



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

UNIDAD DE ESTUDIO A DISTANCIA

MODALIDAD SEMIPRESENCIAL

CARRERA INGENIERIA AGROPECUARIA

Proyecto de Investigación previo a la
obtención del Título de Ingeniero
Agropecuario

TEMA:

**“INCIDENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA (*Brucella abortus*) EN
LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSACHILAS.”**

AUTOR:

NORTHON VLADIMIR VERA ESPINEL

DIRECTOR

ING. ORLY CEVALLOS FALQUEZ

QUEVEDO – LOS RÍOS - ECUADOR

2013



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
UNIDAD DE ESTUDIOS A DISTANCIA
MODALIDAD SEMIPRESENCIAL
CARRERA INGENIERÍA AGROPECUARIA

**“INCIDENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA (*Brucella abortus*) EN
LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSACHILAS.”**

TESIS DE GRADO

Presentada al Honorable Comité Técnico, Académico, Administrativo de la
Unidad de Estudios a Distancia como requisito previo a la obtención del título de:
INGENIERO AGROPECUARIO

Aprobado:

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Ing. Geovanny Suarez Fernández, MSc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE TESIS

Ing. Caril Arteaga Cedeño, MSc
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE TESIS

Ing. Guido Álvarez Perdomo
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE TESIS

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN

Ing. Orly Cevallos Falquez, docente tutor de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Certifico: que el señor NORTHON VLADIMIR VERA ESPINEL realizo la tesis de grado titulada: “**INCIDENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA (*Brucellaabortus*) EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSACHILAS.**”bajo mi dirección, habiendo cumplido con la disposición reglamentaria establecida para el efecto.

ING. ORLY CEVALLOS FALQUEZ
DIRECTOR DE TESIS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Northon Vladimir Vera Espinel** declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Northon Vladimir Vera Espinel

DEDICATORIA

A quien más si no a mis hijos parte importante de este esfuerzo, de buscar la felicidad que se merecen, mis padres, parte fundamental en el desarrollo personal y, continuos pilares de mi formación en todos los ámbitos de mi vida, mis hermanos, todos ellos razón por encontrar la superación académica para el progreso de nuestra familia, que como resultado tiene el cumplimiento de esta meta; meta que se convierte en un sueño cumplido. A mis compañeros y amigos que siempre estuvieron apoyándome a seguir adelante en mis estudios para lograr este objetivo, de llegar a ser un profesional y poder aportar con más conocimientos al desarrollo de nuestro país, Ecuador.

A los miembros de esta Universidad porque en sus aulas recibí las mejores enseñanzas, a todos los que creyeron en mí, esto es para todos ellos.

NORTHON

AGRADECIMIENTO

Dejamos constancia de nuestro agradecimiento a las siguientes personas:

Ing. Roque Vivas Moreira MsC. Rector de La Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

Ing. Guadalupe Murillo de Luna MsC. Vicerrectora Administrativa.

Eco. Roger Yela Burgos MsC. Director de la Unidad de Estudios a Distancia.

Abg. Edison Plaza León. Secretario de la Unidad de Estudios a Distancia.

Ing. Orly Cevallos Falquez. Director de Tesis.

Ing. Geoback Rizzo Zamora MsC. Coordinador del Programa Carrera Agropecuaria.

Ing. Mercedes Carranza Patiño MsC. Docente Investigador Laboratorio de Biotecnología.

Ing. Enrique Nieto Rodríguez MsC. Docente Investigador Laboratorio de Biotecnología.

Ing. KettyCobaña Rosado. Laboratorio de Biotecnología.

.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a la presente investigación.

ÍNDICE

ÍNDICE	Pág.
CERTIFICACIÓN	iii
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
INDICE DE CUADRO	x
INDICE DE FIGURA	xi
 CAPITULO I.....	 1
MARCO CONCEPTUAL DE LA INVESTIGACION	1
1.1. Introducción.....	2
1.2. Objetivo	4
1.2.1. General	4
1.2.2. Especifico.....	4
1.3. Hipótesis	4
 CAPITULO II.....	 5
RAVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. Brucelosis.....	6
2.1.1. Generalidades.....	6
2.1.2. Brucelosis Bovina.....	6
2.1.3. Etiología	7
2.1.4. Epidemiologia.....	7
2.1.5. Patogénesis	8
2.2. Diagnóstico de Brucelosis Bovina	10
2.2.1. Métodos directos.....	10
2.2.1.1. Diagnostico bacteriológico	10
2.2.1.2. Diagnostico por PCR.....	11
2.3. Método indirecto serología	11
2.4. Supervivencia de Brucella en el ambiente	13
2.5. Obtención de la muestra para serología	14

