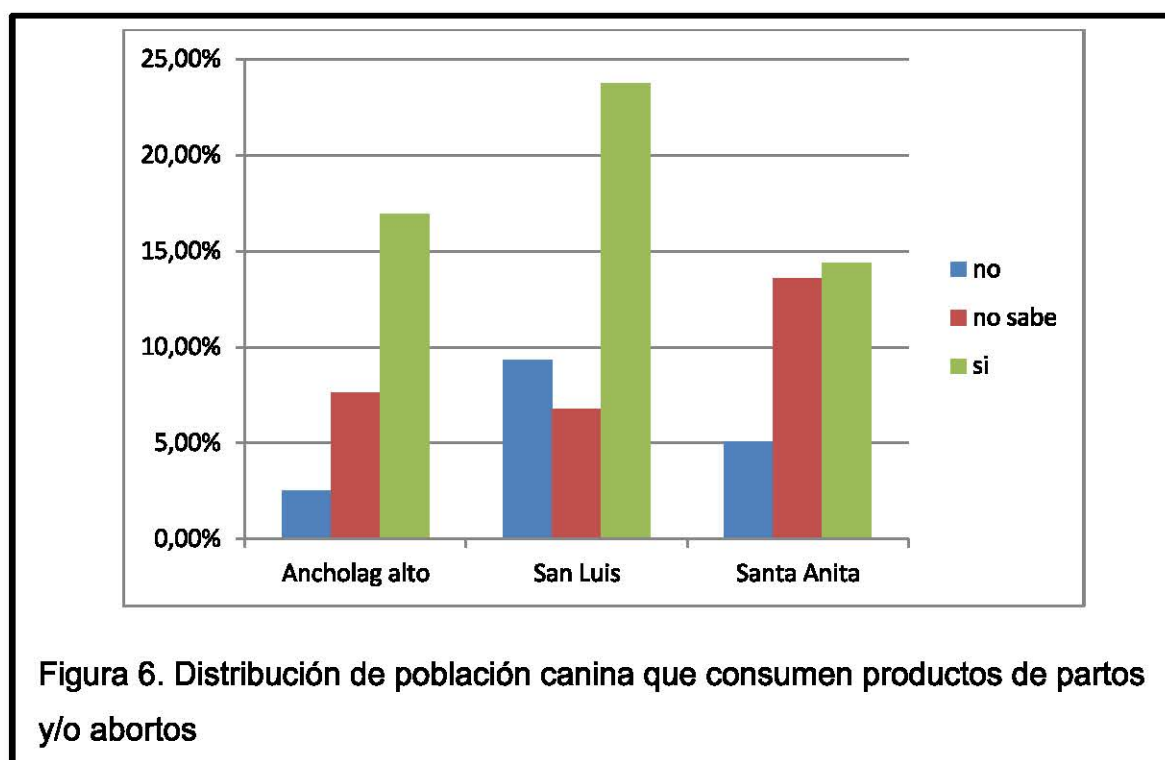


Figura 6. Distribución de población canina que consumen productos de partos y/o abortos

Las formas más comunes de propagación de la bacteria se dan por pastoreo en praderas infectadas, o el consumo de alimentos o agua contaminada por secreciones y membranas fetales de vacas infectadas, y el contacto directo con fetos abortados y con terneros neonatos infectados (Radostis et al., 2002). Los productos de abortos y exudados vaginales que eliminan tras haber abortado son las principales fuentes de infección

(Biberstein y Chung- Zee, 1994). Con relación al consumo de materiales provenientes de partos y abortos, se ha observado que un total del 42.37% (n=50) caninos consumen principalmente placentas, 16.95% (n=20) habitan en Ancholag Alto, 19.49 (n=23) en San Luis de Chaguarpungo y 5.93% (n=7) en Santa Anita de Ancholag. El consumo de placentas y fetos se observó solamente en 12.71% (n=15) perros, 4.24% (n=5) en San Luis de Chaguarpungo, y 8.47% (n=10) en Santa Anita de Ancholag. Se puede observar que el número de animales que consumen placentas y fetos abortados está directamente relacionado con el porcentaje de animales positivos en las comunidades.

Tabla 12. Distribución de la población canina que consume placentas y fetos

LOCALIDAD	CONSUMO					
	Placentas		Placentas y fetos		Total	
	n	%	n	%	N	%
Ancholag alto	20	30,77%		30,77%	20	30,77%
San Luis	23	35,38%	5	35,38%	28	43,08%
Santa Anita	7	10,77%	10	10,77%	17	26,15%
Total	50	76,92%	15	76,92%	65	100,00%

