



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias
Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**“Frecuencia y referenciación geográfica de muestras de leche positivas a
brucelosis en fincas del Azuay”**

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Médico
Veterinario y Zootecnista.

Autor:

Edison Alfonso Mainato Aguayza

CI: 0302944780

edisonmainato_1994@hotmail.com

Director:

Dr. Juan Carlos Ramón Cárdenas

CI: 0103611604

Cuenca, Ecuador

01-abril-2021



I. RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad causada por bacterias cocobacilos Gram negativos del genero *Brucella* de carácter zoonotica que causa abortos, infertilidad, metritis, mortalidad neonatal entre otras complicaciones, afectando especialmente a mamíferos incluyendo al hombre. El objetivo del presente trabajo fue generar información georeferenciada de fincas seropositivas a Brucelosis bovina en la provincia del Azuay mediante la utilización de la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecta en muestras de leche cruda obtenidas de 153 predios que abastecen a la empresa Parmalat para la creación de mapas epidemiológicos y de las rutas de recolección, posteriormente se evaluó la relación entre la seropositividad con respecto a los factores de riesgo: procedencia de los animales de reemplazo, sistema de reproducción y procedencia del agua de consumo de los animales. Los resultados obtenidos mostraron que existe una frecuencia relativa de 7.8% de positivos (12 fincas). En el análisis de relación entre los elementos ($p > 0,05$) se encontró que el único factor de riesgo que tiene relación significativa es la procedencia de los animales de reemplazo, concluyendo que el empleo de la prueba ELISA indirecto en leche conjuntamente con programas de georeferenciación nos permite obtener diagnósticos eficaces, rápidos, a bajos costos y con gran utilidad epidemiológica.

Palabras claves: Brucelosis. Leche. Georeferenciación. ELISA-i



II. ABSTRACT

Brucellosis is a disease caused by Gram negative coccobacilli bacteria of the genus *Brucella* of a zoonotic nature that causes abortions, infertility, metritis, neonatal mortality among other complications, especially affecting mammals including man. The objective of this work was to generate georeferenced information on farms seropositive to bovine brucellosis in the province of Azuay by using the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in raw milk samples obtained from 153 farms that supply the Parmalat company for the creation of epidemiological maps and collection routes, subsequently the relationship between seropositivity with respect to risk factors was evaluated: origin of the replacement animals, reproduction system and origin of the drinking water of the animals . The results obtained showed that there is a relative frequency of 7.8% of positives (12 farms). In the analysis of the relationship between the elements ($p > 0.05$) it was found that the only risk factor that has a significant relationship is the origin of the replacement animals, concluding that the use of the indirect ELISA test in milk in conjunction with programs georeferencing allows us to obtain efficient, rapid diagnoses at low costs and with great epidemiological utility.

Keywords: Brucellosis. Milk. Georeferencing. ELISA-i



III. ÍNDICE DE CONTENIDO

I. RESUMEN	2
II. ABSTRACT	3
III. ÍNDICE DE CONTENIDO	4
IV. ÍNDICE DE TABLAS	7
V. ÍNDICE DE FIGURAS	8
VI. ÍNDICE DE ANEXOS	9
VII. DEDICATORIA	12
VIII. AGRADECIMIENTOS	13
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo general.....	17
2.2. Objetivo específicos.....	17
2.3. Hipótesis.....	17
3. REVISIÓN DE LITERATURA	18
3.1. Brucelosis.....	18
3.2. Distribución geográfica de Brucelosis.....	18
3.3. Signos clínicos.....	18
3.4. Patogenia.....	19



3.5. Factores de riesgo.....	20
3.5.1. Procedencia de animales de remplazo de animales.....	20
3.5.2. Procedencia de agua de consumo para los animales.	20
3.5.3. Sistema de reproducción.	21
3.6. Pruebas de diagnóstico.....	21
3.6.1. Métodos directos.....	21
3.6.2. Método indirecto	22
3.7. Prevención.	23
3.7.1. Vacuna con cepa S19 de B. abortus.....	24
3.7.2. Vacuna con cepa RB51 de B. abortus	24
3.8. Antecedentes	25
3.9. Epidemiología espacial.	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1. Área de estudio	29
4.2. Georeferenciación.....	30
4.2.1. Materiales de trabajo.	30
4.2.2. Procedimiento.....	30
4.3. Toma de muestras de leche.	31
4.3.1 Materiales	31
4.3.2. Procedimiento de la toma de muestras de leche.	31



4.4. Ensayo de ELISA-i.....	32
4.4.1. Materiales	32
4.5. Validación del proceso de ELISA-i	33
4.6. Métodos estadísticos.....	34
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1. Ensayo Elisa	35
5.2 Frecuencia de muestras seropositivas.....	36
5.3. Análisis de relación entre factores y seropositividad de la prueba.....	39
5. CONCLUSIONES.....	56
6. RECOMENDACIONES.....	57
7. BIBLIOGRAFÍA.....	58
8. ANEXOS.....	66



IV. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. DENSIDAD ÓPTICA DE MUESTRAS DE LECHE CORRESPONDIENTE A LA RUTA DEL CANTÓN OÑA Y NABON.	35
TABLA 2. PORCENTAJES DE SEROPOSITIVIDAD DE MUESTRAS DE LECHE CORRESPONDIENTE A LA RUTA DEL CANTÓN OÑA Y NABÓN.	36
TABLA 3. FRECUENCIAS DE POSITIVOS OBTENIDOS CON LA APLICACIÓN DEL ENSAYO ELISA INDIRECTO EN LECHE.	36
TABLA 4. NÚMERO DE CASOS EN RELACIÓN A LAS VARIABLES DE LA PROCEDENCIA DE AGUA PARA EL CONSUMO.	38
TABLA 5. ANÁLISIS DE LA PRUEBA DE CHI-CUADRADO EN RELACIÓN A LA PROCEDENCIA DEL AGUA DE CONSUMO.	40
TABLA 6. NÚMERO DE CASOS EN RELACIÓN A LAS VARIABLES DE LA PROCEDENCIA DE ANIMALES DE REEMPLAZO.	40
TABLA 7. ANÁLISIS DE LA PRUEBA DE CHI-CUADRADO EN RELACIÓN A LA PROCEDENCIA DE LOS ANIMALES DE REEMPLAZO.	42
TABLA 8. NÚMERO DE CASOS EN RELACIÓN A LAS VARIABLES DEL SISTEMA DE REPRODUCCIÓN.	43
TABLA 9. ANÁLISIS DE LA PRUEBA DE CHI-CUADRADO EN RELACIÓN AL SISTEMA DE REPRODUCCIÓN.	44



V. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>DIVISIÓN GEOGRAFÍA DE LA PROVINCIA DEL AZUAY</i>	28
FIGURA 2. . RESULTADO DE LA PRUEBA DE ELISA INDIRECTO EN LECHE PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DE <i>B. ABORTUS</i> EN 153 MUESTRAS.	37
FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN DE LOS RESULTADOS SEROPOSITIVOS EN LOS CANTONES.	45
FIGURA 4. MAPA DE RECORRIDO DE LA RUTA TARQUI.	46
FIGURA 5. MAPA DE RECORRIDO DE LA RUTA SOLDADOS.	47
FIGURA 6. MAPA DE RECORRIDO DE LA RUTA LA PAZ.	48
FIGURA 7. MAPA DE RECORRIDO DE LA RUTA OÑA.	49
FIGURA 8. MAPA DE RECORRIDO DE LA RUTA NABÓN.	48
FIGURA 9. GEOREFERENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS RECOLECTADAS DE LA RUTA TARQUI.	50
FIGURA 10. GEOREFERENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS RECOLECTADAS DE LA RUTA SOLADOS.	51
FIGURA 11. GEOREFERENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS RECOLECTADAS DE LA RUTA LA PAZ.	52
FIGURA 12. GEOREFERENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS RECOLECTADAS DE LA RUTA OÑA.	53
FIGURA 13. GEOREFERENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS RECOLECTADAS DE LA RUTA NABÓN.	54
FIGURA 14. GEOREFERENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS SEROPOSITIVAS EN LA PROVINCIA DEL AZUAY.	55



VI. ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. CAPACITACIÓN Y GEOREFERENCIACIÓN DE LOS PREDIOS.	66
ANEXO 2. TOMA DE MUESTRAS DE LECHE CRUDA EN LOS SITIOS DE RECOLECCIÓN.	66
ANEXO 3. IDENTIFICACIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE LECHE CRUDA.	67
ANEXO 4. IDENTIFICACIÓN Y CENTRIFUGADO DE LAS MUESTRAS.	67
ANEXO 5. POCILLOS CON MUESTRAS DE LACTO SUERO Y COLOCACIÓN DE SOLUCIÓN DE LAVADO.	68
ANEXO 6. POCILLOS CON SOLUCIÓN DE REVELACIÓN Y SOLUCIÓN DE PARADA.	68

Cláusula de Propiedad Intelectual

Edison Alfonso Mainato Aguayza, autor del trabajo de titulación "Frecuencia y referenciación geográfica de muestras de leche positivas a brucelosis en fincas del Azuay", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 13 de abril de 2021



Edison Alfonso Mainato Aguayza

0302944780

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Edison Alfonso Mainato Aguayza en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Frecuencia y referenciación geográfica de muestras de leche positivas a brucelosis en fincas del Azuay", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 13 de abril de 2021



Edison Alfonso Mainato Aguayza

0302944780



VII. DEDICATORIA

Principalmente a mis padres Alfonso y Erlinda , a mis hermanos Mirian y Oswaldo que han sido el pilar fundamental para iniciar , desarrollar y terminar mi carrera universitaria así también dedico el presente trabajo a mi padre Cesar +, mi tío Manuel + y mi primo Jaime + quienes fueron mi motivación para perseverar durante todos estos años universitarios. Finalmente a mi director Juan Carlos Ramonez que con su apoyo, paciencia y consejos se pudo culminar el trabajo

Edison Mainato.



VIII. AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a la empresa Parmalat y a todos sus colaboradores de manera en especial al Dr. Efrén León director de la política lechera, a la Dra. Paola Encalada, a los Señores: Xavier Minga, Pablo Quesada, Alfonso Suqui, Enrique Miranda y José Ortega transportistas, por abrirnos las puertas de tan prestigiosa institución para que se pueda desarrollar el presente trabajo. A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca a todos sus docentes y personal administrativo que compartieron su conocimientos durante todos estos años para la formación como profesional además a todos mis compañeros y amigos que han compartido los mejores recuerdos en esta etapa universitaria .

Así también de manera en especial a los miembros del tribunal por los consejos y correcciones que han permitido culminar de la mejor manera el presente trabajo.

Edison Mainato.



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

OIE: Organización Mundial de Salud Animal.

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.

PAL: prueba de anillo de leche.

ELISA-i: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas indirecto.

mFPA: prueba de fluorescencia polarizada.

RB: Prueba de Rosa de bengala.

FC: Prueba de Fijación de completo.

PCR: Reacción en cadena de polimererasa



1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica que ocasiona grandes pérdidas económicas, disminuyendo la producción y dificultando la libre comercialización de animales y sus productos (Soria y col., 2013). Esta enfermedad es causante principalmente de abortos, nacimientos débiles o muertos, retención de placenta, orquitis, epididimitis y artritis. Después del primer aborto las gestaciones pueden ser normales, sin embargo las vacas pueden eliminar la bacteria en la leche y en las descargas uterinas (Román y col., 2014). Si bien la prevalencia de la brucelosis bovina está asociada a las condiciones de cada localidad, región o país, con planes sanitarios deficientes y sistemas de manejo tradicionales, ésta afecta directa o indirectamente a la salud humana (Ibarra y Salgado., 2016).

A pesar de que en el 2009 AGROCALIDAD implementó el Programa nacional de control de brucelosis bovina, no se ha alcanzado avance significativos en el control de esta enfermedad, esto se puede atribuir a múltiples factores socioeconómicos y de carácter cultural tales como el desconocimiento de la enfermedad, los métodos de diagnóstico son muy invasivos o tediosos y por el alto costo que representa realizar el análisis a un gran número de animales (AGROCALIDAD., 2013).

A estos factores se les suman el número reducido de pruebas con las que cuentan, que si bien estas presentan una alta confiabilidad y especificidad, la utilización en masa de las mismas representa un alto costo y trabajo (Vizcarra, Lasso, y Tapia., 2015). Debido a esto se ve observado la necesidad de desarrollar nuevas técnicas que permitan al ganadero y al profesional obtener resultados confiables y eficaces (Rivera y col., 2003).

Ya que las pérdidas económicas que causa esta enfermedad son de gran importancia, así como (Mainato., 2017) determinó que existe una pérdida de \$ 6,14 al año por animal, \$ 11.26 al año por vaca y vacona mayor a 18 meses, y por cada hembra infectada \$ 264.90 al año considerando una seroprevalencia de 4.25% en la provincia del Cañar que representaría a \$ 861,548 al año.



Es por ello que el desarrollo de estas técnicas permitirán obtener resultados más efectivos en el menor tiempo posible, que si bien favorecerá al avance en estos programas también permiten la inclusión, asociación e innovación con otras áreas de investigación estadística y epidemiológica, que si bien las mismas tradicionalmente solían analizar datos socioeconómicos, ambientales y de salud no consideraban el espacio geográfico en donde ocurrían los eventos (Oyarzo y col., 2002).

Por ello el análisis espacial nos permite explicar las variaciones geográficas de la presentación de la enfermedad; para evaluar la relación entre la misma y posibles factores de riesgo. Y así fortalecer la capacidad de cuantificar, describir, analizar, gestionar y monitorear la enfermedad de acuerdo a las distintas zonas estudiadas (Alves y col., 2010).



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Generar información georeferenciada de predios seropositivos a brucelosis bovina en la provincia del Azuay mediante Elisa Indirecto en leche.

2.2. Objetivo específicos

- Estimar la seropositividad de Brucelosis Bovina en ganaderías con relación a la procedencia de los animales de reemplazo, sistema de reproducción y fuentes del agua de consumo de los animales.
- Identificar geográficamente los predios analizados y la variación entre los factores de riesgo: procedencia de los animales de reemplazo, sistema de reproducción y fuente del agua de consumo de los animales con relación a la Brucelosis bovina.

2.3. Hipótesis

Ha: El uso de la prueba de ELISA-i en muestras de leche permite analizar la frecuencia de brucelosis bovina en la provincia del Azuay.



3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Brucelosis

La brucelosis bovina es una enfermedad infecciosa que afecta a los animales y al hombre ocasionada por cocobacilos Gram negativos del género *Brucella* (Adamu y col., 2016). Afecta a bovinos de todas las edades pero con mayor prevalencia a los animales sexualmente maduros que además puede afectar a otras especies como porcinos, ovinos, caprinos, equinos, caninos y búfalos. En cada una de ellas produciendo distintos signos y síntomas distintos (Paredes., 2012).

3.2. Distribución geográfica de Brucelosis.

Desde los años cincuenta, la mayoría de los países de América latina y el Caribe, con ayuda técnica de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), han reconocido y abordado las zoonosis como un problema social, económico y sanitario dentro de estas enfermedades se encuentra la Brucelosis; que a pesar de los esfuerzos en América del Sur, aún existen cifras preocupantes de prevalencia de brucelosis bovina: Argentina, entre 10-14%; Venezuela 10.5%; Bolivia 8.5%; Paraguay 7.5%; Brasil 4.7%; Colombia 4.7%; Chile, entre 3 y 15%; Ecuador, 6% y, en Uruguay 0.5% (OPS., 2001; Soria y col., 2013).