CAPITULO III.....	15
MATERIALES Y METODOS.....	15
3.1. Materiales y métodos	16
3.1.1. Localización y duración del experimento	16
3.1.2. Datos generales de la provincia Santo Domingo Tsáchilas	16
3.2. Materiales y equipo	17
3.2.1. Materiales.....	17
3.2.2. Equipo de laboratorio	17
3.2.3. Materiales de laboratorio.....	18
3.3. Protocolo	18
3.3.1. Introducción.....	19
3.3.1.1. Manejo del antígeno.....	19
3.3.1.2. Aglutinoscopio.....	19
3.3.1.3. Pipeta.....	19
3.3.1.4. Goteros	19
3.3.2. Técnica de la prueba en placa	20
3.3.3. Lectura de la prueba en placa.....	21
3.3.3.1. Los signos utilizados para la interpretación de los resultados	21
3.4. Metodología	24
3.4.1. Campo	24
3.4.2. De laboratorio.....	25
3.4.3. Protocolo de la extracción del ADN por el método TENS	25
3.4.3.1. Cantidad y compensación del ADN extraído.....	26
3.4.3.2. Diseño de los iniciadores sintéticos	26
3.4.4. Protocolo de PCR Simple.....	27
3.4.5. Análisis electroforético de los productos obtenidos en la PCR simple.....	27
3.5. Diseño experimental	28
3.5.1. Método Porcentual	28
3.5.2. Datos a Evaluar.....	29
3.5.2.1. Prevalencia de brucelosis bovina.....	29
3.5.2.2. Prevalencia de brucelosis bovina por raza criolla y europea	29
3.5.2.3. Zonas de mayores	29

3.5.2.4.	Determinación de las pérdidas económicas.....	29
3.5.2.5.	Medir la sensibilidad y especificidad de la pruebas de Rosa de bengala	30
3.5.2.6.	Establecer el costo por Diagnóstico	30
CAPITULO IV	31	
RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	31	
4.1.	RESULTADOS.....	32
4.1.1.	Prevalencia de brucelosis bovina en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas	32
4.1.2.	Zonas de mayores prevalencias de brucelosis en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.....	34
4.1.3.	Determinación de las pérdidas económicas	37
4.1.4.	Medir la sensibilidad y especificidad de la pruebas de Rosa de Bengala.....	38
4.1.4.1.	Costos por diagnóstico.....	39
4.2.	DISCUSIÓN	41
CAPITULO V	44	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44	
5.1.	CONCLUSIONES	45
5.2.	RECOMENDACIONES	46
CAPITULO VI	47	
BIBLIOGRAFIA.....	47	
6.1.	BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXO	47	

INDICE DE CUADRADOS

Cuadro		Pág.
1	Condiciones metrológicas de La zona Santo Domingo Tsáchilas	16
2	Cantidades de suero antígeno y diámetros	20
3	Interpretación de los resultados. Bovinos no vacunados o v vacunados después de los 8 meses	23
4	Juegos de iniciadores utilizados en la detección de brucelosis.	26
5	Resultados y porcentajes de bovinos reaccionantes de la prueba de Rosa de Bengala, La Provincia de Santo Domingo de losTsachilas.2013.	33
6	Procedencias de los animales positivos y negativos a brucelosis de, la Provincia de Santo Domingo de los Tsachilas.2013	35
7	Estimación de la pérdida económica causada por el aborto producido en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. 2013	38
8	Costo de las pruebas para el diagnóstico de brucelosis en bovino. Laboratorio de biotecnología. UTEQ. Quevedo, 2013.	40

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Numero de bovinos analizado con la prueba Rosa de Bengala, en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. 2013.	33
2	Prevalencia de la Brucelosis bovina, de acuerdo a la procedencia dela Provincia de Santo Domingo de los Tsachilas.2013	35
3	Gel de electroforesis, productos de amplificación de la PCR	36

VII RESUMEN

Esta investigación se la realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. El objetivo general de esta investigación fue: Determinar la prevalencia de Brucelosis bovina en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas mediante las pruebas de Rosa de Bengala y confirmación con PCR. En este estudio se hizo la comprobación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la muestra que salieron positiva con la prueba serológica Rosa de Bengala (RB) en el diagnóstico de la brucelosis bovina. Un total de 400 muestras de sangre fueron recolectadas en 43 hatos en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas con una alta tasa de prevalencia histórica de brucelosis. Un promedio del 29% dio positivo para el análisis de RB, mientras tanto que con PCR fue del 25% , en cuanto a la prevalencia de brucelosis bovina de acuerdo a la procedencia prevalencia de brucelosis bovina según su procedencia es la siguiente; la parroquias de Valle Hermoso y Alluriquin con 1% casos positivos en cada zona; El Esfuerzo, y Santa María del Toachi con 1.5% caso en cada sector, Luz América con 2% caso; La Concordia con 3% casos positivos, Puerto Limón 9% casos positivos y San Jacinto del Búa 10% casos. El análisis mediante la Prueba No Paramétrica de χ^2 determinó significancia estadística ($P \leq 0.05$). Las muestras positivas amplificaron un fragmento de 725pb. Con este trabajo se sugiere que la técnica de PCR es una herramienta altamente eficiente y muy útil para el diagnóstico de la brucelosis en bovino. Se determinó que las pérdidas económicas producidas en vacas enfermas es de \$ 886 dólares.