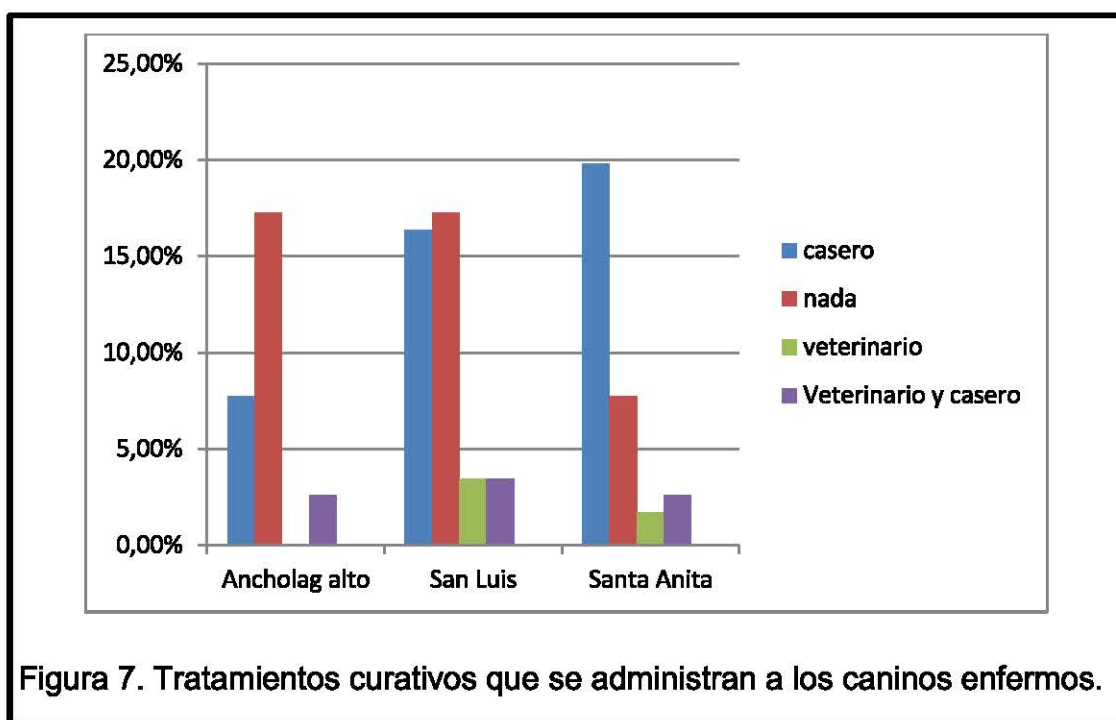
El consumo de placentas o fetos abortados ha sido evidenciado por los propietarios de los animales, esta información puede no ser totalmente veraz, sin embargo permite identificar el consumo de estos productos por parte de los perros como una posible fuente de infección. Las hembras eliminan el microorganismo hacia el ambiente a través de secreciones vaginales (celo, parto, aborto y postparto). Los fetos, la placenta y los loquios tienen concentraciones muy altas del microorganismo (hasta 10.000 dosis infectantes por ml) (Gómez y Guida, 2010).

4.4. ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTOS MÉDICOS

Se pudo determinar que el 94,83% (n=112) de los propietarios de las mascotas frente a la presencia de una enfermedad indistinta, realizan medicina de tipo casera tales como infusiones de hierbas y plantas medicinales. Existe

un porcentaje del 5,17% (n=6) de la población que busca la atención de un profesional Médico Veterinario, teniendo mayor preferencia el ganado para los chequeos rutinarios. En el caso de acudir a un médico veterinario con los caninos, los tratamientos comúnmente aplicados son desparasitaciones o atenciones de emergencia por accidentes o partos distócicos.

La comunidad de Ancholag alto se encuentra a mayor distancia de la ciudad de Cayambe aproximadamente a 8 km, por lo que se dificulta el traslado de los animales domésticos hacia las clínicas veterinarias, por lo tanto no se administra tratamiento guiado por un profesional Médico Veterinario. Se esperaba encontrar una mayor incidencia de la enfermedad estudiada en esta zona, sin embargo los resultados de laboratorio indican lo contrario, lo cual nos lleva a suponer que los animales de Ancholag alto no mantienen contacto habitual con los caninos de las otras comunidades debido a la distancia que existe entre ellas, y a la actividad productiva que se desarrolla en cada comunidad.