3.3. Signos clínicos

La brucelosis afecta a bovinos de todos las edades, pero persiste con mayor frecuencia en animales sexualmente adultos, la infección da lugar al aborto y retención de la placenta y causando infertilidad, en las vacas el signo principal de la enfermedad es frecuentemente el aborto al final del tercio medio de la gestación de 5 a 7 meses o en cualquier etapa de la gestación; sin embargo, se han presentado casos en los que no hay aborto, sino solamente retención placentaria y endometritis (Aguerto y Fernandez., 2012; Ibarra y Salgado., 2016).



Además, puede ocurrir producción de mortinatos, placenta retenida, que produce metritis grave y menor producción de leche, en el macho las vesículas seminales son afectadas, se crean ampollas e inflamación en los testículos que causa una posterior atrofia, por lo que se infiere que la bacteria es secretada en el semen (Guerrero.,2010) La afectación en humanos se caracteriza por fiebre ondulante, además de inflamaciones en las articulaciones, dolor de cabeza, insomnio, bronquitis, pérdida de peso, debilidad y postración (Zambrano y Pérez., 2015).

3.4. Patogenia

La patogenia de las brucelosis de los rumiantes presenta unos caracteres específicos. En el ganado bovino, el periodo de incubación varía entre 14 y 180 días. Cuando las hembras se infectan al principio de la gestación, el periodo de incubación es más prolongado, en cambio sí ocurre en la segunda mitad de la gestación, el periodo es más corto. En términos generales, se considera que en las vacas los abortos y la mortinatalidad fetal ocurren entre las dos semanas y cinco meses después del inicio de la infección (Errico Maio., 2015; Mejía Martínez y Lemus Flores., 2012).

Aunque cada una de las especies de brucella tiene sus hospederos preferidos, todas son patógenas en una amplia categoría para los mamíferos, incluyendo al hombre. Inmediatamente después de la penetración del agente etiológico, las brucellas son transportadas, libres o en el interior de células fagocíticas, hasta los nódulos linfáticos más próximos al lugar de entrada (Blasco., 2008).

Según (Adamu y col., 2016) si las bacterias no son destruidas, pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en el interior de las células del sistema retículoendotelial y los nódulos linfáticos afectados responden a la agresión por medio de una hiperplasia reticuloendotelial y linfática, que puede tardar varias semanas en producirse y persistir durante meses. Cuando las bacterias no son aisladas y destruidas en los nódulos, se produce su diseminación a través de la vía linfática o más frecuentemente a través de la sangre (Tortora, Funke, y Case., 2007).



Por tanto, la diseminación hematológica permite la colonización del bazo, útero, placenta, glándula mamaria, nódulos linfáticos y de otros órganos como el testículo, epidídimo y glándulas sexuales accesorias en los machos. Estas bacterias al llegar al útero se multiplican abundantemente en los cotiledones y el corion placentarios, así como en los líquidos fetales, donde causan lesiones en la pared del órgano endometriosis ulcerosa en los espacios intercotiledonarios y destrucción de las vellosidades, que en muchas ocasiones causan la muerte y la expulsión del feto (Diaz., 2016; Mosquera y col., 2009).

3.5. Factores de riesgo

3.5.1. Procedencia de animales de remplazo de animales

Así como lo manifiesta (Eustorgio y col., 2008) la brucelosis en un rebaño se puede deber a la introducción de animales infectados a los que no se les ha realizado un análisis previo. En las ferias o exposiciones ganaderas representa un factor de contagio de alto riesgo, ya que los animales expuestos pueden contagiarse y al regresar al rebaño puede diseminar la enfermedad. Además las becerras infectadas durante el parto o posterior al consumir calostro contaminado pueden presentar los signos de la enfermedad hasta llegar a la edad adulta o desarrollar la primera gestación (Meza C y col., 2015).

3.5.2. Procedencia de agua de consumo para los animales.

Una de las principales vía de ingreso del patógeno es por la vía oral ya sea por el consumo de agua o alimentos contaminados con las secreciones o restos de abortos de animales infectados o también por el lamido de las secreciones vaginales, restos fetales y los becerros recién nacidos de vacas enfermas (Tortora, Funke, y Case., 2007). La *Brucella* puede permanecer viable durante mucho tiempo en pasturas y el agua a 8°C a un Ph de 6,5 en donde pueden permanecer viables hasta por 60 días, o en tierras húmedas a temperatura ambiente en donde puede permanecer viable hasta por 65 días (Motta y col., 2018).



3.5.3. Sistema de reproducción.

Los toros son susceptibles a la enfermedad aunque muchas de las veces no desarrollan sintomatología. Los sementales infectados son los transmisores principales de los patógenos ya que al momento de realizar la monta y la eyaculación se realiza en la vagina lo que provoca la eliminación de la bacteria por los anticuerpos propios de la misma por lo que para que se dé el contagio por esta vía debe existir un gran número de bacterias patógenas en el semen que traspasen la barrera vaginal. Distinto es el caso cuando se utiliza semen de toros enfermos para la inseminación artificial en donde el semen es depositado directamente en el útero, saltando así la barrera natural de la vagina (Blasco., 2008; Errico Maio., 2015).

3.6. Pruebas de diagnóstico.

3.6.1. Métodos directos

3.6.1.1. Cultivo microbiológico

Este método consiste en aislar específicamente la bacteria a partir de muestras de fetos abortados (contenido estomacal, bazo y pulmón) membranas fetales, secreciones vaginales, leche, semen, y tejido articular lesionado o fluidos de hidrogromas. El cultivo de gran especificidad; sin embargo existe factores como que es laborioso, costoso, no se lo puede realizar rutinariamente y sobre todo representa un gran riesgo para el personal del laboratorio (Diaz., 2016; Wampash., 2017).

3.6.1.2. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Esta prueba permite la detección de la secuencia específica del ácido desoxirribonucleico (ADN) de la bacteria causante del proceso de transmisión, detectando al agente patógeno en el hospedador directamente y no la ausencia de los anticuerpos en el suero de los animales sospechosos, esta prueba llega a tener una sensibilidad hasta del 82 % (Montes., 2000).



3.6.2. Método indirecto

3.6.2.1. Prueba de anillo en leche cruda (Ring test).

Esta prueba se basa en la reacción por la unión de los anticuerpos presentes en la muestra de leche con los antígenos coloreados con hematoxilina de brucellas dando como resultado un complejo antígeno anticuerpo que se adhiere a la grasa de la leche formando una capa de color morado en forma de anillo variando este desde un blanco cremoso a un morado intenso está dependiendo del número de complejo antígeno anticuerpo. Esta es una prueba rápida de bajo costo que sirve de tamizaje pero muy sugestiva y no muy utilizada en los últimos años (Acosta y Ortiz., 2010; Maldonado y col., 2010).

3.6.2.2. Prueba de fijación de complemento (FC).

Es una prueba que detecta cuantitativamente los anticuerpos que se producen durante la enfermedad, es muy utilizada para diferenciar los títulos de vacunación en los animales de aquellos debidos a la infección. Los títulos estimados mediante esta técnica no se desvanecen conforme avanza la enfermedad o se hace más crónica, generando así una sensibilidad del 89% y especificidad diagnóstica del 83,5% además recientes análisis de laboratorio han permitido una mayor eficiencia y velocidad para realizar esta prueba y es considerada actualmente como una de las pruebas definitivas para la confirmación de la enfermedad (Mejía Martínez y Lemus Flores., 2012).

3.6.2.3. Ensayo por inmunoaglutinación ligado a enzimas (ELISA)

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) son procesos en los cuales se utilizan enzimas como marcadores para identificar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. La gran mayoría de las pruebas ELISA requieren de un paso de separación del conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado (Guzmán., 2004).

La interacción entre los anticuerpos y los antígenos puede ser evaluada mediante pruebas *in vitro* dentro de este método se encuentra la ELISA debido a su



sensibilidad y especificidad diagnóstica es la técnica de mayor elección además que con ella se puede procesar el mismo un número pequeño de muestras así como un número grande sin correr los riesgos de errores de procedimiento y análisis (Felipe y Azze., 2012).

Esta prueba se clasifica en ELISA directa y ELISA indirectas, el principio de la segunda es que los antígenos capturan a los anticuerpos y la reacción se evidencia por la formación del conjugado antiinmunoglobulina-enzima. La cantidad de conjugado formado indica la cantidad de anticuerpos en el suero, no obstante se debe considerar que la correlación se ve afectada por la baja cantidad de anticuerpos o por la poca afinidad de los anticuerpos. Este método de detección es utilizado para detectar anticuerpos de clase IgG o IgA (Zambrano y Pérez., 2015).

3.6.2.4. Rosa de Bengala.

Es una prueba de carácter cualitativo más no cuantitativo, es un procedimiento de aglutinación rápida macroscópica que detecta inmunoglobulina de tipo G1, es importante el antígeno reúna las cualidades necesarias para evitar que los resultados puedan dar falsos positivos o negativos, si bien en un inicio la prueba fue destinada para suero de porcinos posteriormente se modificó el antígeno para poderlo aplicar en bovinos y otras especies (Fernandez., 2007).

El uso de la rosa de bengala asociada a otras pruebas complementarias permite su aplicación como prueba calificativa de diagnóstico y vigilancia epidemiológica en áreas libres de brucelosis, siempre y cuando se pueda confirmar con pruebas como ELISA competitiva y fijación de complemento todo esto acompañado de material, técnica y personal adecuado con la finalidad de evitar errores no programados (Morera y Andrade., 2004).

3.7. Prevención.

Así como en todas las enfermedades la mejor forma de controlar y erradicar el problema del predio es mediante la vacunación, que permite una protección contra



la infección, una disminución de los riesgos de infección, abortos y la difusión de la enfermedad.

3.7.1. Vacuna con cepa S19 de *B. abortus*.

Esta cepa ha servido de base para los programas de erradicación de la enfermedad en una gran cantidad de países, es un cultivo vivo de brucellas, en cada dosis se encuentran un aproximado de 60×10^9 unidades formadoras de colonias (CFU) que se presentan comercialmente en forma liofilizada es decir que contiene microorganismos atenuados de morfología lisa, que tiene una delección en dos de los genes del operón *ery* que participa en el catabolismo del eritritol. Esta vacuna es de baja virulencia, relativamente alta inmunogenicidad y buena antigenicidad (AGROCALIDAD., 2008; García A., 2013).

La vacuna se aplica en ternera de 3-6 meses de edad en una dosis de 2 ml, por vía subcutánea en la región de las tablas del cuello, existe varios factores que determinan la efectividad de la vacuna depende de varios factores como la edad del animal, dosis, vía de administración y la prevalencia de la brucelosis en el rebaño (Carbonell y col., 2016).

Entre las ventajas que presenta esta cepa es que requiere inoculación única en toda la vida, alcanza una respuesta inmunitaria rápida y no presenta reacciones locales. Y las desventajas es que presenta una reacción aglutinogénica, una infección patogénica ocasional persistente y requiere una cadena de frío rigurosa para su conservación (Casas Olascoaga., 2008).

3.7.2. Vacuna con cepa RB51 de *B. abortus*

Es una vacuna viva atenuada, que requiere revacunación y cuya virulencia se encuentra más atenuada que la cepa S19. El período que la vacuna sobrevive dentro del animal es importante para producir la inmunidad. Una vez eliminada la vacuna, la inmunidad empieza a disminuir lentamente. Para evitar esta disminución de la inmunidad se debe revacunar. La revacunación resulta en un efecto aditivo,



en otras palabras, la inmunidad sobrepasa al nivel obtenido con la primera vacunación y su duración es más larga. Como RB51 no produce complicaciones diagnósticas, la revacunación se puede hacer a cualquier edad. La vacuna se desarrolló a partir de la cepa lisa S-2308, para obtenerse la mutante RB51, que es una cepa rugosa estable de *B. abortus*, carente de la cadena "O" de LPS. Se aplica subcutánea entre los 4 a 12 meses de edad con revacunaciones anuales y tiene la ventaja que los animales resultan negativos a pruebas serológicas de diagnóstico (Ernesto y Elvinger., 2009).

3.8. Antecedentes

La brucelosis es de gran importancia económica y de la salud pública razón por la cual, a nivel mundial se han tomado medidas de control y erradicación, donde, el diagnóstico rápido efectivo y el sacrificio controlado de los animales seropositivos han sido los métodos de control más eficientes además de programas de motivación hacia los ganaderos. Sin embargo, en países en vías de desarrollo, existen factores que no permiten el avance en el control y erradicación de esta enfermedad como el escaso número de pruebas eficaces para el diagnóstico, falta de políticas de control y el conocimiento de las mismas (Ibarra Rosero., 2013).

Si bien los prueba de diagnóstico tienen importantes aplicaciones en la medicina veterinaria poblacional, así como en actividades de vigilancia y certificación de predios libre de esta enfermedad se debe considerar estrategias para la implementación de un sistema de vigilancia que nos permita analizar la evolución del programa y a su vez detectar de forma rápida el ingreso de esta enfermedad al hato ganadero (Maldonado y col., 2010).

Por ello, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como reguladora de los procesos de diagnóstico, control de brucelosis y otras enfermedades infecciosas aprueba seis exámenes indirectos para su diagnóstico oficial: la prueba de Aglutinación en placa con antígeno tamponado, Rosa de Bengala, Fluorescencia polarizada, ELISA indirecto, Fijación del complemento y ELISA competitivo. Las



cuatro primeras son consideradas pruebas tamiz y las otras confirmatorias (Diaz 2016).

El fundamento principal para la acción de las pruebas de ELISA de carácter indirecto ya sea en sangre o leche es el mismo con la única diferencia es en la forma de obtener la muestra ya que a diferencia de la sangre que muchas veces requieren aditivos para el transporte y además para el análisis deben ser muestras individuales de cada animal. En cambio la leche no requiere de aditivos para su transporte y almacenamiento además que la muestra puede ser de un gran número de animales (Motta Delgado y col., 2018; Pool y col., 2004).

En esta técnica, los antígenos de la muestra se fijan por adsorción pasiva a una superficie inerte. Seguidamente, se añaden los anticuerpos específicos que al reconocer al antígeno quedan unidos a él. Después de un lavado que elimina las moléculas que no han reaccionado, aquellos anticuerpos que han quedado unidos al antígeno fijado a la placa se detectan por un segundo anticuerpo marcado con una enzima. Se lava de nuevo la placa, y se añade a continuación el sustrato de la enzima, y ambos al reaccionar producen un compuesto coloreado. La intensidad de color que se produce en la reacción es proporcional a la concentración del antígeno de la muestra (Fernandez., 2007; Gómez., 2005).

Dentro de las pruebas indirectas que se han desarrollado y validado para el análisis de brucelosis en leche se encuentran: la prueba de anillo de leche (PAL), ELISA indirecta en leche (ELISA-i) y la prueba de fluorescencia polarizada en leche (mFPA) éstas son las pruebas más utilizadas por los productores de leche y carne en la mayoría de las ganaderías a nivel mundial.