VIII. SUMMARY

This research was conducted in the Laboratory of Biotechnology, State Technical University Quevedo. The overall objective of this research was to determine the prevalence of bovine brucellosis in the province of Santo Domingo de los Tsachilas using the Rose Bengal test and PCR confirmation. This study was done to check the technique chain reaction (PCR) of the sample that came serologically positive with Rose Bengal (RB) in the diagnosis of bovine brucellosis. A total of 400 blood samples were collected from 43 herds in the province of Santo Domingo de los Tsachilas with high historical prevalence of brucellosis. An average of 29% tested positive for the analysis of RB, meanwhile that PCR was 25%, in relation to the prevalence of bovine brucellosis according to the prevalence of brucellosis source by source as follows: the parishes Valle Hermoso and Alluriquin with 1% positive cases in each area and the effort, and Santa Maria del Toachi case with 1.5% in each sector, with 2% American Light case, La Concordia with 3% positive cases, 9% Puerto Limon positive cases and San Jacinto Búa 10% cases. The analysis by nonparametric χ^2 determined statistical significance ($P = 0.05$). Positive samples amplified a fragment of 725pb. This work suggests that the PCR is a highly efficient and useful for the diagnosis of brucellosis in cattle. It was determined that the economic losses produced in diseased cows is \$ 886 U.S. dollars.

CAPITULO I.

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad endémica en muchos países del mundo. Afecta la sanidad y la producción, además tiene una importante repercusión económica en el comercio internacional de animales y productos derivados. Ocasiona significativas pérdidas en la producción pecuaria debido a que provoca abortos, metritis, infertilidad y el nacimiento de animales débiles. Por otro lado, constituye un importante problema para la salud pública. El hombre adquiere la infección por el consumo de leche no pasteurizada y sus derivados, o por el contacto con material infeccioso.

La lucha contra la Brucelosis se basa en cuatro aspectos fundamentales: el conocimiento de la enfermedad, el diagnóstico correcto, la vacunación y la eliminación de los animales positivos con un único destino el sacrificio. La vacunación y el diagnóstico de los animales constituyen un objeto muy valioso para los planes de control y erradicación.

El agente causal de la brucelosis es la bacteria *Brucella* spp. Se trata de un cocobacilo, aeróbico, Gram negativo. Se conocen 8 especies, cuyos reservorios naturales principales para las distintas especies son: vacunos (*B. abortus*), caprinos (*B. melitensis*), porcinos (*B. suis*), ovinos (*B. ovis*), caninos (*B. canis*), roedores (*B. neotomae*) y, además, la recientemente hallada en mamíferos marinos (*B. ceti* y *B. pinnipedialis*).

La tendencia general favorable en la mayoría de regiones del Ecuador puede no reflejar la existencia de áreas locales endémicas, en las que la brucelosis continúa siendo un problema no resuelto, ya que las zonas de baja incidencia pueden enmascarar las cifras de áreas rurales escasamente pobladas. La identificación de dichas zonas y el estudio de su situación epidemiológica han de contribuir a delimitar el impacto actual de la enfermedad y a la toma de decisiones de salud pública. Nuestro país está claramente identificado por la producción, de carne o leche; sin

embargo diversas áreas ganaderas sufren pérdidas enormes a causa de los abortos, que es un problema de gran impacto económico y un factor limitante del desarrollo de la producción bovina, no solo del país sino también de la ganadería de todo el mundo, lo cual es una de las principales preocupaciones de los productores de nuestro país.

La brucelosis del ganado bovino en Ecuador se encuentra ampliamente difundida, en grados variables de intensidad, de acuerdo con los diferentes sistemas de producción ganadera existentes, causando pérdidas que van más allá de los US \$ 3,000.000 anuales que corresponden al 18% de la población de ganado bovino que está afectado por esta enfermedad.

Por este motivos, se han desarrollado programas de control y erradicación de la brucelosis en varios países que se apoyan en la vacunación masiva de terneras con la cepa *B. abortus* B19 o con *B. abortus* RB51 y en la certificación de rebaños libres. Esta última operación se apoya en el serodiagnóstico: La prueba de rutina se realizan a intervalos regulares, con sacrificio de los animales reactivos, hasta la obtención de tres o más análisis negativos para todos los animales destinados a la reproducción.