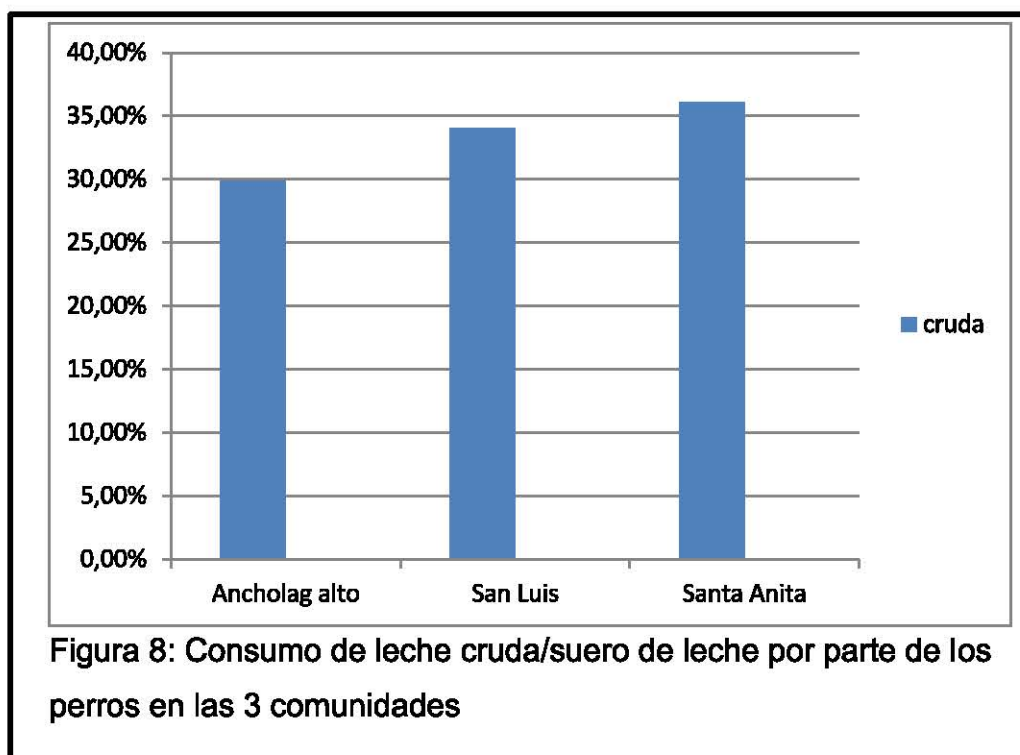
4.5. HABITOS ALIMENTICIOS DE LOS CANINOS

4.5.1. Consumo de leche cruda/suero de leche por parte de los perros

La bacteria *B. abortus* infecta los tejidos ricos en eritritol, como son la mama, el útero y la placenta. La bacteria se elimina al medio circundante a través de la leche y productos de abortos o partos infectados. El consumo de leche cruda es una de las fuentes más frecuentes de infección con bacterias pertenecientes al género *Brucella* (Murray et al, 2006).

En las 3 comunidades se obtuvo altos porcentajes de consumo de leche cruda y/o suero por parte de las mascotas, lo que quiere decir que podría existir una alta probabilidad de contagio de *Brucella* spp. si no existe un control adecuado de la enfermedad en el ganado bovino.

En Ancholag Alto el 24.57% (n=29) de la población total de muestra consumen leche cruda o suero de leche, en San Luis de Chaguarpungo el 27.97% (n=33) y en Santa Anita de Ancholag el 29.66% (n=35), dando un total del 82.20% (n=97/118) de la población canina entre las 3 comunidades que consumen de forma habitual leche cruda o suero de leche, al 17.80% de la población restante los propietarios no alimentan con leche en cualquier forma. Merchant-Packer (1980), mencionan en su libro Bacteriología y virología veterinaria, que el consumo de carne infectada y leche contaminada son especialmente peligrosos, e implican un riesgo de contagio de Brucelosis.



4.5.2. Alimentación de los caninos

La alimentación de los animales comprendidos en el estudio es muy variada. Se basa en el consumo de sobras de comida casera, y sopas o coladas que preparan los propietarios para alimentar a los animales, y en el caso de que consuman balanceado comercial o piensos que se presenta en el 17.24% (n=20) de la población, lo hacen mezclado con sobras de comida casera o coladas. No existe control sobre el consumo de basura doméstica o ganadera por parte de los caninos, y la preparación de coladas o sopas para alimentar a los animales, casi siempre comprende la utilización de leche o suero de leche que no ha sido pasteurizado.

4.5.3 Origen del agua de bebida que consumen los caninos

En el medio, *Brucella* spp. sobrevive por periodos de tiempo relativamente largos, teniendo en cuenta que es una bacteria no esporulada (Bowden et al., 2007). Las fuentes más comunes de propagación son el consumo de alimentos infectados, o de agua contaminada por secreciones y membranas fetales de vacas infectadas (Radostis et al., 2002). El agua de

bebida proviene de distintas fuentes. Se sabe que el consumo de agua contaminada con *Brucella* spp es una fuente de infección.

Tabla 13. Origen del agua de bebida

LOCALIDAD	Proveniencia del agua													
	Acequia		Cisterna		Entubada		Potable		Pozo		Río		Total	
	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%
Ancholag alto	9	7,69%	7	5,98%	8	6,84%	0	0,00%	3	2,56%	5	4,27%	32	27,35%
San Luis	21	17,95%	7	5,98%	3	2,56%	8	6,84%	3	2,56%	4	3,42%	46	39,32%
Santa Anita	5	4,27%	6	5,13%	2	1,71%	0	0,00%	1	0,83%	9	7,69%	39	33,33%
Total	35	29,91%	20	17,09%	13	11,11%	8	6,84%	7	5,83%	15	12,50%	117	100,00%

4.6. EXPLORACIÓN FÍSICA

4.6.1. Signos clínicos no reproductivos asociados a la infección por *B. abortus*

A cada uno de los pacientes se realizó un examen físico clínico general para detectar cualquier cambio fisiológico que nos guíe a un diagnóstico presuntivo de la enfermedad.