A pesar de la alta sensibilidad y especificidad diagnóstica de estas pruebas existen ciertos factores que pueden interferir con los resultados como: muestras de calostro, dilución de la muestra de leche, periodo de lactancia y leche proveniente de animales vacunados, a pesar de que la prueba de ELISA-i fue desarrollada para superar las dificultades de la prueba PAL ésta no puede discriminar entre



anticuerpos vacúnales o los generados por cepas patógenas (Mejía y Lemus., 2012).

Es por ello que se sugiere la utilización de ELISA-i como prueba tamiz de elevada sensibilidad con respecto a la Rosa de bengala (RB) y de ELISA competitivo y la prueba de Fijación de completo (FC) como prueba confirmatoria y diferencial del estatus vacunal de los animales positivos en las pruebas indirectas (Franceschini y col., 2009).

En el Ecuador la brucelosis es una enfermedad endémica por ello la agencia Ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del Agro lanzó un proyecto para disminuir el número de animales infectados utilizando como estrategias: la capacitación, vacunación, vigilancia epidemiológica con serología y el sacrificio de animales seropositivos (AGROCALIDAD., 2016).

3.9. Epidemiología espacial.

El uso de mapas en relación a la salud no es reciente ya que se tiene datos de la ubicación de los casos de fiebre amarilla en 1789 por Seamon y Pascalis en Nueva York y después en 1854, John Snow realizó un mapa para ubicar las muertes por cólera en Londres, pero no fue hasta fines del siglo XVII donde los científicos creían que vivir cerca de las personas enfermas tenía una relación causal con el desarrollo y propagación de las enfermedades y por lo tanto mapear la ubicación de los casos ayudaría al control de las mismas es por ello que durante el siglo XIX hubo una inmensa cooperación entre los geógrafos y epidemiólogos o médicos para georeferenciar (Alves y col., 2010; Soler y col., 2017).

Pero a finales del siglo XIX existió un declive debido a que el espacio geográfico era visto solo como el espacio en donde ocurría los actos y no como influían los factores en la presencia de estos actos, hasta finales del siglo XX en donde se empieza la era de las enfermedades crónicas y la teoría de los factores de riesgo, fue una época en donde la conducta y el estilo de vida eran factores directos para la ocurrencia de las enfermedades (Adamu y col., 2016).



La incorporación de la perspectiva espacial a la salud ha conllevado grandes contribuciones a la comprensión de los procesos de salud-enfermedad y esto puede llevar a diferentes variaciones en los resultados de aquellos obtenidos en los estudios que no se consideran el espacio geográfico. Para esto se ha implementado los sistemas de información geográfica (SIG) estos son sistemas computarizados de gestión de base de datos diseñados para el tratamiento simultaneo de datos espaciales y sus características asociadas (FAO., 2005).

La perspectiva espacial fue aplicada desde siempre mediante la superposición de copias de diferentes mapas buscando las áreas de coincidencia de los factores, pero con el avance de las computadoras ha permitido la articulación de sistemas gráficos y la elaboración de automatizada de datos espaciales, para ello los datos deben estar referidos en una localización terrestre usando la codificación numérica ordinal o nominal, con estos códigos las localizaciones son transformadas en coordenadas de algún sistema de referencia geográfica (FAO., 2005).

Los sistemas de coordenadas más utilizados son latitud y longitud, UTM (Universal Transverso de Mercator) y SPC (State Plane Coordinate System, todo esto mediante diferentes softwares que hoy en día pueden ser adaptados y compartidos desde diferentes dispositivos electrónicos (Alonso Sarría., 2006).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Área de estudio

El presente proyecto se realizó los cantones Cuenca, Nabón y Oña pertenecientes a la provincia del Azuay, situada en el sur del país, en la zona geográfica conocida como región interandina o sierra, principalmente sobre la hoya de Paute en el noreste y la hoya de Jubones en el suroccidente. Su capital administrativa es la ciudad de Cuenca, la cual además es su urbe más grande y poblada. Ocupa un territorio de unos 8.639 km², siendo la duodécima provincia del país por extensión. Limita al norte con Cañar, al sur con Loja, por el occidente con Guayas, al suroccidente con El Oro, al este con Morona Santiago y al sureste con Zamora Chinchipe. (Figura 1).

Figura 1. División geográfica de la provincia del Azuay (CUENCA Ilustre., 2018).



En la presente investigación se analizaron muestras de leche procedentes de las ganaderías de la empresa PARMALAT ubicada en la ciudad de Cuenca, dicha empresa cuenta con un total de 153 ganaderos distribuidos en 3 Cantones con 5 rutas de recolección y 2 sub rutas de abastecimiento.



En el cantón Cuenca se encuentran 60 productores con 2 rutas de recolección.

En el cantón Nabón se encuentran 73 productores con 2 rutas de recolección y 2 sub rutas de abastecimiento.

El cantón Oña cuenta con 20 productores y una ruta de recolección.

4.2. Georeferenciación

4.2.1. Materiales de trabajo.

- Softwares
- Teléfono móvil.

4.2.2. Procedimiento

Se procedió a viajar conjuntamente con los recolectores de acuerdo a la ruta establecida para cada uno de ellos, una vez que se llegaba al sitio de recolección de la leche se realizó la encuesta digital al productor en donde se obtenía los datos básicos de la finca, el manejo de la misma, información de las variables a analizar y las coordenadas del sitio; para ello previamente se registró ésta encuesta en la plataforma del programa Survey 123 for ArcGIS para posterior ser descargada al teléfono móvil, esto se realizó en cada una de las rutas y de forma individual a cada uno de los productores. Para ello previamente se capacitó he informo a los ganaderos sobre la el objetivo del proyecto riesgos de la enfermedad y el beneficio que obtendrían cada uno de ellos (**Anexo 1**).

Una vez obtenida la información de todos los ganaderos se subió los datos a la plataforma central en donde se adquiere una base de datos lista para analizar y además se puede observar la ubicación geográfica de todos los sitios en donde se realizó las encuestas. Para luego realizado el análisis de las muestras y obtener los resultados de positividad se pudo identificar en el mapa la ubicación de los mismos.



4.3. Toma de muestras de leche.

4.3.1 Materiales

- Muestras de leche cruda
- Alcohol al 70%
- Agitador
- Cucharon
- Envases estériles
- Guantes de látex
- Beaker
- Cooler
- Gel refrigerante
- Marcador

4.3.2. Procedimiento de la toma de muestras de leche.

Al igual que para la realizar las encuestas se viajó conjuntamente con los recolectores hacia los sitios de recolección de la leche .Una vez que se llegó a los sitios se preparó y desinfecto los materiales a utilizar. Para luego proceder a introducir el agitador hasta el fondo de los tanques y levantándolo para formar movimiento y homogenizar la leche por 30 segundos. Para extraer la muestra se introdujo el cucharón dos veces en la leche volcando el contenido dentro del mismo tacho y obtener la muestra de 100 ml de leche **(Anexo 2)**.

En los casos en donde existía varios tanques de entrega, una vez homogenizados todos, se tomó una porción uniforme de cada recipiente y se los depositó en el beaker hasta completar 1000 ml de los cuales se adquirió una muestra de 100 ml en los envases estériles para luego, colocarlos en el cooler a una temperatura de 2 °C a 8°C y ser llevadas al laboratorio. Al realizarse los análisis en muestras frescas no se adicione ningún conservante a la leche **(Anexo 3)**.



4.4. Ensayo de ELISA-i

4.4.1. Materiales

- Lacto suero de leche
- Tubos de ensayo
- Centrifuga
- Kit Brucellosis Milk Indirect (ID.Vet)
- Incubadora
- Espectrofotómetro de placas
- Computadora

4.4.2. Procedimiento del ensayo de ELISA-i

Para el ensayo de ELISA se procedió a depositar 5 ml de leche en el tubo de ensayo identificarlo y centrifugarlo a 15000 revoluciones por minuto durante 30 min, para obtén el lacto suero de cada muestra. Mientras tanto se atempero los reactivos y las microplacas a temperatura ambiente de 10 °C a 15°C (**Anexo 4**).

Para luego a depositar 100 µl de solución de control negativo en los pocillos A1-B1 y 100 µl de solución de control positivo en los pocillos C1–D1, así también se depositaron 100 µl de lactosuero desde el pocillo E1 hasta completar las distintas columnas de acuerdo al número de muestras las mismas que fueron puestas en incubación a 21°C por 45 minutos (**Anexo 5**).

Se preparó la solución de lavado para ello fue necesario equilibrar la solución de lavado concentrado (20X), a temperatura ambiente y agitar correctamente para disolver los cristales que suelen formarse. Una vez disueltos se realizó una dilución 1:20 con agua destilada para obtener la solución de lavado (1X).

Transcurrido los 45 minutos se realizó el lavado de los pocillos con 300 µl de solución de lavado (1X), en cada pocillo este procedimiento se realiza por tres veces con intervalos de 2 a 5 minutos entre lavado evitando que exista depósitos de grasa o restos de lactosuero. Posterior a los lavados se depositó 100 µl de Conjugado



(1X) en todos los pocillos este conjugado se preparó diluyendo el conjugado concentrado (10X) al 1:10 en diluyente 3 y se incubó por 30 minutos a 21°C (**Anexo 5**).

Transcurrido los 30 minutos se realizó nuevamente el lavado con 300 µl de solución (1X) repitiendo el proceso por 3 veces con intervalo de 2 a 5 minutos entre lavado. Después se distribuyó 100 µl de Solución de revelación en cada pocillo y se incubó por 15 minutos (**Anexo 6**).

Finalmente transcurrido los 15 minutos de incubación se deposita 100µl de Solución de parada y se lleva al espectrofotómetro de placas para su lectura.

4.5. Validación del proceso de ELISA-i

Para que el test fuese validado: El valor medio de la densidad óptica de los controles positivos (DO_{CP}) debió ser superior a 0.350 de densidad óptica.

$$DO_{cp} > 0.350$$

El cociente entre la medida de los controles positivos (DO_{CP}) y la media de los controles negativos (DO_{CN}) debió ser superior a 3.

$$\frac{DO_{CP}}{DO_{CN}} > 3$$

Para la interpretación de resultados, se calculó el porcentaje S/P

$$\% \frac{S}{P} = \frac{DO_{muestras} - DO_{CN}}{DO_{CP} - DO_{CN}} \times 100$$

Las muestras que presentaron un S/P%

- Inferior o igual al 45% fueron consideradas como NEGATIVAS
- Superior a 45% e inferior o igual a 50% fueron consideradas como DUDOSAS
- Superior a 50% fueron consideradas como POSITIVAS.



4.6. Métodos estadísticos.

Para mostrar los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos en suero de leche cruda de muestras obtenidas en fincas del Azuay, se realizó una estadística descriptiva adecuada a los tipos de variables implicadas para evidenciar el comportamiento de los datos generados.

Para analizar el número de fincas positivas en relación al número total de la población se utilizó una tabla frecuencias mediante la frecuencia absoluta expresándolos también mediante un gráfico de pastel y para analizar la probabilidad de que se presente los casos se utilizó la frecuencia relativa, mediante las tablas de contingencia se demuestra la asociación entre los casos positivos y cada uno de los factores de riesgo para ello se utilizó la prueba de Chi-cuadrado. Se consideró un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$) para cada una de las pruebas. Este análisis se realizó en el programa estadístico SPSS versión 22.0.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Ensayo Elisa

Una vez realizado el ensayo de ELISA indirecta de las muestras de leche y posterior a la lectura, el software nos brinda la densidad óptica de cada pocillo que se pueden observar en la (**Tabla.1**) éstos valores nos permitirá realizar los cálculos para la validación del ensayo y la interpretación de cada uno de los resultados, se puede observar también que el resultado de algunas muestras son OVRFLW (Overflow) esto quiere decir que la absorbancia de la muestra excede la del estándar más alto en su curva de calibración (Gómez., 2005).

Tabla 1. Densidad óptica de muestras de leche correspondiente a la ruta del cantón Oña y Nabòn.

	1	2	3	4	5	6
A	0,069	0,094	0,106	OVRFLW	0,077	0,086
B	0,071	0,091	0,148	0,09	0,073	0,083
C	0,535	0,083	0,084	0,086	0,092	0,092
D	0,5	1,832	0,088	OVRFLW	0,077	0,087
E	0,093	0,103	0,106	0,75	0,073	0,07
F	0,11	0,08	0,084	0,075	0,147	0,134
G	0,107	OVRFLW	0,071	0,083	0,08	0,075
H	0,218	0,083	0,088	0,167	0,091	OVRFLW

OVRFLW (el valor de la muestra excede el estándar más alto en la curva de calibración del lector de placas)

En la Tabla 2 se puede observar los porcentajes de seropositividad de las muestras analizadas, estos porcentajes se obtuvieron a partir de los valores de la densidad óptica (Tabla .1) obtenidos al realizar la lectura de la placa de ELISA.

Tabla 2. Porcentajes de seropositividad de muestras de leche correspondiente a la ruta del cantón Oña y Nabón.

%SP	1	2	3	4	5	6
A	-0,223	5,363	8,045	OVRFLW	1,564	3,575
B	0,223	4,693	17,430	4,469	0,670	2,905
C	103,911	2,905	3,128	3,575	4,916	4,916
D	96,089	393,743	4,022	OVRFLW	1,564	3,799
E	5,140	7,374	8,045	151,955	0,670	0,000
F	8,939	2,235	3,128	1,117	17,207	14,302
G	8,268	OVRFLW	0,223	2,905	2,235	1,117
H	33,073	2,905	4,022	21,676	4,693	OVRFLW

OVRFLW (el valor de la muestra excede el estándar más alto en la curva de calibración del lector de placas)

Una vez que la prueba fue validada, con la ayuda del programa estadístico Excel y con los parámetros establecidos por el Kit se puede determinar que el porcentaje de seropositividad de los pocillos D2-G2-A4-D4-E4-H6 es superior al 50% por ello son consideradas muestras positivas.

5.2 Frecuencia de muestras seropositivas.

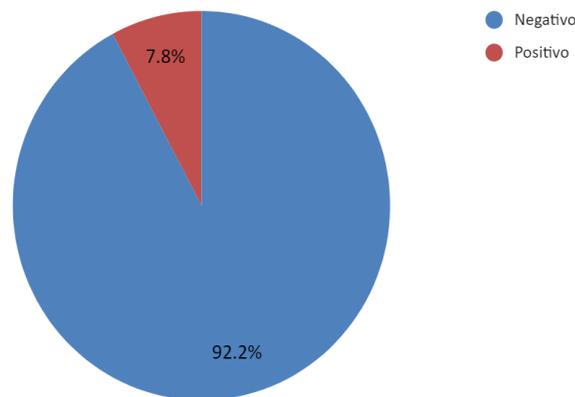
De acuerdo a la distribución de los resultados obtenidos mediante la utilización del ensayo ELISA indirecto en leche para la detección de anticuerpos frente a Brucelosis el resultado del análisis estadístico con las tablas de frecuencias nos muestran que de 153 ganaderías estudiadas se encontró un total de 12 fincas positivas y 141 negativas (**Tabla 3**).

Tabla 3. Frecuencias de positivos obtenidos con la aplicación del ensayo ELISA indirecto en leche.