Como el diagnóstico positivo significa la remoción del animal de la población, las características de sensibilidad y especificidad relativas de la prueba se tornan importantes, pues resultados falso-positivos obligan a sacrificar animales sanos, y resultados falso-negativos a dejar fuentes de infección en contacto con los animales sanos.

La técnica utilizando antígeno acidificado amortiguado son cualitativos, rápidos, baratos, de ejecución simple y poseen óptima sensibilidad y buena especificidad. El más difundido la Rosa de Bengala.

1.2 Objetivos

1.2.1. General

- Determinar la prevalencia de Brucelosis bovina en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas mediante las pruebas de Rosa de Bengala y confirmación con PCR.

1.2.2. Específicos

- Determinar el porcentaje de brucelosis (*Brucella abortus*) en ganado de bovino criollo en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas mediante la prueba serológica Rosa de Bengala.
- Analizar la sensibilidad y especificidad de la prueba Rosa de Bengala.
- Determinar el costo por diagnóstico utilizando la prueba serológica (Rosa de Bengala) y la técnica de la PCR.

1.3.Hipótesis

- La Rosa de Bengala permitirá mostrar el porcentaje de incidencia de *Brucella abortus* en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.
- La suscripción de sensibilidad y especificidad de la prueba Rosa de Bengala, permitirá el empleo en zonas de baja prevalencia reduciendo los costos en el pesquiasje serológico de la Brucelosis bovina y representa una herramienta certera en el estudio de focos de la enfermedad.

CAPITULO II.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Brucelosis

2.1.1. Generalidades

La Brucelosis es una enfermedad que afecta a los animales y que, accidentalmente se transmite al ser humano, quien juega un papel mínimo en su propagación. Esta patología permanece como una de la más difundida zoonosis en el mundo. La brucelosis animal puede generar barreras en la comercialización de los animales y sus productos, lo cual podría alterar seriamente el desarrollo socioeconómico, especialmente de los pequeños ganaderos que es el sector más vulnerable. Por esta razón, la OMS y otros organismos han establecido planes para eliminar la brucelosis de ovinos, caprinos y bovinos tanto en Europa como en América Latina. (SESA, 2002)

Los programas de control y erradicación de la brucelosis bovina tienen un marcado efecto en la incidencia de la infección humana. Se puede citar como ejemplo lo ocurrido en Dinamarca, donde se notificaban alrededor de 500 casos por año entre 1931 y 1939. La erradicación de la Brucelosis en animales condujo a la erradicación de esta enfermedad en humanos en 1962.

2.1.2. Brucelosis bovina

Es una enfermedad contagiosa, causada por la *Brucella abortus* y caracterizada por inflamación de los órganos genitales y membranas fetales, así como aborto y esterilidad (OPS 1986). El signo predominante en hembras preñadas es el aborto, o bien el nacimiento prematuro o a término de terneros muertos o débiles. Por lo general el aborto se produce en la segunda mitad de la preñez, a veces con retención placentaria y, en consecuencia, una metritis que puede causar infertilidad permanente. Se estima que la infección ocasiona pérdidas del 20 a 25 % en la producción de leche por la interrupción del periodo de lactancia debido al aborto, y a la concepción demorada (Acha, 2001).

2.1.3. Etiología

Es una enfermedad causada por una bacteria del genero *Brucella spp*, se trata de un cocobacilo, aeróbico, gram negativo, que infecta en forma primaria a los animales. Samartino. (2005). Las bacterias son bacilos gran negativos pequeños, que varían de 0.4 - 3 micras de longitud a 0.4 - 0.8 micras de anchuras de forma cocoide. (Cancellan, 1981).

El género *Brucella* está formado por un reducido número de bacterias gramnegativas, estrechamente relacionadas entre sí. Son pequeñas (0.4 a 0.8 x 0.4 a 2.5 μ), aerobios sin cápsula, ni espora, que se presentan aisladas o en pequeños grupos; de desarrollo óptimo a 37 °C y pH 6.6 a 6.8. Sandoval, P. (2007).

Se conocen 7 especies: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis* y *B. maris*. Los reservorios naturales principales para las distintas especies son: vacunos, caprinos, porcinos, ovinos, caninos, roedores y, además, la recientemente hallada en mamíferos marinos. Samartino. (2005)

Con respecto a la taxonomía del género *Brucella* pertenecen al Reino de las proteobacteria, que comprende la Clase Rodospirilla, el Orden Rizobial, la Familia *Brucella ceae* y el género *Brucella*. (Redvet, 2007).