La brucelosis es variable en lo que se refiere a las manifestaciones clínicas, frecuentemente la presencia de aborto es el único signo de la enfermedad. En ocasiones se aprecia un aumento en el tamaño de los ganglios linfáticos. En los machos, a parte de la epididimitis y orquitis, es común la presencia de prostatitis en diferentes grados de severidad (Flores, 2005).

Los estudios de Carmichael y Shin (1999) demuestran que la brucelosis canina es asintomática. Benítez (2008) obtuvo el 98.01% de animales muestreados que no presentaron señales clínicas ni lesiones aparentes. En el presente estudio se obtuvo un 97.45% de animales que no han presentado lesiones aparentes o signos clínicos que se puedan relacionar con la infección por *B. abortus*.

Los signos clínicos observados en el 2.55% de los perros muestreados fueron:

- **Envejecimiento prematuro:** El perro tiene 3 años, se observa desgaste dentario avanzado; pérdida de dientes incisivos. Encanecimiento alrededor del hocico y cejas. Inflamación de articulaciones de los carpos y tarsos y rodillas, presencia leve de molestia a nivel de dichas articulaciones. Los propietarios comentan disminución en el nivel de actividad en los últimos meses. La presencia de signos frecuentemente presentados por animales geriátricos son congruentes con envejecimiento prematuro. No se observan afecciones en piel o sistema reproductor.
- **Sarna generalizada:** Se presentan escasas alteraciones en la puerta de entrada del agente causal en la primera fase de la enfermedad. Cuando el curso es crónico, se aprecia a veces exantema, eczema y dermatitis (Voigt y Kleine, 1975). No hubo alteración en el procesamiento de la muestra ni en su resultado, que fue negativo.
Se observa en una perra de 4 años de edad de raza Mastín napolitano, presenta alopecia generalizada, descamación, prurito, hiperqueratosis e hiperpigmentación. No se observan parches piodérmicos.
- **Estado letárgico:** disminución de la actividad física habitual, somnolencia. El perro presenta el síntoma de forma aislada. A la revisión física no se observan anomalías.

Tabla 14. Signos clínicos no reproductivos asociados con la infección por B. abortus

LOCALIDAD	SIGNOS CLINICOS									
	Envejecimiento prematuro		Estado letárgico		Sarna generalizada		Ningún síntoma		Total	
	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Ancholag alto	0	0,00%	0	0,00%	1	0,85%	31	26,27%	32	27,11%
San Luis	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	46	38,98%	47	39,83%
Santa Anita	1	0,85%	1	0,85%	0	0,00%	38	32,20%	39	33,05%
Total	1	0,85%	1	0,85%	1	0,85%	115	97,45%	118	100,00%

4.7. GESTACIÓN Y PARTOS

4.7.1. Hembras que han gestado al menos una vez

En la encuesta realizada a los propietarios de las mascotas se pudo obtener información del número de gestaciones de las pacientes hembras y si estos fueron a término o hubo pérdidas. No existe un control poblacional con el método de esterilización canina, lo que nos indica que existe un alto porcentaje de hembras (89.13%) (n=41 / 46) que han parido por lo menos una vez en su vida reproductiva. Ésta información se debe tener en cuenta y analizarlos con los resultados de las pruebas serológicas, con el fin de determinar si el contacto sexual influye en la trasmisión de la enfermedad

Tabla 15. Distribución de hembras que han gestado al menos una vez

LOCALIDAD	n	%
Ancholag alto	12	26.08%
San Luis	18	39.13%
Santa Anita	11	23.91%
Total	41	89.13%

4.7.2. Anomalías en los partos

En la infección con *B. abortus* en caninos, el aborto no es un signo fácilmente evidenciable, sin embargo se puede presentar, a diferencia que en la infección con *B. canis* que si lo es. Se observan problemas de gestación y parición en las comunidades en las que se desarrolló el estudio, los problemas más comunes son abortos en el último tercio de la gestación, mortinatos, o neonatos débiles que mueren en los primeros días. Los porcentajes de perras que han tenido partos normales es del 54.55% (n=18) en comparación con perras que no han presentado partos normales que muestran un porcentaje del 32,26% (n=10). Estos porcentajes indican la presencia de problemas de salud, sin embargo, el aborto no es un signo patognomónico de *B. abortus*.

En el estudio realizado por Benítez (2008), se establece una relación entre ambos sexos, se determina que las hembras tienen más de dos veces (2.79) la probabilidad de estar enfermas en comparación con los machos.