Resultado	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	141	92.20%
Positivo	12	7.80%
Total	153	100.00%

La frecuencia relativa de los casos positivos a Brucelosis en leche recolectada de distintas fincas en la provincia del Azuay corresponde a un 7.8% de las fincas total estudiada es decir de las 153 ganaderías 12 resultaron positivas. En un estudio similar realizado por (González, 2018) en el cantón Eloy Alfaro, provincia de Esmeraldas en donde analizó 40 fincas productoras de leche mediante la misma técnica, en donde se pudo observar un 62.5% de positivos. Así también (Vergara Collazos y col. 2008) en el municipio de Popayán Cauca, Colombia obtuvieron una positividad de 15% de un total de 247 muestras. Esto demuestra la funcionalidad de la prueba y que el porcentaje de positivos va a depender del número de muestras y la región en donde se realice el muestreo.

Figura 2. . Resultado de la prueba de ELISA-i en leche para detección de anticuerpos de *B. abortus* en 153 muestras

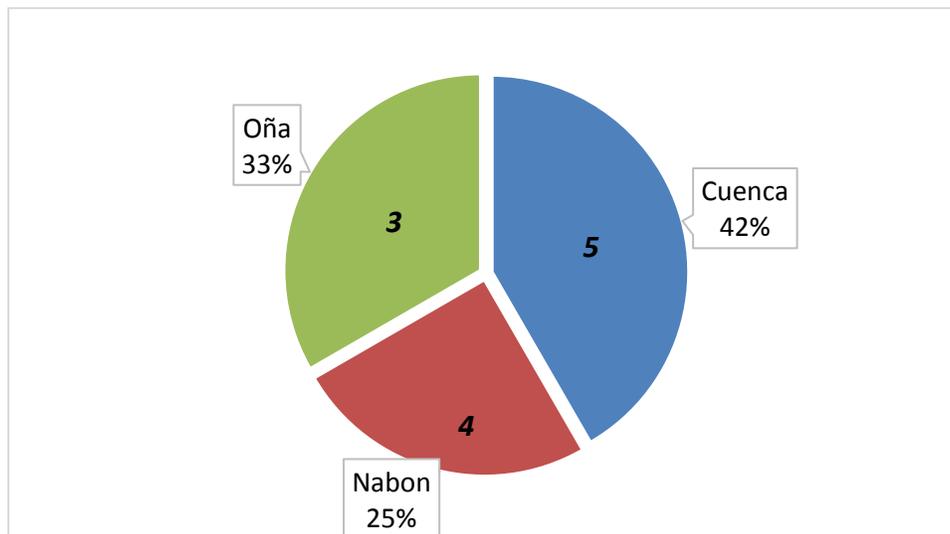


La frecuencia de presentación de casos positivos en las distintas zonas del Azuay es de un 7.8. % lo que se puede interpretar que de cada 100 fincas en el Azuay existe un total de 8 ganaderías positivas a brucelosis mediante la prueba de ELISA indirecta en leche. Al ser una prueba relativamente nueva y poco aplicada no se encuentra datos recientes de comparación a nivel provincial y nacional, cabe indicar que existe estudios realizados en el año 1979 por PNSA – MAG esto según (AGROCALIDAD., 2008) en donde fue 0.29-1.71 % de prevalencia en el Azuay pero cabe recalcar que este porcentaje es basado en un análisis de 754 muestras

mediante Rosa de Bengala y en un estudio similar realizado en la provincia del Cañar por (Mainato., 2017) utilizando la misma prueba de Rosa Bengala en donde obtuvo un 4.25 % de seroprevalencia . Esto nos permite indicar que el porcentaje de prevalencia va a depender de la zona, el año en que se realice el muestreo y de la representación estadística.

Pero se debe tomar en consideración que (Ibarra Rosero., 2013) obtuvo un 99.25 % de sensibilidad y un 94.92 % de especificidad para la prueba de ELISA indirecto en leche en el estudio realizado en el norte de Ecuador y algo similar obtenido por (Rivera y col., 2003) en el departamento de Cundinamarca Colombia con una sensibilidad del 95.3% y una especificidad del 95% por lo que nos permite confiar más en la prueba y reducir este factor en la conmutación de valores de prevalencia de brucelosis en el estudio de una región.

Figura 3. Distribución de los resultados seropositivos en los cantones.



Los 12 resultados seropositivos se encuentran distribuidos en los tres cantones de la provincia siendo el cantón Cuenca con el mayor número de caso con un total de 5 fincas seropositivas que representa un 42% de los resultados así también el cantón Oña es el que menos casos presenta con 3 fincas seropositivas que representa un 33% .

5.3. Análisis de relación entre factores y seropositividad de la prueba.

Tabla 4. Número de casos en relación a las variables de la procedencia de agua para el consumo.

Tipo de procedencia del agua de consumo	Resultado				Total
	Negativo		Positivo		
	Cantidad	Porcentaje	Cantidad	Porcentaje	
Acequia	75	90.36%	8	9.64%	83
Acequia, Pozo	6	85.71%	1	14.29%	7
Acequia, Río	3	100.00%	0	0.00%	3
Pozo	30	90.91%	3	9.09%	33
Río	27	100.00%	0	0.00%	27
Total	141	92.16%	12	7.84%	153

Dentro del factor de procedencia del agua para consumo se encuentran las variables si su origen proviene directamente de acequias, pozo, río o si se obtenía el agua de dos lugares simultáneamente en donde se pudo observar un mayor número de fincas que obtenía el agua de acequias y así también en las mismas fue en donde se presentó el mayor número de casos positivos (**Tabla 4**), por ello se realizó la prueba de asociación para determinar si existe una relación entre el factor y la frecuencia de casos ya que (Ibarra y Salgado., 2016; Paredes.,2012) manifiestan que entre los principales factores de riesgo para la transición de la Brucelosis se encuentra el ingreso por vía oral ya sea por el consumo de alimento contaminado o por el agua de consumo en especial cuando la misma recorre varios predios hasta llegar hacia los animales.

Tabla 5. Análisis de la prueba de Chi-Cuadrado en relación a la procedencia del agua de consumo.

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3,396a	4	0,494
Razón de verosimilitud	5,645	4	0,227
N de casos válidos	153		

5 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 0,24.

Los resultados obtenidos de la prueba de Chi cuadrado para el estudio de la correlación entre la variable y frecuencia de seropositividad nos muestran que no existe relación estadísticamente significativa entre la procedencia del agua y la frecuencia de seropositividad con un valor de $p < 0,05$; así como se muestra en la (**Tabla 5**). A pesar que (Díaz Aparicio., 2013; Zambrano y Pérez., 2015) mencionan que el agua es uno de las principales fuentes de transmisión de la enfermedad en especial cuando existe un incorrecto desecho de los restos fetales producidos por abortos en el predio y fincas aledañas. Además este factor debe ser tomado en consideración no sólo para la transmisión de la bacteria entre bovinos ya que el agua puede ser un factor de transmisión hacia otras especies incluidas al hombre esto según (Agudelo y col., 2012).

Tabla 6. Número de casos en relación a las variables de la procedencia de animales de reemplazo.

Tipo de procedencia de animales de reemplazo.	Negativo		Positivo		Total
	Cantidad	Porcentaje	Cantidad	Porcentaje	
Ferías de la provincia	6	75.00%	2	25.00%	8
Ferías fuera de la provincia	5	71.43%	2	28.57%	7
Propios	111	94.87%	6	5.13%	117



Propios, Ferias de la provincia	8	88.89%	1	11.11%	9
Propios, Ferias fuera de provincia	11	91.67%	1	8.33%	12
Total	141	92.16%	12	7.84%	153

Dentro del factor de procedencia de los animales de reemplazo se encuentran las variables si su origen proviene de ferias de la provincia, ferias fuera de la provincia, si los animales son propios y si provienen de dos lugares simultáneamente en donde se pudo observar un mayor número de fincas que obtenía a los animales de reemplazo de su propia finca y así también en las mismas fue en donde se presentó el mayor número de casos positivos a diferencia de los predios en donde los animales procedían tanto de ferias de la provincia y propios como de fuera de la provincia y propios se observó una menor frecuencia de casos (**Tabla 6.**).

Sin embargo, si se hace un análisis de los casos positivos respecto al tipo de procedencia de animales de reemplazo, se observa que un mayor porcentaje de casos positivos se da cuando la procedencia de animales de reemplazo es de Ferias de la provincia o de ferias de fuera de la provincia.

Si bien es conocido que los animales sexualmente maduros son los más propensos a adquirir la enfermedad debido al mayor contacto sexual que existe entre estos y a diseminarla esto no impide que los animales jóvenes sean medio de ingreso de la enfermedad hacia las fincas, en especial cuando se desconoce la procedencia de los mismos esto según (Díaz., 2016; Román y col., 2014).

Además (Martínez y col., 2018) menciona que la movilización de ganado de una región hacia otra genera grandes oportunidades para la que una enfermedad que es considerada exótica en la zona llegue a diseminarse con gran rapidez, así como también (Muñoz., 2014) menciona que el traslado incontrolado de bovinos desde un hato o zona con presencia de la enfermedad hacia otra es una de las causantes principales para el fallo en los programas de erradicación de la brucelosis por ello para determinar si existe una relación entre el factor y la frecuencia de casos en este estudio se realizó la prueba de asociación.

Tabla 7. Análisis de la prueba de Chi-Cuadrado en relación a la procedencia de los animales de reemplazo.

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8,749a	4	0.0068
Razón de verosimilitud	6,258	4	0.18
N de casos válidos	153		
4 casillas (40,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,55.			

Los resultados obtenidos de la prueba de Chi cuadrado para el estudio de la correlación entre la variable y frecuencia de seropositividad nos muestran que existe relación estadísticamente significativa entre la procedencia de los animales de reemplazo y la frecuencia de seropositividad con un valor de $p < 0,05$; así como se muestra en la (**Tabla 7**). En un estudio epidemiológico realizado por (Zambrano, Pérez y Rodríguez .,2016) en Manabí Ecuador concluyeron que hay mayor riesgo a presentarse seropositividad en animales mayores a 5 años, fincas dedicadas a la producción de leche , en las que no se vacuna y en fincas que no investigan el estado sanitario de los animales de ingreso.

Además, (Obregón., 2020) manifiesta que en hatos grandes usualmente se mantiene por la introducción de animales de reemplazo generalmente novillas provenientes de distintas fuentes y que podrían estar en periodo de incubación aunque eso va a depender de la frecuencia de adquisición, la procedencia y el historial de los animales adquiridos. Asimismo (Martinez y col., 2018) sugiere que la densidad de población dentro de la finca va a permitir el mayor contagio entre animales adultos hacia los jóvenes favoreciendo así la permanencia de la enfermedad en la finca.

Tabla 8. Número de casos en relación a las variables del sistema de reproducción.

Tipo de sistema de reproducción.	Resultado				Total
	Negativo		Positivo		
	Cantidad	Porcentaje	Cantidad	Porcentaje	
Inseminación Artificial	37	86.05%	6	13.95%	43
Monta Natural	104	94.55%	6	5.45%	110
Total	141	92.16%	12	7.84%	153

Dentro del factor del sistema de reproducción se encuentran las variables si el sistema es mediante inseminación artificial o mediante monta natural en donde se pudo observar que un mayor número de fincas utilizan el sistema de monta natural. Sin embargo, cuando se analiza el sistema de reproducción artificial se evidencia que existe un mayor porcentaje de casos positivos, respecto a que cuando se analiza el sistema por monta natural (**Tabla 8.**).

Si bien (Paredes., 2012) menciona que el principal medio de transmisión es el contacto sexual con reproductores infectados que no pueden presentar síntomas o que provengan de otras fincas de la localidad. (Martinez y col., 2018) sugiere que el ingreso de la enfermedad al predio no siempre se da por la compra de hembras ya que la adquisición de reproductores sin la realización de pruebas puede ser este el principal medio de transmisión en el hato ya que el toro es el encargado de aportar el 50% del material genético dentro del todo el predio.

Además, (Ibarra Rosero., 2013; Rosero y col., 2018) mencionan que en relación a las prácticas de manejo del uso del semen o reproductores de hatos sin los chequeos serológicos respectivos hacen un factor de gran importancia en la transmisión de la enfermedad y (Diaz., 2016) menciona que si el toro donante es portador de la bacteria y si se le extrae semen, hay una posibilidad de que el semen sea un factor de transmisión debido a que el semen es depositado directamente en el útero saltándose las barrera natural de la vagina, este riesgo es mayor en sistemas de reproducción pequeños o asociaciones en donde se comparte un semental no certificado para toda la localidad. .

Tabla 9. Análisis de la prueba de Chi-Cuadrado en relación al sistema de reproducción.

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3,089a	1	0.079
Razón de verosimilitud	2,801	1	0.092
N de casos válidos	153		
1 casillas (25,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 3,37.			

Los resultados obtenidos de la prueba de Chi cuadrado para el estudio de la correlación entre la variable y frecuencia de seropositividad nos muestran que no existe relación estadísticamente significativa entre el sistema de reproducción y la frecuencia de seropositividad con un valor de $p < 0,05$; A pesar de existir un número igual de casos positivos en los dos sistemas. Así como se muestra en la (**Tabla 9**).

Si bien la transmisión por vía sexual es aceptada por varias literaturas según un estudio realizado por (Francisco y col., 2002) considera que este es un factor de baja relevancia anteponiendo factores como la presencia de restos fetales, presencia de perros la no eliminación de animales sospechosos y el orden de ordeño como los factores de mayor importancia.

Así también, en un estudio realizado por (S. Mainato, Guevara y Vallecillo., 2017) en la provincia de Cañar Ecuador mencionan que existe un mayor riesgo de presentarse seropositividad en animales que presentaron problemas de metritis postparto y animales con esterilidad permanente, además al constatar con el estudio realizado por (Ernesto y Elvinger.,2009) en ninguno de los dos es considerado el sistema de reproducción como un factor de alto riesgo para la presencia de la enfermedad.

Figura 4. Mapa de recorrido de la ruta Tarqui.