2.1.4. Epidemiología

Investigadores que se han referido al tema concuerdan en que son muy diversas las especies susceptibles a la enfermedad, entre ellas se describen los animales domésticos como los bovinos, porcinos, equinos, caprinos, ovinos, caninos (esporádicamente); el búfalo, yak, camello, alpaca, etc. En los animales silvestres, en las ratas del desierto, y otros múridos, en la liebre, en el caribú, el zorro, el hurón, antílope, bisonte americano, visón, mamíferos marinos, etcétera (Bofill et al. 1996). Afecta principalmente al ganado bovino productor de leche criado en forma estabulada, debido al continuo contacto a que están sometidos los animales (SESA, 2002).

2.1.5.Patogénesis

La puerta de entrada suele ser la cavidad faríngea, las Brucelas llegan en pocos días a los ganglios linfáticos vecinos, de los que pasan a la sangre, donde pueden permanecer de 10 a 21 días, causando elevación de temperatura persistente, durante 2 semanas y, tras intervalos diversamente largo, pueden repetirse a consecuencia de nuevas invasiones de brucelas en la vía hemática. La *Brucella abortus* tiene predilección por útero grávido, ubre, testículos u glándulas sexuales masculinas accesorias, ganglios linfáticos, cápsulas y bolsas articulares. Después de la invasión inicial se produce la localización, primeramente en los ganglios linfáticos mamarios e iliacos (Blood y Radostits, 1992).

Las brucelas llevadas por la sangre a los tejidos de la placenta fetal, materna y al feto y sus cubiertas, muestran singular predilección por ellos, en la matriz preñada, se multiplican con gran energía, primero y con preferencia en el epitelio que reviste las vellosidades embrionarias del coreo, propagándose por entre la mucosa uterina y el coreo, produciéndose una necrosis en las vellosidades y además una capa de exudado fibrinoso purulento que poco a poco relaja la unión entre las placentas fetal y materna (Crawford, 1986).

Los microorganismo en el torrente circulatorio pueden localizarse en diferentes órganos, produciendo alteraciones morbosas que no pasan de ser inflamatorias, tales órganos son el hígado, bazo útero, glándulas mamarias, vesícula seminal, articulaciones y medula ósea. La enfermedad afecta a todos los órganos del individuo y no solo se confina a los genitales (Merchán y Packer, 1970).

Las brucelas llegan a las cubiertas fetales y por deglución del líquido amniótico al feto, en el que producen procesos inflamatorios en el estómago e intestino delgado

y en diversos parénquimas. La relajación entre la placenta fetal y la materna, y el trastorno que sufre por ello la nutrición del feto y por la enfermedad misma que puede producir poco a poco su muerte y su expulsión.

La muerte intrauterina y la expulsión prematura del feto, depende del período de preñez en que se verifica la infección y de la velocidad con que se desenvuelven las alteraciones en las placentas y el feto. Si la infección se realiza en un período avanzado de preñez o si una relativa inmunidad de la madre, acontecido la extensión del proceso morboso, el feto es expulsado en el plazo normal o se produce simplemente un parto prematuro (Crawford, 1986).

La *Brucella spp*; puede penetrar en el organismo por distintas vías; una vez dentro, en la submucosa, es fagocitada por los leucocitos polimorfonucleares (PMN), y los macrófagos tisulares, donde no solo no es destruida sino que puede multiplicarse en su interior, localizándose, finalmente, en los órganos del sistema mononuclear fagocítico.

B. abortus y *B. Mellitensis* pueden ser opsonizadas por el suero humano, proceso facilitado por la presencia de anticuerpos específicos, promoviendo su fagocitosis por los PMN; (Corbeil, et al. 1988). Estas células son capaces de destruir a *B. abortus*, pero tienen muy poca capacidad frente a *B. mellitensis*, debido probablemente a la presencia de algún componente de su pared celular, como el 5'-guanosin monofosfato y la adenina que podrían inhibir la de granulación de los gránulos peroxidasa positivos de los PMN, y el sistema antibacteriano mieloperoxidasa H₂O₂ (Yong, 1994)

2.2. Diagnóstico de brucelosis bovina

El diagnóstico de la brucelosis animal puede tener varios objetivos: conocer la prevalencia y distribución de la enfermedad, detectar animales infectados o servir de herramienta para la vigilancia epidemiológica de zonas indemnes. Para ello se cuenta con métodos directos e indirectos.(Arestegui y Gualtieri, 2005).

2.2.1. Métodos directos

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

2.2.1.1. Diagnóstico bacteriológico

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. (Arestegui y Gualtieri, 2005).

2.2.1.2. Diagnóstico por PCR

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*. Es un método altamente sensible ya que es capaz de detectar 25 cepas diferentes de *B.melitensis*, *B.abortus*, *B.canis*, *B.ovis*, *B.suis* y *B.neotomae* altamente específico ya que los resultados fueron

siempre negativos ante una variedad de bacterias, virus y hongos. (Arestegui y Gualtieri, 2005).