Tabla 16. Anormalidades en el proceso del parto

LOCALIDAD	ANORMALIDADES											
	Abortan		neonatos débiles		mortinatos		reabsorción fetal		Parto normal		Total	
	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Ancholag alto	0	0,00%	0	0,00%	1	3,23%	0	0,00%	10	30,30%	11	33,33%
San Luis	8	25,81%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	5	16,13%	13	41,94%
Santa Anita	2	6,45%	1	3,23%	1	3,23%	1	3,23%	4	12,91%	9	29,03%
Total	10	32,26%	1	3,23%	2	6,46%	1	3,23%	18	54,55%	33	100,00%

4.7.3. Abortos en las perras

Se ha evidenciado que en 42.42% (n=14) de un total de 33 individuos femeninos muestreados, se han producido abortos, el mayor porcentaje se encuentra en San Luis de Chaguarpungo con 21.21% (n=7), 18,18% (n=6) se encuentran en Santa Anita de Ancholag y solamente 3.03% (n=1) en Ancholag Alto. Estos resultados indican una alta incidencia de problemas reproductivos o de manejo de las perras gestantes. Más adelante se evidenciará si los abortos en la zona están relacionados con la presencia de *B. abortus*. La comunidad más saludable en el ámbito reproductivo aparentemente es Ancholag Alto con un 30.30% (n=10) de animales que no han presentado abortos en cualquiera de sus gestaciones.

Benítez (2008) sugiere que las perras infectadas tienen mayor probabilidad de abortar que las perras negativas, obtuvo que 62.5% de los casos positivos en dicho estudio presentaron abortos. Carmichael y Shin (1999) señalan que el aborto, en perras infectadas con *B. canis*, ocurrió entre el día 45 y 55 de la gestación en 75% de los casos. Concluyendo, que al igual que en otros mamíferos, el aborto ocurre en los animales debido a la presencia de eritritol en

los tejidos placentarios, que estimula el crecimiento de *Brucella* (Charmichael y Shin, 1999)

Tabla 17. Distribución de perras que presentaron abortos

LOCALIDAD	Presentan abortos					
	No		Si		Total	
	N	%	n	%	n	%
Ancholag alto	10	30,30%	1	3,03%	11	33,33%
San Luis	5	15,15%	8	24,24%	14	42,42%
Santa Anita	3	9,09%	6	18,18%	9	27,27%
Total	18	54,55%	14	42,42%	33	100,00%

4.7.4. Disposición de los fetos abortados

En el caso de presentarse el aborto de algún animal dentro de la comunidad, ya sea animales de producción o doméstico, el 65.22% (n=77) de la población entierra las carcasas, el 30.43% (n=36) no realiza ninguna acción, y el 4.35% (n=5) lo dispone para el consumo de otros animales. Se presume una relación estrecha entre la disposición de los fetos abortados con la presencia de *B. abortus* en caninos en San Luis de Chaguarungo.

Tabla 18. Disposición de fetos abortados

LOCALIDAD	DISPOSICION DE LOS FETOS ABORTADOS							
	Consumo de otros animales		Entierra		No realiza ninguna acción		Total	
	N	%	n	%	n	%	n	%
Ancholag alto	0	0,00%	6	26,09%	0	0,00%	6	26,09%
San Luis	1	4,35%	6	26,09%	4	17,39%	11	47,83%
Santa Anita	0	0,00%	3	13,04%	3	13,04%	6	26,09%
Total	1	4,35%	15	65,22%	7	30,43%	23	100,00%

4. 8. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.8.1. Análisis estadístico de factores de riesgo

El análisis estadístico utilizando las pruebas Chi Cuadrado Y Odds Ratio para correlacionar los resultados obtenidos en las pruebas serológicas y la información recolectada a través de la encuesta. Los resultados demuestran que no existe diferencia significativa en la presentación de los casos con relación al género de los animales, las hembras tienen solamente una probabilidad del 0.065 mayor que los machos de presentar la enfermedad; Benítez (2008) en un estudio realizado en Mejía encontró que las hembras tienen casi tres veces (2.79) probabilidades de estar infectadas que los machos.

En el estudio actual se observó que en hembras con antecedentes reproductivos de al menos una monta, en las cuales se han evidenciado gestaciones, las probabilidades de presentar la enfermedad son 21.42 veces, mientras que en machos la probabilidad es de 6.38, indicando que las hembras con al menos una monta, son más susceptibles que los machos a la bacteria. En el caso de haber presentado alguna anomalía durante el parto o gestación, o abortos, las probabilidades de infección son de 7.31 veces en comparación con hembras que no han presentado anomalía alguna durante la gestación o parto. Benítez (2008) encontró un 62.5% de probabilidades de infección en el caso de caninos que habían presentado abortos, estos resultados nos lleva a la conclusión que, al igual que en el resto de mamíferos, el aborto se produce por la presencia de grandes cantidades de eritritol en el tercer tercio de la gestación, que favorece la reproducción de *Brucella* spp. en el útero.