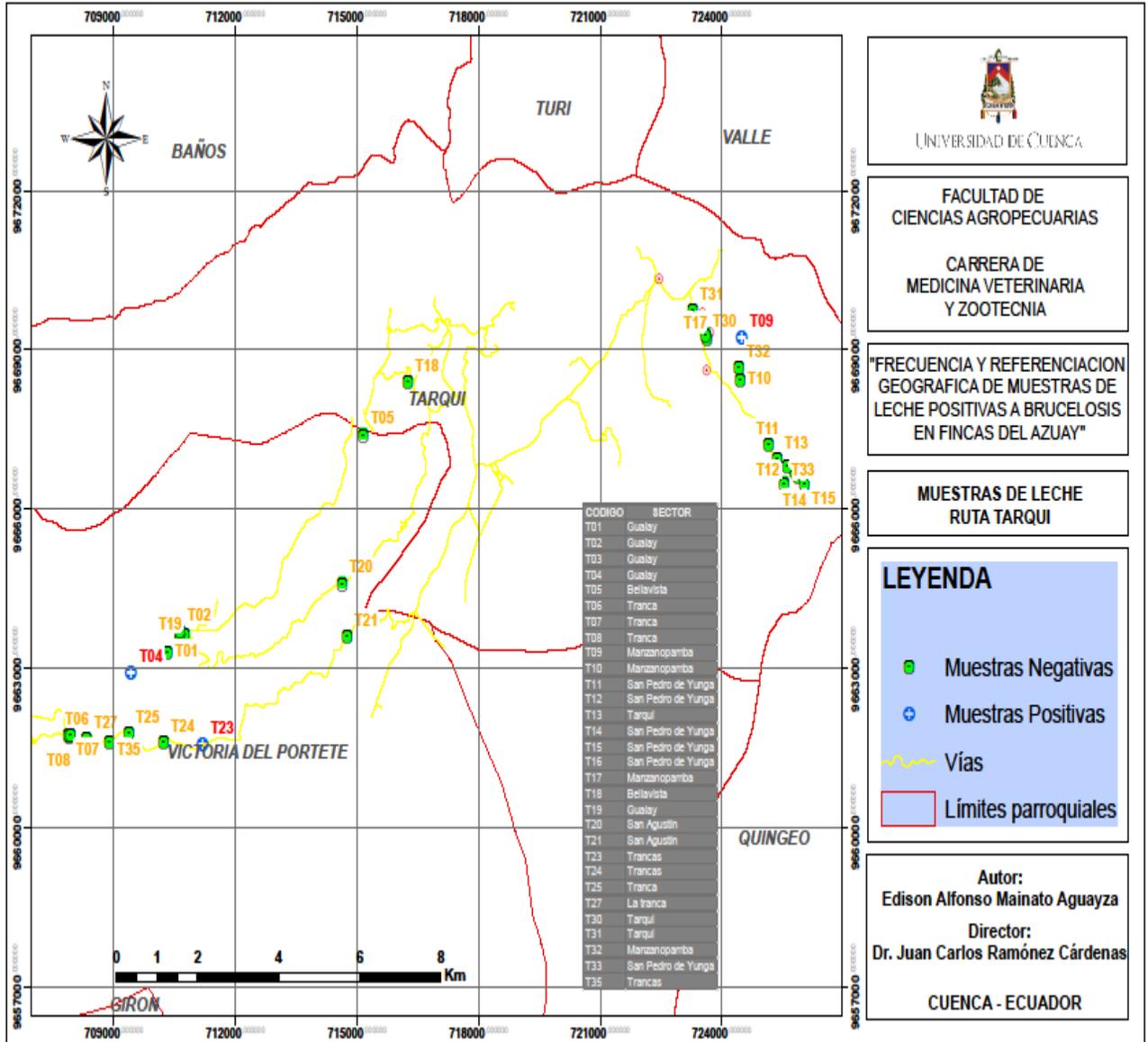


Figura 5. Mapa de recorrido de la ruta Soldados.

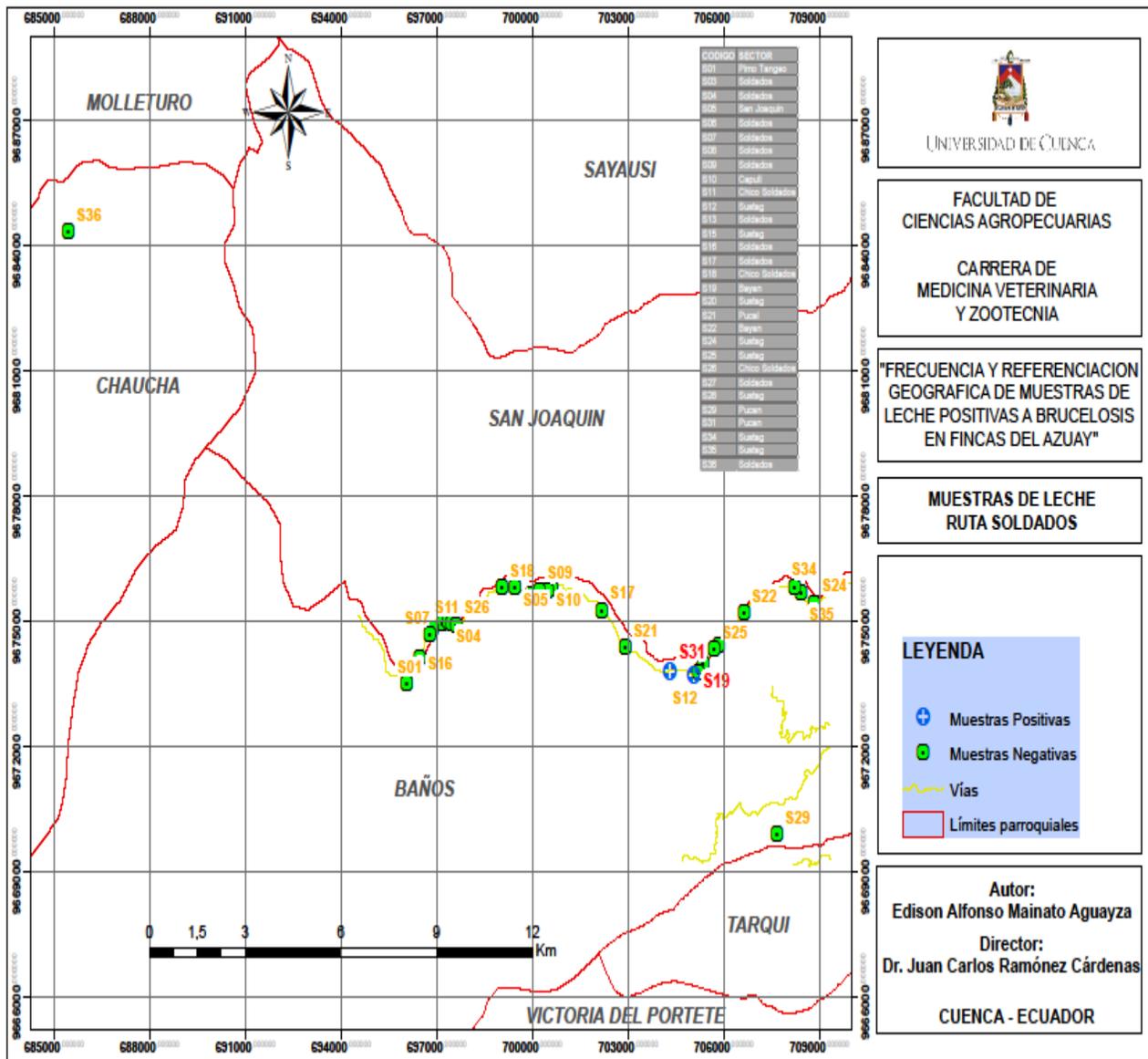


Figura 6. Mapa de recorrido de la ruta La Paz.

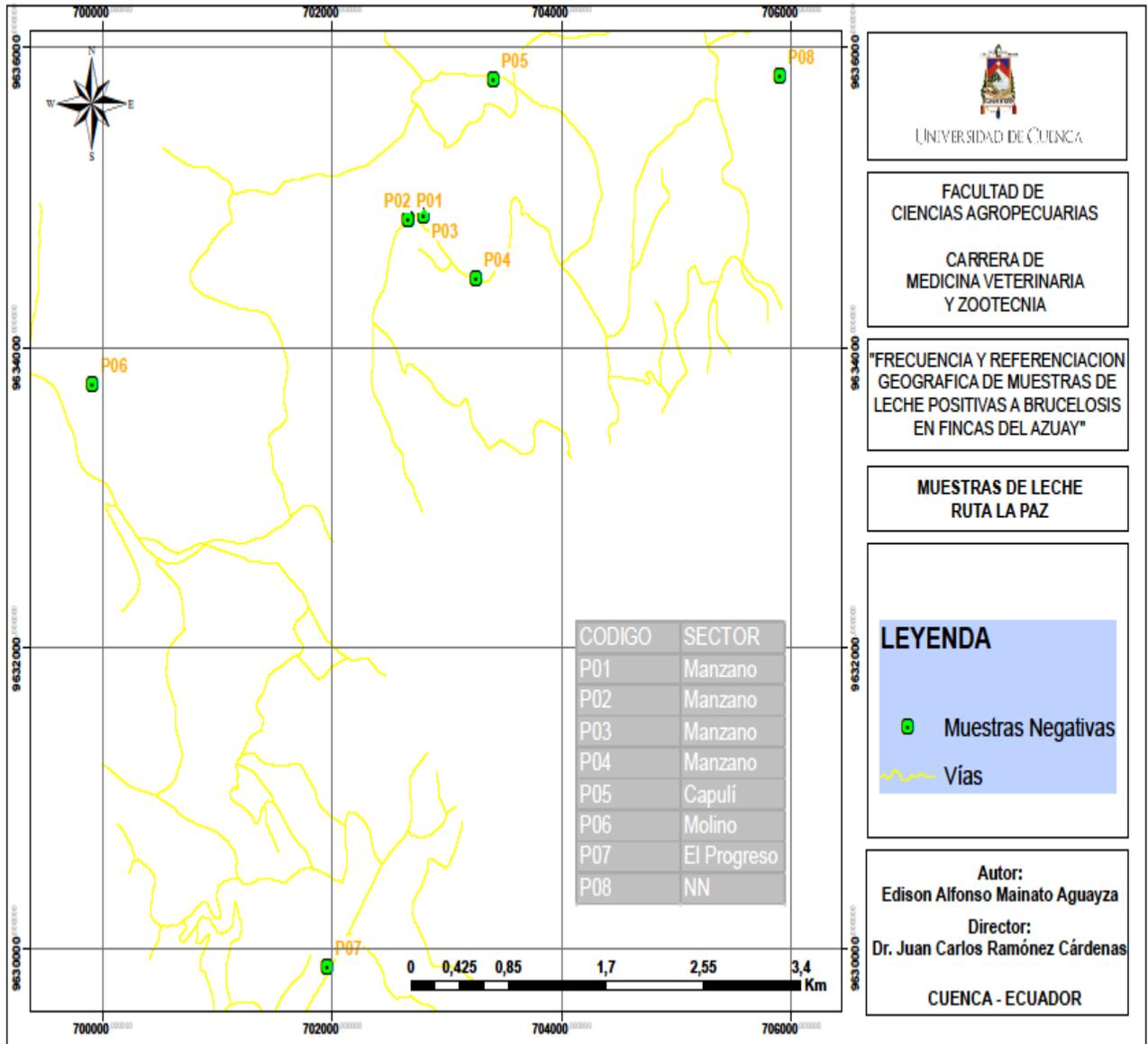


Figura 7. Mapa de recorrido de la ruta Oña.

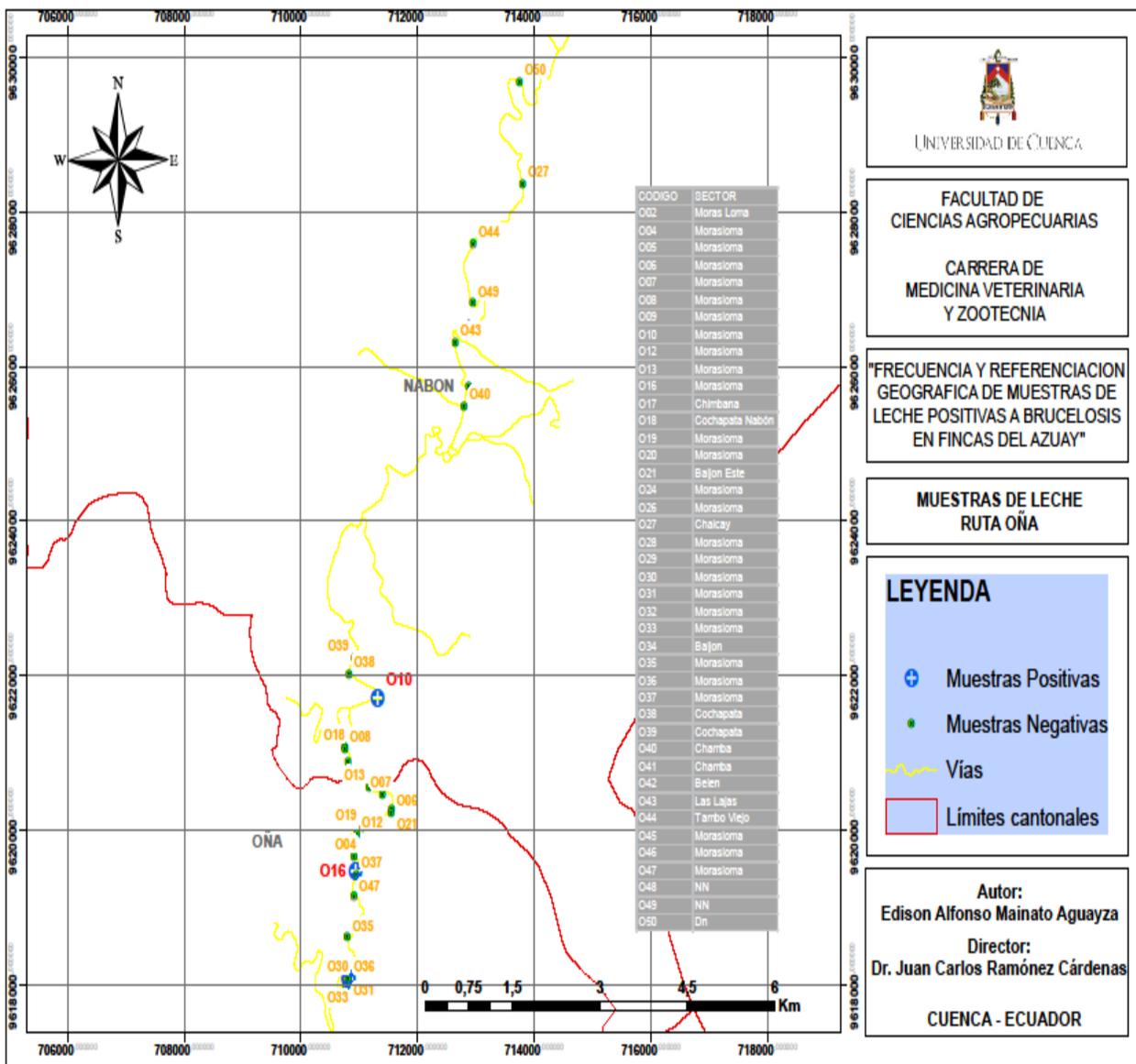


Figura 8. Mapa de recorrido de la ruta Nabón.