2.3. Métodos Indirectos: Serología

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, la serología es la ciencia que estudia la detección de anticuerpos en los distintos líquidos corporales: suero, plasma, lágrimas, secreciones bronquiales, líquido sinovial, leche, calostro, plasma seminal, moco vaginal, etc. (Arestegui y Gualtieri, 2005).

El suero es un líquido de color amarillento rico en proteínas (enzimas, factores del complemento, productos de la inflamación y efectores solubles de la respuesta inmune humoral: Los anticuerpos (Ac). son elaborados por la células plasmáticas como parte de la respuesta a la estimulación producida por una molécula extraña para el organismo llamada antígeno (Ag). El suero es una fuente heterogénea de Ac producto de la exposición a distintos Ag que pueden ser de origen ambiental, producto de vacunaciones o enfermedades (bacterias, virus, parásitos, etc).

El Ag poseen sitios de unión (epitopes o determinantes antigénicos) a los cuales se unen los Ac en forma específica. Para investigar la presencia de Ac específicos contra un Ag se debe utilizar una prueba serológica adecuada. El resultado de la prueba nos permite establecer si el animal tuvo contacto con el Ag en cuestión. Por esta razón, la presencia de Ac para un determinado Ag, en un único muestreo, no implica que el animal este enfermo.

Solo dos muestras pareadas, tomadas con un intervalo de 2-3 semanas, y que presentan un aumento del nivel de Ac (3-4 veces) indicará una evolución en la respuesta a la infección (conversión serológica). Por esta razón la serología cumple

un papel complementario en la confirmación de un diagnóstico. Por lo tanto, las pruebas serológicas dan una evidencia indirecta de la infección brucélica que cuando son efectuadas en forma uniforme y se las interpreta con criterio epidemiológico (considerando la situación del rodeo) constituyen un instrumento práctico para el diagnóstico. (Arestegui y Gualtieri, 2005).

Varios investigadores han señalado la alta sensibilidad y especificidad de la Rosa de Bengala lo que unido a su fácil manipulación y rápida lectura hacen que la misma sea de gran utilidad en el diagnóstico masivo de la Brucelosis. De este modo Plommet en 1972 y Priadi en 1992 recomendaron su utilización en el programa de control y erradicación de la Brucelosis por ser simple, fiel y económica.

La RB es muy utilizada para el diagnóstico de la brucelosis bovina, ovina, caprina y porcina pues tiene la ventaja de que en pjaras con títulos bajos e inespecíficos a la aglutinación, los resultados son negativos (Rahway, 1993).

Se considera uno de los procedimientos más prácticos para el diagnóstico de Brucelosis porcina. Samartinoet *al.*, (1997), aplicaron la técnica del antígeno buferado en placa (BPA) como prueba tamiz en el diagnóstico de la Brucelosis y obtuvieron mayor sensibilidad al compararla con la Rosa de Bengala aunque las dos fueron determinante para la condición de animal reaccionante.

La prueba de Rosa de Bengala es una prueba sencilla de aglutinación en manchas que emplea un antígeno brucélico coloreado con Rosa de Bengala y tamponado, para obtener un pH bajo, por lo general de 3.65 a 4.0. Es recomendada como una prueba de complementación con otras, como la prueba de placa. Esta prueba reconoce la IgG1 y la IgM, empleándose como una prueba de preselección en el diagnóstico individual de bovinos, es altamente sensible especialmente en animales vacunados, por lo que las muestras positivas deben ser confirmadas por otros métodos. (FAO/OMS, 1986; Tizard, 1989).

2.4. Supervivencia de *Brucella* en el ambiente

La supervivencia del microorganismo en el ambiente puede jugar un rol importante en la epidemiología de la enfermedad de diversos estudios tendientes a determinar la capacidad de supervivencia de *Brucella* expuesta a diferentes condiciones experimentales y ambientales.

La temperatura, humedad y el pH tienen fuerte influencia sobre la capacidad de la bacteria para sobrevivir en el ambiente. Las *Brucellas* son sensibles a la luz solar directa, desinfectantes y pasteurización. En condiciones de sequedad ellas sobreviven solamente si están contenidas en material proteico la *Brucella* puede sobrevivir en agua corriente (de canilla) por varios meses a 4-8 °C, 2.5 años a 0 °C y varios años en tejidos o medios congelados. (Young, 1994).

La *Brucella* puede también sobrevivir hasta 60 días en suelos húmedos y hasta 144 días a 20°C y 40% de humedad relativa. También puede sobrevivir 30 días en la orina, 75 días en fetos abortados y más de 200 días en exudados uterinos. En paja de piso de corrales contaminada con materia fecal de animales infectados y excretando *Brucella*, la bacteria se destruye a 56 – 61 °C dentro de las 4.5 horas sin embargo, existen publicaciones conflictivas donde se informa la supervivencia de *Brucella* en abonos líquidos de estiércol. (Young, 1994).