Los caninos que tuvieron contacto habitual con el ganado, tienen una probabilidad del 5.13% de infectarse con *B. abortus*, dicho porcentaje no es significativo. Los perros que consumen leche cruda o suero de leche, tienen un 5.13% de probabilidades de estar infectados, estos valores no son substanciales, por lo que el consumo de leche cruda no es un factor de riesgo importante en el estudio. La disposición inadecuada o inexistente de los productos de abortos de animales de producción, favorece en un 4.24% las

probabilidades de contagio de la enfermedad. Por otro lado, los caninos que consumen productos de partos o de abortos de otros animales, tienen 25% de probabilidades de presentar una infección por *Brucella* spp.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1 CONCLUSIONES

- Los resultados encontrados en el presente estudio demuestran la presencia de anticuerpos anti-Brucella de tipo liso, mediante la aplicación de las pruebas serológicas de Rosa de Bengala y Suero Aglutinación en Tubo, en muestras de perros del sector de la Hacienda Ancholag, en el cantón Cayambe, provincia de Pichincha.
- Los principales factores de riesgo asociados a la positividad de las pruebas serológicas aplicadas, fueron el historial reproductivo de los caninos hembras que hayan presentado al menos un aborto (42.42 %), y el consumo de productos de abortos de vacas (25%), el contacto de los caninos con el ganado bovino, el consumo de leche o suero de leche crudos.
- Se observó que existe una alta correlación entre la presentación de abortos en hembras caninas y un alto título obtenido en las pruebas de SAT. El aborto presentado en estos animales es un factor importante para la diseminación de la enfermedad entre perros, animales de producción y humanos.
- No se logró realizar el aislamiento de la bacteria para determinar las cepas presentes en el área de estudio debido a dificultades técnicas presentes en el laboratorio durante la realización de la investigación.

5.2 RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar estudios complementarios en el Cantón Cayambe, para determinar la prevalencia de *Brucella* spp. tanto en los bovinos como en el humano, con el fin de justificar el desarrollo de programas de control para evitar la diseminación de la enfermedad.
- Eliminar los animales positivos, esterilizar a los animales negativos e impedir el contacto de los caninos con el ganado, evitar el ingreso de los caninos a las salas de ordeño y potreros aplicando prácticas de bioseguridad, con el fin de prevenir nuevos casos, y que los caninos los diseminen entre las comunidades.
- Realizar el aislamiento, de la (s) cepa (s) de *Brucella* circulante en las áreas de estudio, con fines de control e investigación, debido a por dificultades técnicas, el personal del laboratorio del CIZ, no pudo colaborar con el cumplimiento de este objetivo del presente estudio.
- Informar a las entidades de salud a nivel Nacional sobre la problemática presente en Cayambe, causada por la brucelosis de origen zoonótico, con el objetivo de que se tomen medidas de control, seguimiento y tratamiento a los casos positivos en humanos.
- Educar a la población respecto a la enfermedad y medidas de control. Ilustrar el riesgo potencial que implica a la salud humana, salud animal y a la producción pecuaria, con el consiguiente impacto económico.

REFERENCIAS

- Badakhsh F, C. L. (2005). Improved Rapid Slide Agglutination Test for Presumptive Diagnosis of Canine Brucellosis. En *Improved Rapid Slide Agglutination Test for Presumptive Diagnosis of Canine Brucellosis* (págs. 15: 286-9).
- Benítez, F. J. (2008). Seropresencia de anticuerpos contra *Brucella* spp. en caninos de haciendas ganaderas del cantón Mejía, Pichincha, Ecuador. *Tesis de grado para la obtención del título de licenciado en ciencias biológicas*. Quito, Pichincha, Ecuador: Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de ciencias exactas y naturales, escuela de ciencias biológicas.
- Biberstein, E. L., & Chung-Zee, Y. (1994). *Tratado de Microbiología Veterinaria*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Bonagura, J. D., & Twedt, D. C. (2010). *Terapéutica veterinaria actual XIV*. Barcelona: Editorial Elsevier.
- Bowde, R. A., Baldi, P. C., Cassataro, J., Comerci, D. J., Estein, S., Fossati, C. A., y otros. (2007). *Brucella*. En P. E. Nestor Oscar Stanchi, *Microbiología veterinaria* (págs. 281- 293). Mexico D. F. : Editorial Acribia.
- Brooks, G. F., Butel, J. S., & Morse, S. A. (2002). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. México D. F. : Editorial Manual Moderno.
- Carmichael L, J. J. (2001). Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. En *C. Vet.*
- Carrillo, G. . (2004). Purueba de fijación de complemento para el diagnóstico de la brucelosis. En G. Carrillo, *Boletín de la Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana*.
- CES, U. (2008). Medicina Veterinaria. *REVISTA CES*, Volumen 3 51 - 55.
- CES, U. (JULIO-DICIEMBRE 2013). *MEDICINA VETERINARIA. REVISTA CES*, 74-83.
- EL., S. (2002). Brucelosis in Argentina. *Veterinary Microbiology*. 90, 71-80.
- Galindo, E. (2006). *Estadística, métodos y aplicaciones*. Quito: ProCiencia Editores.
- Gómez, N., & Guida, N. (2010). *Enfermedades infecciosas de los caninos y felinos*. Buenos Aires: Editorial Inter-Médica.
- Gómez, N., & Guida, N. (2010). *Enfermedades infecciosas de los caninos y felinos*. Buenos Aires: Editorial Inter-Médica.
- Gutierrez Pabello, J. A. (2010). *Inmunología Veterinaria*. Bogotá: Editorial Manual Moderno.