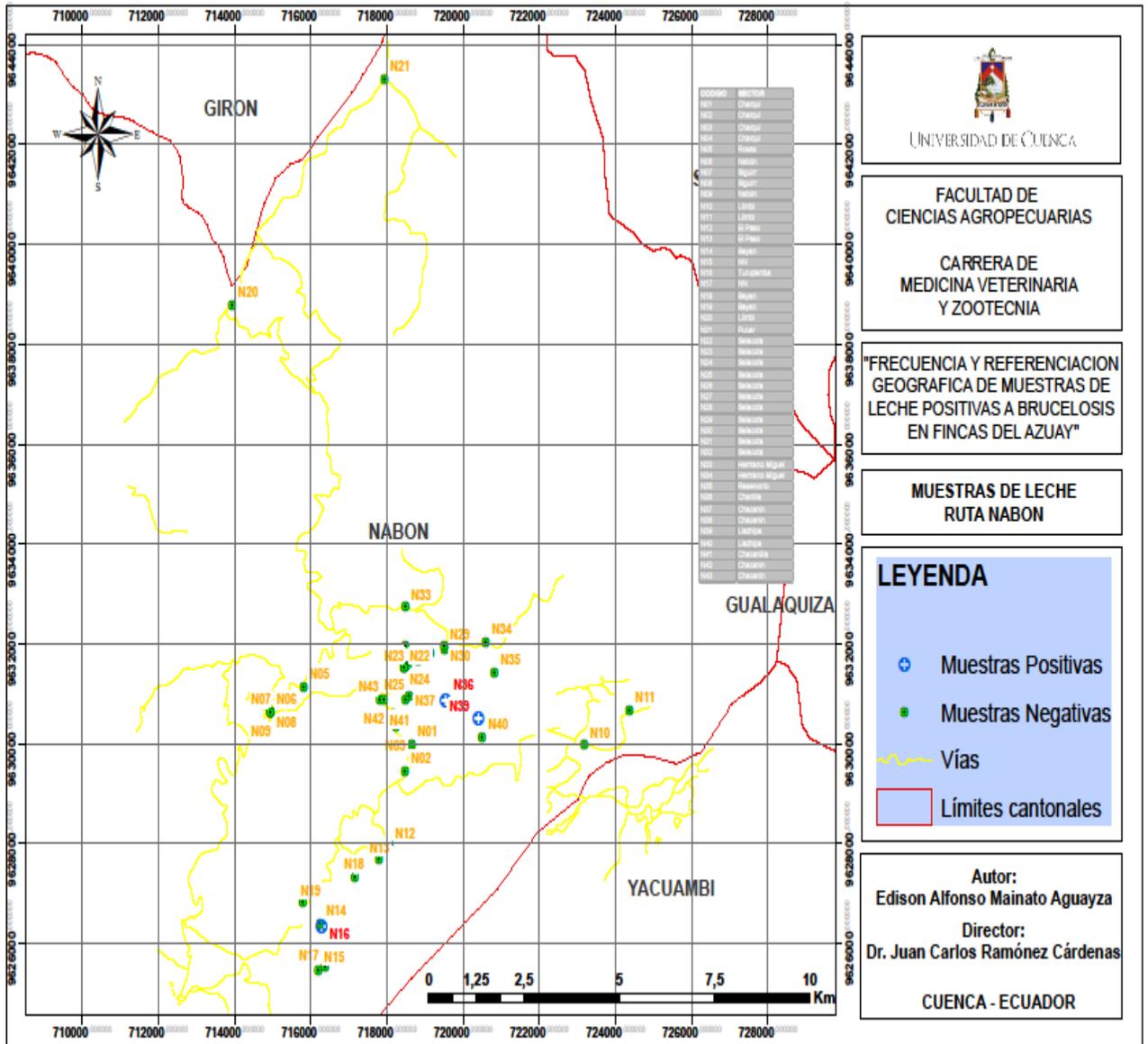
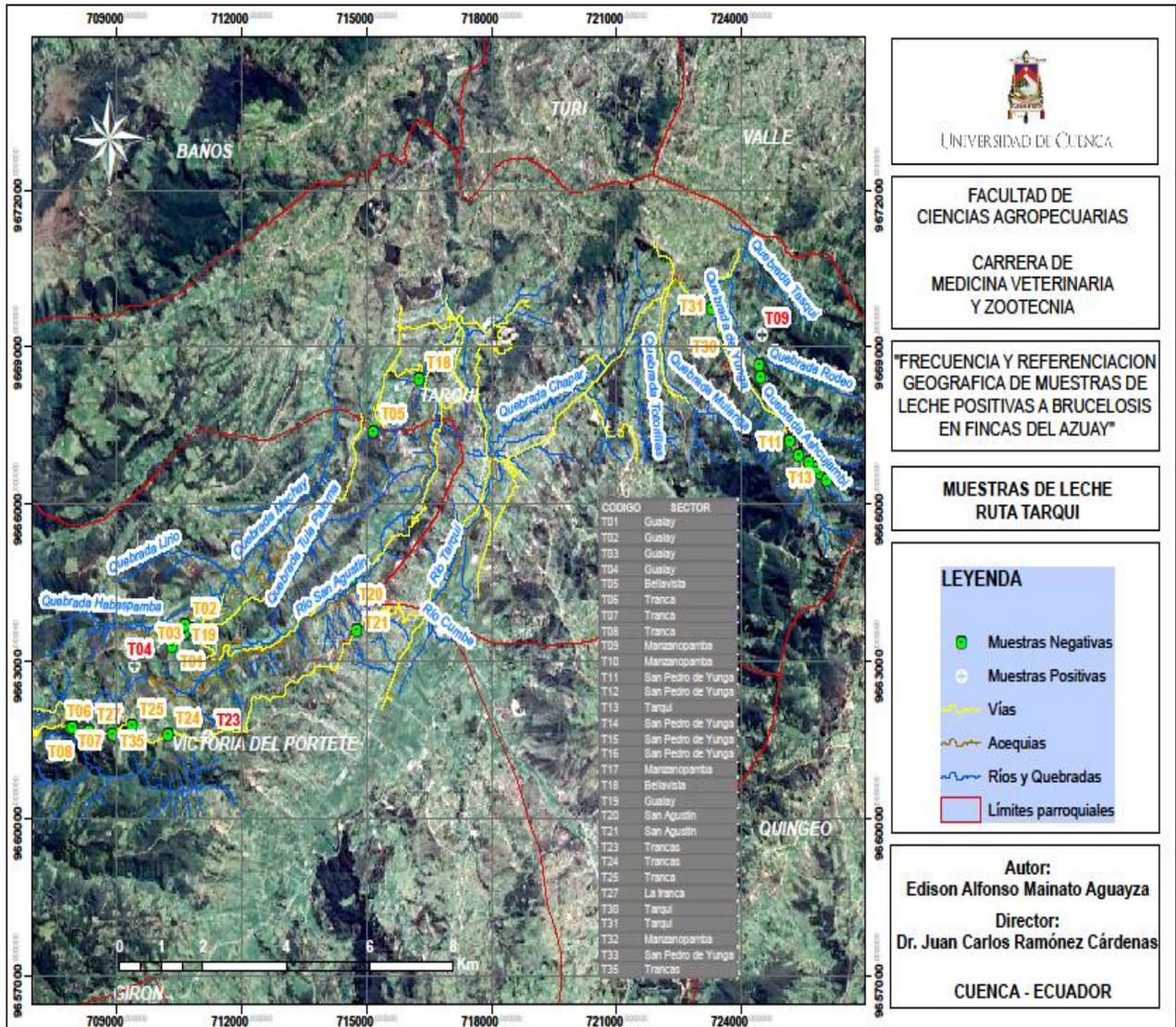
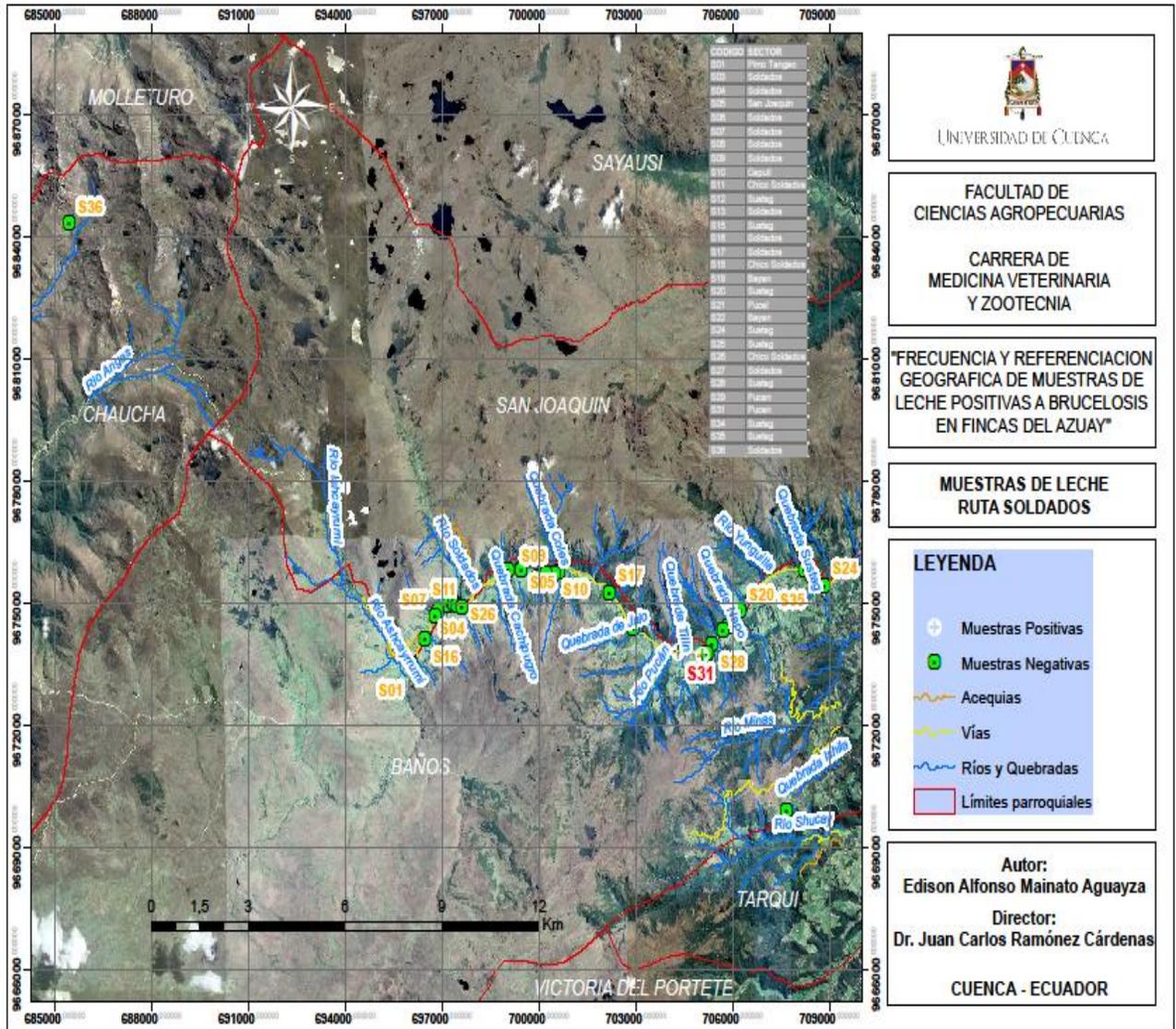


Figura 9. Georreferenciación de las muestras recolectadas de la ruta Tarqui.



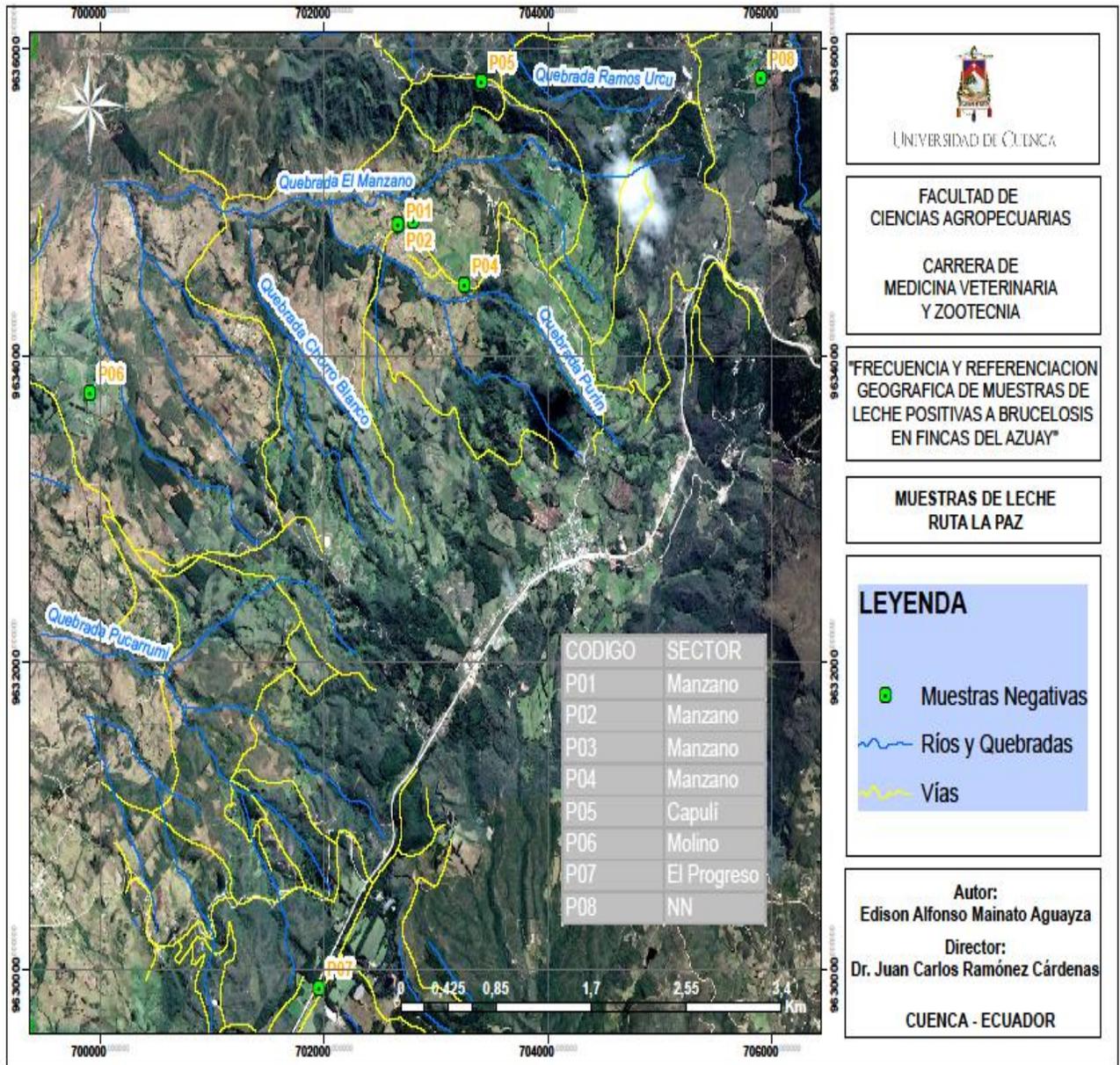
En el mapa (Figura 9) perteneciente a la ruta Tarqui se puede observar la localización de 3 predios seropositivos a Brucelosis los mismos que se encuentran en los sectores de *Gualay*, *Trancas Pamba* y *Manzano Pamba* que si bien no tiene asociación geográfica si representan un foco de riesgo para los predios que se encuentran a su alrededor

Figura 10. Georreferenciación de las muestras recolectadas de la ruta Soldados.