De acuerdo a un estudio, *B. abortus* puede sobrevivir al menos por 8 meses a 12 °C (Plommet, 1972), mientras que otros estudios, indican que no puede ser recuperada de los contenedores con estiércol y agua después de los tres meses, además, otros estudios indican que la supervivencia de *Brucella* está condicionada a influencias estacionales. Se ha mencionado que *Brucella* puede sobrevivir en materia fecal, desperdicios de establos y abonos líquidos de estiércol por 85-103 días en invierno, 120-210 días en primavera, 30-180 días en verano. (Young, 1994).

2.5. Obtención de la muestra para serología

- **Extracción de sangre:** en los grandes animales, la sangre se obtiene de la vena yugular o bien de la vena caudal; en los pequeños animales a partir de la vena cefálica antibraquial o de la safena. Si la extracción se hace con jeringa debe hacerse en forma lenta para no generar turbulencia y evitar la hemólisis. Los tubos para colectar la muestra deben estar secos, limpios y perfectamente rotulados. (Arestegui y Gualtieri, 2005).

- **Obtención del suero:** para su obtención, se deja coagular la sangre en el tubo a temperatura ambiente (20-22°C) durante 12-24 h o se coloca en estufa a 37°C durante 3 - 4 h. El suero obtenido a partir de la retracción del coágulo es separado con la ayuda de pipeta. Si hay glóbulos rojos en suspensión deberá centrifugarse a 1500-3000 rpm durante 5 minutos. (Arestegui y Gualtieri, 2005).

- **Conservación del suero:** si el suero va a ser utilizado en forma inmediata se refrigera, de lo contrario se congela a -20°C. No debe congelarse y descongelarse repetidas veces. La característica deseable es que sea translúcido e inodoro. No deben utilizarse en pruebas serológicas sueros hemolisados o contaminados. (Arestegui y Gualtieri, 2005).

CAPÍTULO III.

METODOLOGIA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1. Localización y duración del experimento

El presente estudio se desarrolló en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, en las 7 parroquias urbanas: Abraham Calazacón, Bombolí, Chiguilpe, Río Toachi, Río Verde, Santo Domingo y Zaracay⁸ parroquias rurales: Alluriquín, El Esfuerzo, Luz de América, Puerto Limón, San Jacinto del Búa, Santa María del Toachi, Santo Domingo y Valle Hermoso que está conformada por dos cantones: Santo Domingo

y La Concordia. A una altura de 656 m.s.n.m. Se extrajeron 5 cc de sangre por individuos adultos se tomaron un total de 400 animales (200 bovino criollo y 200 bovino de las razas europeas). Esta investigación tuvo una duración de cuatro meses.

3.1.2. Cuadro 1 Datos generales de la Provincia Santo Domingo

Cuadro 1 Datos generales

Cabecera Provincial	Santo Domingo de los Colorados
Superficie	3.564 km ² (3.532 Km ² el cantón)
Altitud	656 metros sobre el nivel del mar
Límites	Norte: Provincias de Pichincha y Esmeraldas; sur: Los Ríos y; este Cotopaxi; y oeste: provincia de Manabí.
Clima	Subtropical
Temperatura	22,9°
Precipitación anual	De 500 a 5.000 mm/año
Población	331.126 habitantes.
Distribución Poblacional	70% urbano y 30% rural
Composición poblacional	50% hombres y 50% mujeres
División política	1 cantón: Santo Domingo de los Colorados 7 parroquias urbanas: Abraham Calazacón, Bombolí, Chiguilpe, Río Toachi, Río Verde, Santo Domingo y Zaracay 8 parroquias rurales: Alluriquín, El Esfuerzo, Luz de América, Puerto Limón, San Jacinto del Búa, Santa María del Toachi, Santo Domingo y Valle Hermoso.
Comunidades Tsáchilas	7 comunidades: Congoma Grande, Chiguilpe, Búa de los Colorados, El Poste, Los Naranjos y Otongo Mapalí.

FUENTE: PLAN DE DESARROLLO 2012

3.2. Materiales y equipos.

3.2.1. Material

Como material se utilizó los bovino criollo y de raza europea provenientes de los diferentes cantones y parroquia de la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

De campo

Cantidad

- Bovinos 400
- Tubos vacutainer (tapa roja) 400

▪ Tubos vacutainer (tapa lila)400	
▪ Jeringuillas de 5 ml.400	
▪ Gel refrigerante (pilas)	3
▪ Termo	1
▪ Tablero	1
▪ Esferográficos.	1
▪ Lápiz1	
▪ Hojas de registro para la toma de muestras.400	
▪ Guantes (caja)	1
▪ Etiquetas.400	
▪ Mapas.	1
▪ Gradillas.	5
▪ Vestimentas (overol, botas)	2
▪ Cintas Scott	2
▪ Fundas plásticas	24