- INEC. (2012). *www.agroecuador.ecom*. Recuperado el 21 de Agosto de 2013, de ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DEL III CENSO AGROPECUARIO:
<http://www.agroecuador.com/HTML/Censo/Censo.htm>
- Koneman, E. W., Winn, W. C., Allen, S. D., Procop, G. W., Schreckenberger, P. C., Janda, W. M., y otros. (2013). *Koneman Diagnóstico microbiológico*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Kustritz, M. V. (2012). *Reproduccion clinica de los caninos y felinos*. Buenos Aires: Editorial Inter- Médica.
- Lucero, N. E., Escobar, G. L., Ayala, S. M., Escobar, G. I., TUccillo, P., & Jacques, I. (2005). Unusual clinical presentation of brucellosis caused by *Brucella canis*. *Journal of medical microbiology*, 505-508.
- M., C. (2006). Brucellosis in humans and animals. *WHO guidance*.
- M., R.-C. (1954). Brucelosis. *La prensa médica mexicana*, 1-14.
- Martin, S. W., Meek, A. H., & Willeberg, P. (1997). *Epidemiología Veterinaria principios y métodos*. Zaragoza: Editorial ACRIBA S.A.
- Martino P, M. J. (1998-2001). serological survey of selected pathogens of freeangng foxes in Southern Argentina.
- Merchant, J. A., & Packer, R. A. (1980). *Bacteriología y Virología Veterinaria*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Morgan, R. V., & Ronald M. Bright, M. S. (2004). *Clinica de pequeños animales*. Madrid: Editorial Elsevier.
- Nelson, R. W., & Couto, C. G. (2010). *Medicina interna de pequeños animales*. Barcelona: Editorial Elsevier.
- Nicholas, F. W. (1987). *Genética Veterinaria*. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Orejuela M., J. E., Díaz M., O. L., Gonzáles G., P. M., Ortiz C., J., Monroy G., W. E., & Patiño A., A. (2009). *www.ica.gov.co*. Recuperado el 9 de Febrero de 2014, de Sistema de Información y Vigilancia Epidemiológica. Informe Técnico:
<http://www.ica.gov.co/getattachment/e205da92-1991-4de4-b412-29d6dae2ae40/2008-%281%29.aspx>
- Organization, W. H. (2006). Brucellosis in Humans and Animals. *WHO/CDS/EPR*, 36-56.
- PANAFTOSA/OPS/OMS, P. C. (2000). *Situación de los programas de control de brucelosis en América*. Rio de Janeiro, Brasil.

- Papas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., & Tsianos, E. (2005). Brucellosis. *The New England journal of medicine*, 2325-2336.
- Pavlov P, T. D. (2002). Recherches sur des réservoirs de Brucella chez le porc vivant en liberté. *bulletin Off int Epizoot.*
- Radostits, O. M., Gay, C. C., & D. C. Blood, K. W. (2002). *Medicina Veterinaria, Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. Madrid: Editorial McGraw Hill.
- Rementzova. (2001). Brucellosis en animales silvestres. En A.-A. U. Kazakh. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú: www.scielo.org.pe*. (Julio/Diciembre de 2007). Recuperado el 3 de Septiembre de 2013 http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172007000200008&script=sci_arttext
- Romero-Cabello, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Ron, J. W. (2003). Técnicas diagnósticas para la detección de Brucellosis y estudio epidemiológico en una región andina del Ecuador. *Tesis para la obtención del grado de master en ciencias de la salud animal*. Ambenes, Belgica: Instituto de medicina tropical príncipe Leopoldo, departamento de sanidad animal tropical.
- Ron-Román, J. C.-P.-G.-E.-S.-H.-C.-O. (18-20 de Junio de 2008). Brucellosis en trabajadores de camales de la región norte del Ecuador: seroprevalencia de anticuerpos e identificación del agente causal. *III Congreso Panamericano de Zoonosis*. Argentina: Asociación Argentina de Zoonosis.
- Ron-Román, J. G.-O. (15-17 de Septiembre de 2003). Validation of diagnostic tests to detect brucellosis and epidemiological survey in the ecuadorian andes. *Internacional Research Conference, including the 56th Brucellosis Research Conference*. España.
- Saegerman, C., Berkvens, D. G., & Walravens, K. (2007). *Bovine Brucellosis, Historical background*. Bruxelles, Belgium.
- Samartino, L. E. (20-21 de junio de 2007). <http://www.iecscyl.com/>. Recuperado el 10 de enero de 2014, de Brucellosis en Argentina y otros países del Mercosur: <http://www.iecscyl.com/aulas/modules/icontent/inPages/brucellosis/textos/3.%20Samartino.pdf>
- Tizard, I. R. (2000). *Inmunología veterinaria*. México D. F. : Editorial McGraw-Hill Interamericana.