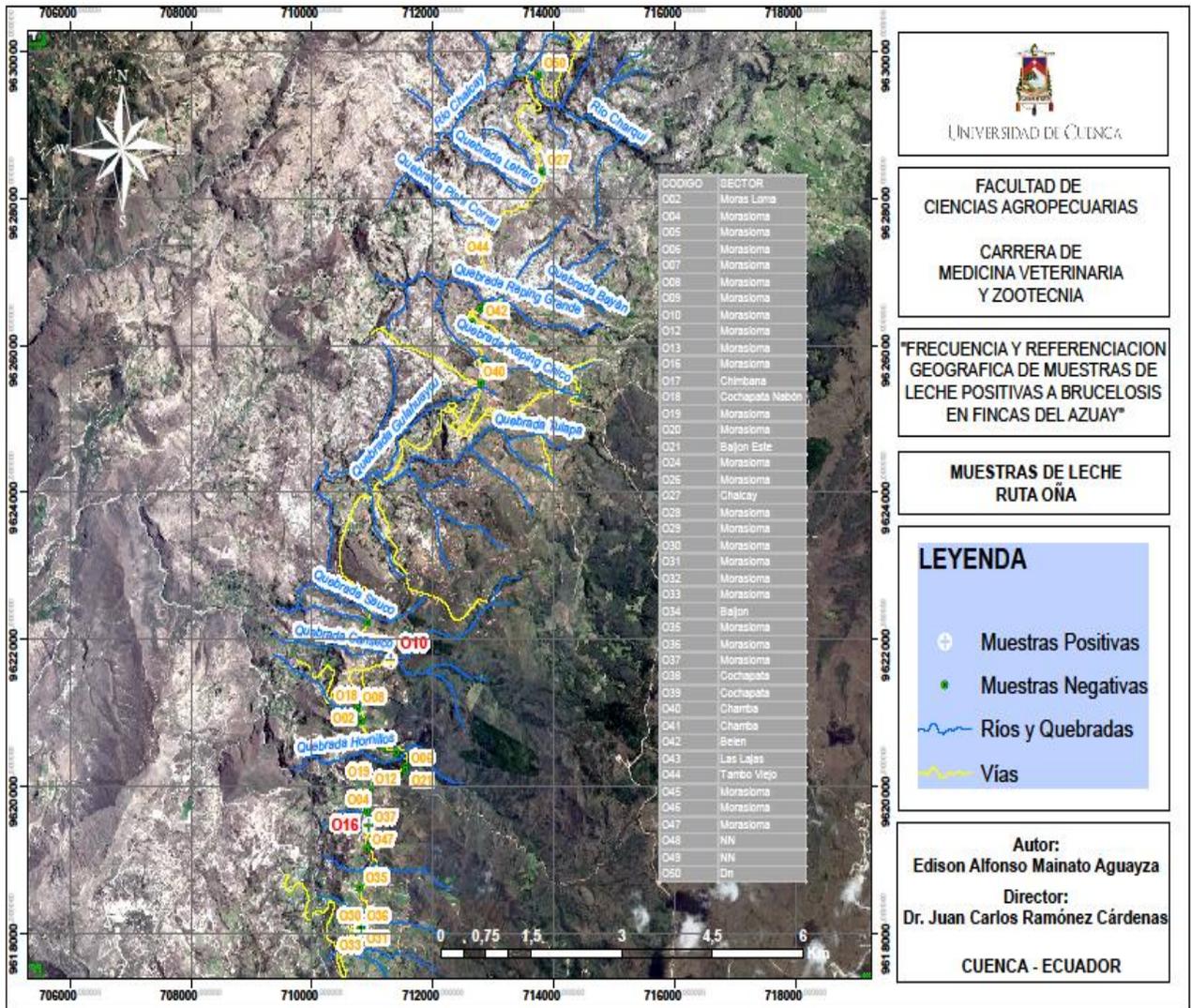
En el mapa (Figura 10) perteneciente a la ruta soldados se puede observar la ubicación de dos predios seropositivos a brucelosis en el sector de Pucan los dos predios se encuentran a gran cercanía entre ellos y como se puede observar las condiciones geográficas de la zona son muy similares en toda la ruta en especial el afluente de sequeas que cruzan por los predios y se unen en las corrientes del río yanuncay lo que podría representar geográficamente un causal de riesgo.

Figura 11. Georreferenciación de las muestras recolectadas de la ruta La Paz.



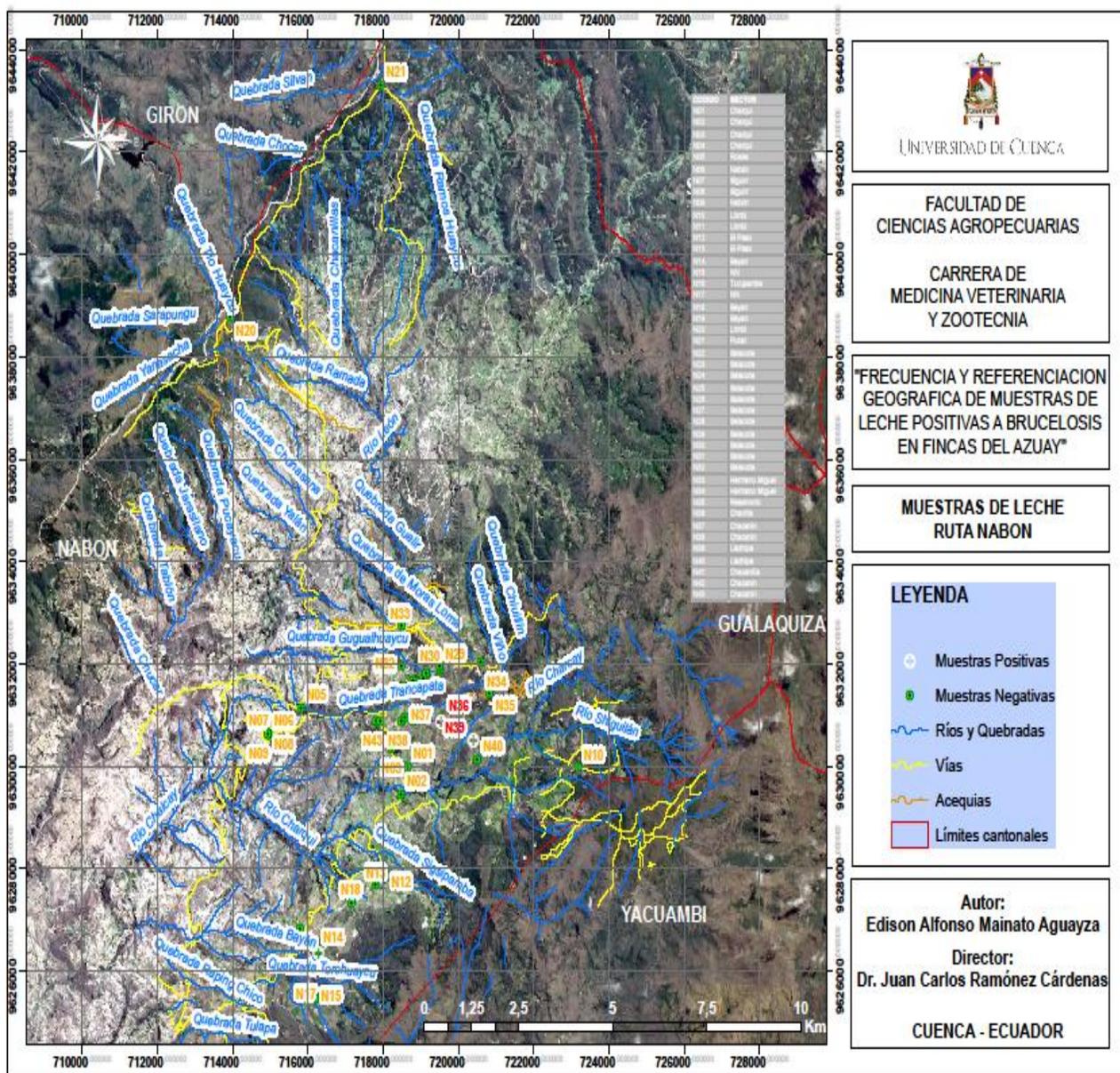
En esta (Figura 11) ruta no se encontraron predios positivos a Brucelosis por lo que se asumiría que el sector de la Paz está libre de focos epidemiológicos.

Figura 12. Georreferenciación de las muestras recolectadas de la ruta Oña.



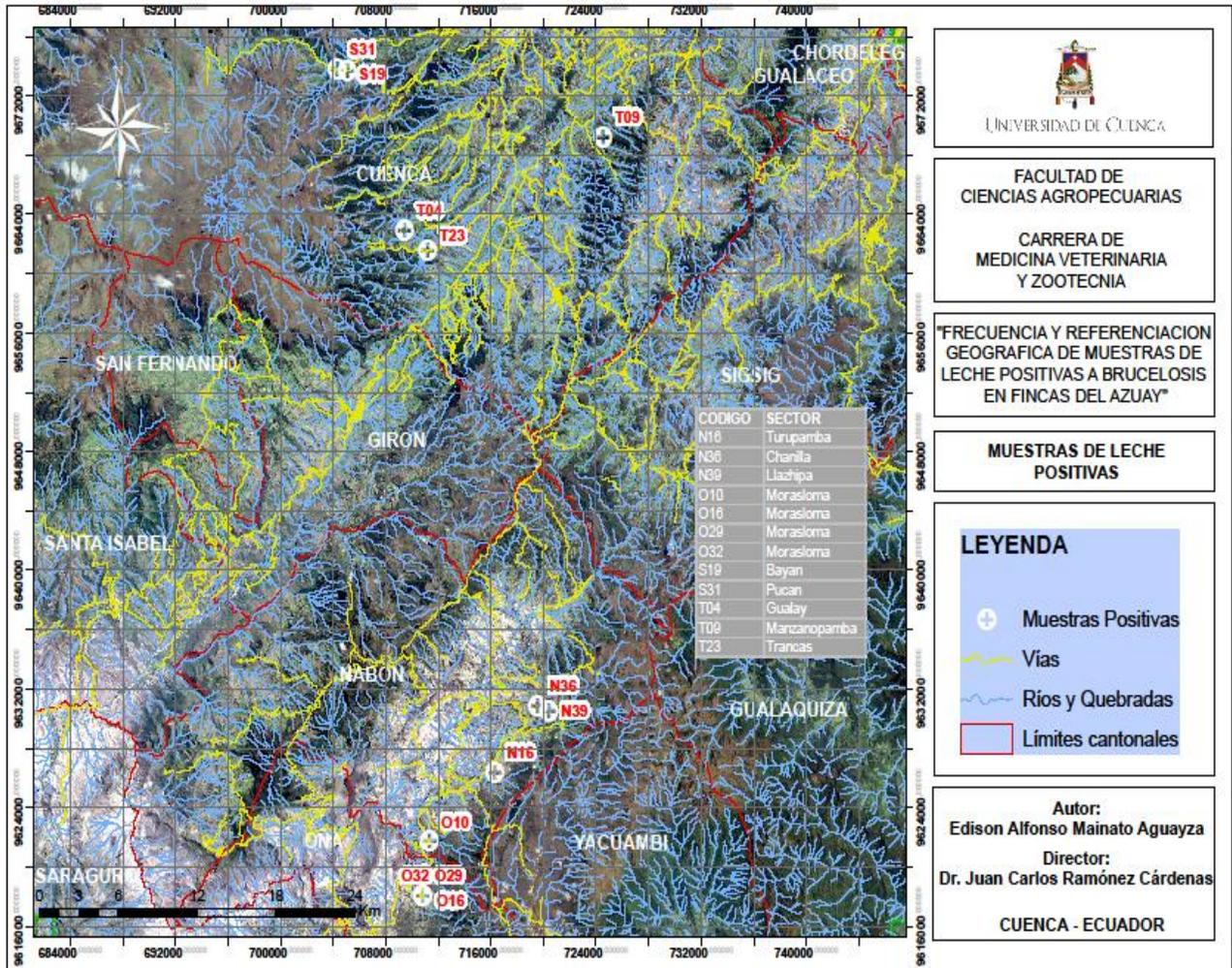
En este mapa (Figura 12) se puede observar la ubicación de los predios pertenecientes a la ruta Oña la misma que recorre dos cantones es por ello que se observa 4 predios positivos a brucelosis localizados; 3 en el sector de Morasloma del cantón Oña y uno en el cantón Nabón, al existir gran cercanía entre los predios del cantón Oña y la gran comercialización interna de animales en la zona y los sistemas de regadíos que tiene su origen en fuentes de agua común representan factores de riesgos en la localidad.

Figura 13. Georreferenciación de las muestras recolectadas de la ruta Nabón.



En el mapa (Figura 13) se puede observar la ubicación de los predios que se encuentran en el cantón Nabón en donde se encontró 2 predios seropositivos de gran cercanía con condiciones de manejo y geográficas similares por lo que epidemiológicamente se describirá como un foco epidemiológico localizado en el sector Chacarin.

Figura 14. Georreferenciación de las muestras seropositivas en la provincia del Azuay.



Como se observa en la distribución geográfica de los resultados seropositivos se presenta en los 3 cantones como focos aislados en algunos casos y en otros con gran cercanía entre las fincas seropositivas, esto nos permite tener una base general de ubicación para tomar decisiones sobre protocolos de manejo, cuidado, movilidad y adquisición de animales en estas zonas sin previo diagnóstico así también se presenta una base general para estudios posteriores focalizados en estas zonas.



5. CONCLUSIONES

La prueba de ELISA-i en leche nos permite determinar fincas seropositivas con mayor rapidez, reduciendo costos, personal y tiempo, para tomar decisiones de control y análisis más específico dentro del hato o zona ganadera.

Con la aplicación de la prueba de Elisa indirecta en leche se obtuvo una frecuencia del 7.8 % de seropositividad en las 153 fincas distribuidas en la provincia del Azuay ($p < 0.05$).

Estadísticamente existe una correlación entre la frecuencia de seropositividad a brucelosis y la procedencia de los animales. No así con la procedencia del agua de consumo y el sistema de reproducción que se emplea en las distintas fincas ($p < 0.05$).

La aplicación de la georeferenciación nos permite identificar detalladamente la ubicación de los predios seropositivos a brucelosis, para determinar si existe asociación de factores geográficos entre los predios. Y delimitar las zonas de mayor riesgo en donde se puede presentar la enfermedad.

Con la georeferenciación nos permite establecer una base de datos geográficos de la enfermedad y su distribución exacta dentro de la provincia para que los ganaderos, empresas e investigaciones futuras dispongan de información que les permita conocer los sitios de mayor riesgo de presencia de la enfermedad.



6. RECOMENDACIONES

La aplicación de esta prueba a gran escala con un mayor número de empresas lácteas, asociaciones o personas; para establecer protocolos de control y erradicación de brucelosis bovina con mayor rapidez y eficacia.

Para estudios posteriores investigar los factores asociados a la leche que pueden influir en los resultados de la prueba como el número de animales de cual proviene la muestra, cualidades físico químicas de la leche y tiempo de almacenamiento de la muestra, así también la aplicación de pruebas directas e individuales con la finalidad de determinar con mayor exactitud el porcentaje de sensibilidad y especificidad de la prueba.

Vincular las herramientas tecnológicas de georreferenciación con todas las ramas de la investigación que permita un mejor aprendizaje, facilitando al profesional el análisis de la interacción de los factores socioeconómicos y geográficos con la actualidad y cambios de que éstos sufren.



7. BIBLIOGRAFÍA

Acosta, A.M, y M Ortiz. 2010. “Prueba del anillo en leche para la vigilancia epidemiológica de brucelosis bovina”. (1937): 2–5. http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/54-anillo.pdf.

Ada<mu, S. G. et al. 2016. “Epidemiological study of bovine brucellosis in three senatorial zones of Bauchi State, Nigeria”. *Veterinary Word* 9: 48–49.