- Toledo, M., Delgado, A., Suárez, F., & Noé, N. (julio/diciembre de 2007).
<http://www.scielo.org.pe/>. Recuperado el 19 de septiembre de 2013, de Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172007000200008&script=sci_arttext
- V., R. K. (2012). *Reproducción clínica de caninos y felinos*. Buenos Aires: Editorial Inter-Médica.
- VASCONEZ IBAÑEZ, M. A. (31 de julio de 2008). *<http://repositorio.ute.edu.ec/>*. Recuperado el 21 de Abril de 2013, de PLAN INTEGRAL DE SEÑALETICA TURISTICA PARA EL CANTON CAYAMBE, PROVINCIA DE PICHINCHA:
<http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/8777>
- Voigt, A., & Kleine, F.-D. (1975). *Zoonosis (descripción sinóptica orientativa)*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Whatmore Adrian M., S. S. (2006). Identification and Characteritaton of variable number Tandem-repeat Markers for typing of Brucella spp. *Journal of clinical Microbiology*, vol 44, N6, 1982-1993.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2008). *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*. Madrid: Editorial McGraw-Hill.

ANEXOS

ANEXO 1
Colocación de bozal



ANEXO 2
Extracción de muestra sanguínea mediante punción de la vena cefálica



ANEXO 3

Hoja de trabajo prueba Rosa de Bengala (RB)

CENTRO INTERNACIONAL DE ZOOLOGÍA
UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR

DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS

Prueba Rosa de Bengala (RB)

HOJA N° Especie: Fecha:

Fecha muestreo: Procedencia:

N° de Lote: Fecha exp.: Resp:

PLACA 1 P () S () N ()

SC(+)					
SC(-)					

PLACA 2 P () S () N ()

Observaciones: _____

ANEXO 5
Homogenización de las cúpulas en SAT-EDTA.



Pasos	Cúpulas											
	1(*)	2(*)	3(*)	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T- SAT (**)	168	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Suero a investigar	32											
Paso de dilución (100 ul)		∪	∪	∪	∪	∪	∪	∪	∪	∪	∪	∪
T - Ag (**)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Incubación a 37°C, por 20 horas											
Dilución final	1/12.5	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600

(*) : Diluciones empleadas en la prueba de rutina

ANEXO 6

Encuesta

ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE BRUCELLA EN EL AMBIENTE

Localidad:

Nombre del propietario:

INFORMACIÓN DEL PERRO.

Perro #:

Nombre:

Sexo:

Raza:

Edad:

1. Con que animales tiene contacto el perro?

- | | | |
|--------------|-------------|------------|
| a. Ovino | d. Bovinos | g. Caninos |
| b. Caprinos | e. Porcinos | h. Felinos |
| c. Camélidos | f. Equinos | i. Otros |

DATOS GENERALES DEL PERRO

1. Tiene el perro contacto con el ganado? Sí _____ No _____
2. El contacto es: Esporádico Habitual
3. Ha existido consumo por parte del perro de productos abortados por el ganado u otros animales? Si _____ No _____ (pase a la pregunta 6) No sabe _____ (pase a la pregunta 6)
4. Qué productos ha consumido?
- | | |
|-------------|---|
| a. Placenta | c. Otros (especificar)-
: _____
_____ |
| b. Fetos | |
5. Consume alguno de los siguientes productos?
- | | |
|--------------------------|----------------------------------|
| a. Leche de vaca cruda | c. Leche de vaca
pasteurizada |
| b. Leche de vaca hervida | |

ALIMENTACION Y AGUA DE BEBIDA

1. Con que se alimenta al perro? (especificar dieta y marca en el caso necesario)
- | | |
|---------------|-----------------------------|
| a. Balanceado | c.- Sobras de comida casera |
| b.- Coladas | |
2. De donde proviene el agua de bebida?
- | | |
|------------|---------------------------|
| a. Río | d. Cisterna |
| b. Acequia | e. Otros
(especificar) |
| c. Pozo | |

PATOLOGIAS REPRODUCTIVA DE LOS PERROS:

1. Se ha cruzado anteriormente? Sí _____ No _____ No sabe _____
2. Presenta alguno de los siguientes síntomas?:
 - a. Estado letárgico
 - b. Perdida de libido
 - c. Envejecimiento prematuro
 - d. Ninguno

MACHOS:

Síntomas a la exploración física:

- a. Epididimitis
- b. Orquitis
- c. Degeneración testicular
- d. Atresia testicular uni o bilateral
- e. Agrandamiento escrotal

HEMBRAS:

1. Cuantas montas ha tenido?
2. Las crías han nacido normalmente? (si es afirmativa, pasar a pregunta 7)
3. Se han producido abortos? (si es negativo finalizar encuesta)
4. Durante que gestación se han producido los abortos?
 - a. Primera gestación
 - b. Gestaciones subsiguientes
- 5.Cuál es el destino de los productos de los abortos?
 - a. Entierra
 - b. Incinera
 - c. Basura
 - d. Consumo de otros animales
 - e. No realiza ninguna acción
6. Existe retención de placenta posterior al parto o al aborto?
7. Que sucede cuando uno de los perros se enferman?
 - a. Se administra tratamiento
 - b. Venta/ adopción / abandono
 - c. Sacrificio
 - d. Ninguna acción