AGROCALIDAD. 2008. *Programa nacional de control de brucelosis bovina resumen*. Ecuador. <http://www.trabajo.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/12/Reglamento-de-Seguridad-y-Salud-para-la-Construcción-y-Obras-Públicas.pdf>.

AGROCALIDAD. 2013. “Enfermedades de declaración obligatoria para las diferentes especies animales en Ecuador”. : 8. <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/sanidad-animal/01-vigilancia-zoosanitaria/DAJ-2013461-0201.0214.pdf>.

AGROCALIDAD. 2016. *Manual De Procedimientos Para El Control De Brucelosis Bovina*". Quito Ecuador.

Agudelo-Flórez, Piedad, Bibiana Castro, Raúl Rojo-Ospina, y Santiago Henao-Villegas. 2012. “Canine brucellosis: Seroprevalence and risk factors in pets from eleven neighbourhoods in Medellin, Colombia.” *Revista de salud pública (Bogota, Colombia)* 14(4): 644–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912517>.

Agurto, D., y P. Fernandez. 2012. “Prevalencia de Brucelosis bovina en la Parroquia Ingapirca, Cantón Cañar, Provincia de Cañar (Tesis de Grado)”. Universidad de Cuenca.

Alonso Sarría, Francisco. 2006. “Cartografía y Geodesia. Sistemas de proyección”. *Sistemas de Información Geográfica*: 7–31.

http://www.um.es/geograf/sigmur/sigpdf/temario_1.pdf.



Alves, Sandra Ferreira et al. 2010. "Epidemiología espacial : nuevos enfoques para viejas preguntas Spatial Epidemiology : New Approaches to Old Questions".

Dossier salud pública y epidemiología en odontología 29(63): 47–65.

Blasco, J M. 2008. "Estado actual de la Brucelosis en españa". 19: 124–36.

Carbonell Baldoví, Enrique, Carmen Fagoaga García, y Carme Sapiña Grau. 2016.

"Bacterias y virus de interés médico veterinario: análisis etimológico". *Nereis: revista iberoamericana interdisciplinar de métodos, modelización y simulación* (8): 51–64.

Casas Olascoaga, Raúl. 2008. "Informe sobre vacunas y vacunación contra brucelosis bovina". *Veterinaria* 43(170): 28–37.

CUENCA Iluste. 2018. "Revista CUENAC nuestras raíces".

[http://www.revistacuenca.com/listado/mapas/1#prettyPhoto\[\]/0/](http://www.revistacuenca.com/listado/mapas/1#prettyPhoto[]/0/).

Díaz, D. 2016. "Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos". *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* 32(1): 43–51.

Díaz Aparicio, E. 2013. "Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*". *OIE Revue Scientifique et Technique* 32(1): 43–60.

Ernesto, S, y F Elvinger. 2009. "Respuesta serológica a la vacunación contra brucelosis en bovinos provenientes de un rebaño libre vacunados con dos dosis de vacuna Cepa RB-51 Serological response to brucellosis vaccination in bovines from a free herd vaccinated with two doses of RB-51". *Veterinary Research Communications* 174: 171–74.

Errico Maio, Francisco. 2015. "Prevención, control y erradicación de la brucelosis y tuberculosis bovina en los predios". *ENGORMIX*.

<https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/prevencion-control-erradicacion-brucelosis-t32053.htm>.



Eustorgio, Víctor et al. 2008. “Diagnóstico rápido y efectivo de brucelosis bovina en sangre, mediante una reacción en cadena de la polimerasa doble Duplex polymerase chain reaction as a rapid , effective diagnostic test for bovine brucellosis using blood samples”. *Tecnica pecuaria en Mexico* 46(2): 147–58.

FAO. 2005. *Aplicación de los Sistemas de Información Geográficos en la epidemiología de fiebre aftosa en la Argentina*.

Felipe, Rolando, y Ochoa Azze. 2012. *Técnicas Inmunoenzimáticas Para Ensayos Clínicos De Vacunas Y Estudios Inmunoepidemiológicos*. Habana. [http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/investigaciones/Tecnicas inmunoenzimaticas para ensayos clinicos de vacunas y estudios inmunoepidemiologicos.pdf](http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/investigaciones/Tecnicas%20inmunoenzimaticas%20para%20ensayos%20clnicos%20de%20vacunas%20y%20estudios%20inmunoepidemiologicos.pdf).

Fernandez, Nora. 2007. “Elisa”. *Analytical Chemistry* 52(2): 903–6.

Franceschini, Gianluca et al. 2009. “The global livestock impact mapping system (GLIMS) as a tool for animal health applications.” *Veterinaria italiana* 45(4): 491–99.

Francisco, José, Moreno Rosales, Tomás Benjamín, y Rentería Evangelista. 2002. “Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la brucelosis bovina en hatos lecheros de Tijuana, Baja California Seroprevalence and risk factors associated to bovine brucellosis of dairy herds at Tijuana, Baja California”. 40(3): 243–49.

García A., Radamés L. 2013. *Manual de teoría : microbiología veterinaria II*. <http://repositorio.una.edu.ni/2471/1/nl70g216.pdf>.

Gómez, Jorge E. 2005. “Estandarización del inmunoensayo ELISA para la detección de IgG anti-Toxoplasma gondii en ratón”. *Parasitologia Latinoamericana* 60(1–2): 97–101.



González, Camilo. 2018. “Prevalencia aparente de brucelosis bovina a través de ELISA indirecto en 48 fincas de los cantones Rio Verde y Quinindé, provincia de Esmeraldas”. : 26.

<http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/7557/1/139526.pdf>.

Guerrero Ochoa, Karen Paola. 2010. “Prevalencia de Brucelosis bovina en el cantón Las Lajas, de la provincia de El Oro, determinado por dos métodos de diagnóstico ELISA competitivo y Rosa de Bengala’, (Tesis de grado)”.

Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.

Guzmán, Elizabeth. 2004. “Las pruebas de ELISA”. *Gaceta Médica de Mexico* 140(3): 48–49.

Ibarra, Edison Marcelo, y Ruth Elizabeth Salgado. 2016. “Prevalencia de brucelosis (*Brucella Abortus*) y factores de riesgo en estudiantes de primero a noveno semestre de la escuela de Desarrollo Integral Agropecuario de la UPEC”. *Sathiri* (11): 303–26.

Ibarra Rosero, Edison Marcelo. 2013. “Evaluación comparativa de pruebas diagnósticas en leche para brucelosis en el Norte de Ecuador”. *Sathiri* 2013(4): 278.

Mainato, Matias. 2017. “Seroprevalencia de *Brucella abortus* como impacto en la reproducción bovina de la provincia del Cañar. (Tesis, Maestría en reproducción animal)”. Universidad de Cuenca.

Mainato, Segundo, Guillermo Guevara, y Antonio Vallecillo. 2017. “Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de la brucelosis bovina en la provincia del Cañar, Ecuador”. *MASKANA, Producción Animal-2017*: 2016–18.

Maldonado, Jesus et al. 2010. “Implementación de la prueba del anillo en leche y elisa indirecto para el diagnóstico de brucelosis en rebaños doble propósito del estado Lara, Venezuela”. *Revista Científica XX* (3): 240_244.



Martinez, D. E. et al. 2018. "Brucelosis: prevalencia y factores de riesgo asociados en bovinos, bubalinos, caprinos y ovinos de Formosa, Argentina". *Revista Veterinaria* 29(1): 40.

Mejía Martínez, K., y C. Lemus Flores. 2012. "Comparación de las pruebas rosa de bengala y rivanol con elisa para el diagnóstico de brucelosis bovina". *Revista Electronica de Veterinaria* 13(2): 1–14.

Meza C., Alan et al. 2015. "Seroprevalencia de brucelosis bovina en el distrito de puerto inca, Huánuco." *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 21(2): 223–26.

Montes, Isaías. 2000. "Diagnóstico de la Brucelosis. Servicio de Microbiología. Hospital Virgen del Puerto. Plasencia (Cáceres)". *Servicio de Microbiología. Hospital Virgen del Puerto. Plasencia (Cáceres) INTRODUCCIÓN: 3.*
<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/diagbruce.pdf>.

Moreira Zúñiga, Rubén Darío. 2016. "Concordancia entre la prueba del anillo en leche y ELISA indirecto en el diagnóstico de brucelosis bovina". *Revista de Medicina Veterinaria* (33): 93–101.

Morera, Martín, y Miguel Andrade. 2004. "Prueba de Rosa de Bengala en el Diagnóstico de Brucelosis Bovina". *Senasa-Perú: 2–6.*
<https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2014/12/Prueba-de-Rosa-de-Bengala.pdf>.

Mosquera, Ortelio, Rocío Freitez, Ana T. Rumbos, y Francisco Pijares. 2009. "Vigilancia epidemiológica de la brucelosis bovina en la parroquia buria, municipio simón planas, estado Lara. periodo 2006-2007". *Zootecnia Tropical* 27(3): 263–70.

Motta Delgado, Pablo Andrés et al. 2018. "Prevalencia de brucelosis (*Brucella* spp) en bovinos del municipio de San Vicente del Caguán, Caquetá, Colombia". *Veterinaria y Zootecnia* 12(2): 1–9.



Muñoz, Sergio. 2014. “ZOOTECNIA Unidad de Posgrado e Investigación SEROPOSITIVIDAD A *Brucella abortus* EN RANCHOS DE PARA OBTENER EL GRADO DE : Maestro en Producción Animal Tropical Opción : Salud Animal”. (September 2003).

Obregón, Orlando Gaviria. 2020. “Factores de riesgo asociados a la seropositividad a *Brucella abortus* en ganaderías del departamento de Putumayo, Colombia”. https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_agrociencias.

OPS. 2001. 24 *El control de las enfermedades Transmisibles*. Informe oficial de la Asociación Estadounidense de Salud Pública.

<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L35575093>.

Oyarzo, Adrian, Cintia Sanchez, Paula Basulado, y Juan Mellado. 2002. “GEOGRAFIA Y SALUD: PROPUESTA DE MODELO DE ESTUDIO ECOEPIDEMIOLOGICO DE ZONOSIS PARASITARIAS A ESCALA URBANA EN DOS CIUDADES DE LA REGION PATAGONICA”. *Parrafos Geograficos* 1: 91–105.

Paredes, Sergio Ramon. 2012. 5 “Determinar la prevalencia de brucelosis bovina y factores de riesgo en la parroquia alluquin, recinto cristal de lelia’,(Tesis de grado)”. Universidad de Cuenca.

Rivera, D Y A et al. 2003. “Evaluación comparativa del método inmunoenzimático indirecto en leche para la detección de bovinos infectados con *Brucella abortus*, en hatos del departamento de Cundinamarca, Colombia”. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 22(3): 1065–75. <http://www.oie.int/doc/ged/d571.pdf>.

Román-Ramírez, Daniela Lucía et al. 2014. “Standard Methods and Procedures (SMPs) for Control of Brucellosis in the Greater Horn of Africa”. *African Union*: 213–35.



Rosero, Edison Marcelo Ibarra et al. 2018. “Estrategias de control de brucelosis bovina en hatos lecheros de la Asociación Rancheros del Norte el Carmelo – Carchi”. *Sathiri* 13(1): 240–46.

<http://revistasdigitales.upec.edu.ec/index.php/sathiri/article/view/522>.

Soler, Yolanda et al. 2017. “Epidemiological surveillance assisted by Geographic Information Systems”. *REDVET* 18: 1–14.

Soria Parra, Manuel, Silvana Mendez, y Fabiola León. 2013. *Enfermedades infecciosas de la reproducción bovina*. ed. Imprenta UNIGRAF. Cuenca, Ecuador.

Tortora, Gerard, Berdell Funke, y Cristine Case. 2007. *Introducción a la microbiología*. 9a ed. ed. PANAMERICANA. Buenos Aires.

Vergara Collazos, Diego et al. 2008. “Prevalencia de brucelosis en la leche cruda de bovinos expendida en el municipio de Popayán Cauca septiembre - diciembre 2006.” *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA* 6(2): 76–85.

Vizcarra, Rafael, Rodrigo; Lasso, y Daniela Tapia. 2015. “La Leche del Ecuador - Historia de la lechería ecuatoriana”. *CILEC (Centro De La Industria Láctea Del Ecuador)*: 51–60.

Wampash, Ronaldo Fabian. 2017. “Sensibilidad analítica de un ensayo de PCR múltiple para la identificación de cepas de campo o vacunales de *Brucella abortus* en leche y nódulos linfáticos de bovinos’, (Tesis de Grado)”. Universidad de Cuenca.

Zambrano, Marina, y Miguel. Pérez. 2015. “Seroprevalencia de brucelosis en ganado bovino y en humanos vinculados a la ganadería bovina en las zonas norte y centro de la provincia Manabí, Ecuador”. *Revista de Salud Animal* 37(3): 164–72. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2015000300004&script=sci_arttext&lng=en.



Zambrano Aguayo, Marina Dalila, Miguel Pérez Ruano, y Ximena Rodríguez Villafuerte. 2016. "Brucelosis Bovina en la Provincia Manabí, Ecuador. Estudio de los Factores de Riesgo". *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 27(3): 607.

8. ANEXOS

Anexo 1. Capacitación y georreferenciación de los predios.



Anexo 2. Toma de muestras de leche cruda en los sitios de recolección.





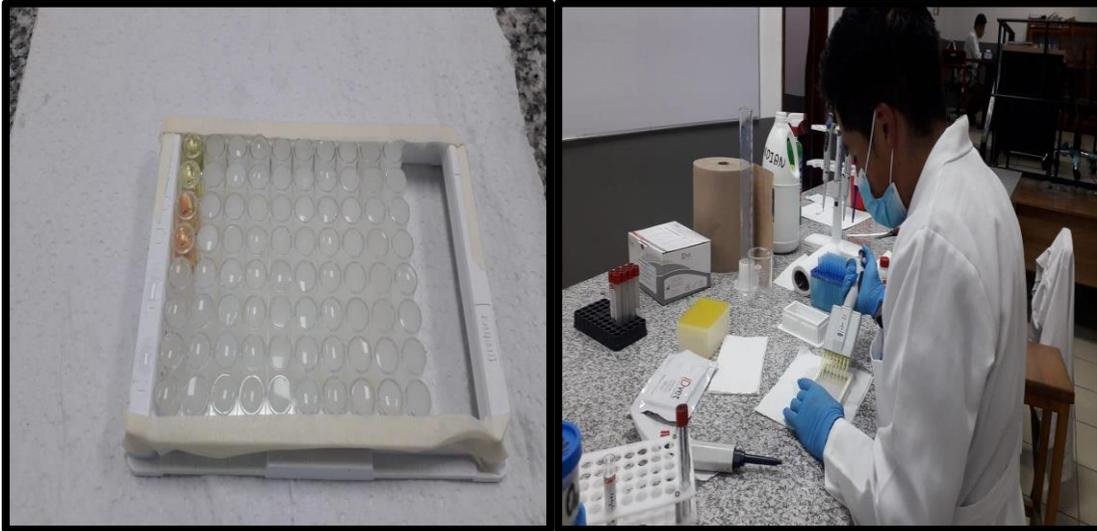
Anexo 3. Identificación y transporte de muestras de leche cruda.



Anexo 4. Identificación y centrifugado de las muestras.



Anexo 5. Pocillos con muestras de lacto suero y colocación de solución de lavado.



Anexo 6. Pocillos con solución de revelación y solución de parada.