3.2.2. Equipos de Laboratorio

Cantidad

▪ Refrigeradora	1
▪ Estufa	1
▪ Centrífuga	1
▪ Antígeno Rosa de Bengala(Frascos)	2
▪ KIT de PCR	2
▪ Reloj	1
▪ Eppendorf2000	
▪ Gasa	6
▪ Alcohol 90 grados (Ltrs)	1/2
▪ Micropipeta	4
▪ Punta amarilla2000	
▪ Mandil	1

▪ Toallas(paquetes)	2
▪ Mascarilla	12
▪ Agua destilada(Ltrs)	1/2

3.2.3. Materiales de Laboratorio Cantidad

▪ Computador	1
▪ Calculadora	1
▪ Programa de procesamiento de datos1	
▪ Fórmulas de cálculo bovinométrico (índices, etc.)	

3.3. Protocolo

La prueba de aglutinación en placa para el diagnóstico de Brucelosis ha demostrado su eficacia como prueba acampo y sus resultados son comparables a otras pruebas de Laboratorio cuando su técnica de ejecución e interpretación se realizan según normas estándar internacionales.

3.3.1. Introducciones

3.3.1.1. Manejo del Antígeno

Debe conservarse a temperatura entre 4-8 grados centígrados. Si por accidente se congelara debe ser eliminado. Cuando no se utiliza debe permanecer tapado pues la evaporación o la introducción de elementos extraños modifica su concentración desvirtuando los resultados. Sueros y antígenos deben ser utilizados a temperatura ambiente (Alton *et al.*, 1969 y OMS, 1971).

3.3.1.2. Aglutinoscopio.

Es una caja rectangular de madera con las siguientes medidas: largo 45 cm. ancho 35 cm., alto 15 cm. Con visera de 13 cm. en la parte anterior. Para evitar la evaporación de las pruebas es conveniente colocarle tapa (marco y vidrio). La placa (vidrio) estará dividida en cuadrados de 4 x 4 cm., medida muy importante para permitir la extensión y diámetro de cada dilución, debajo de la visera llevará una fuente de iluminación. De esta forma la luz será incidente y permite una buena lectura.

3.3.1.3. Pipetas

Debe utilizarse pipetas aforadas especiales con divisiones para cada dilución o en su efecto una pipeta Kant de 0.2 mL. Dividida en centésimas. Deben desecharse las pipetas con la punta rota.

3.3.1.4. Goteros

Para agregar el antígeno deben utilizarse goteros calibrados que liberen 0.03mL. El uso de estos goteros es muy importante para mantener la relación antígeno-anticuerpo.

3.3.2. Técnica de la prueba en Placa

- a. El vidrio (placa) previamente limpio debe ser perfectamente desengrasado cada vez con alcohol 96° y bien secado, esto evita que las diluciones modifiquen su diámetro y se deformen (ver cuadro No. 1).
- b. Colocando la pipeta en ángulo de 45° con respecto a la placa y tocando el vidrio, descargar las cantidades de sueros correspondientes a cada dilución utilizando una fila de cuadrados de arriba abajo (ver cuadro No. 1).

- c. Con el gotero calibrado y previa agitación del frasco para homogenizar el antígeno, descargar en posición vertical, una gota de antígeno para cada cuadrado con suero.
- d. Con un palillo se mezcla el suero y antígeno varias veces sin modificar el diámetro y luego se trata con movimientos circulares de llegar a los diámetros correspondientes (ver cuadro No. 1) se comienza a mezclar de abajo hacia arriba es decir de la dilución mayor a la menor.

Cuadro.2. Cantidades de suero antígeno y diámetros

Dilución	Cantidad de suero	Cantidades de antígenos	Diámetros
1/25 mm.	0, 08 mL	0, 03 mL	27 mm.
1/50 mm.	0, 04 mL	0, 03 mL	24 mm.
1/100 mm.	0, 02 mL	0, 03 mL	21 mm.
1/200 mm	0, 01mL	0, 03mL	18 mm.
1/400 mm	0,005 mL	0, 03mL	15 mm.

- e. Se toma la placa y se hace un suave movimiento de rotación 5 vueltas a la derecha y 5 a la izquierda.
- f. Se vuelve a colocar la placa en el aglutinoscopio y este es el momento que se toma como comienzo de la prueba. A contar de aquí se cuentan los ocho (8) minutos que dura la prueba.
- g. Transcurridos cinco minutos de la iniciación de las pruebas se vuelve a rotar la placa 3 veces en cada sentido. Se apoya la placa en el aglutinoscopio y se espera que transcurra los tres minutos restantes para hacer la lectura.

3.3.3. Lectura de la prueba en placa

Transcurridos los ocho minutos se procede a la lectura. Para ello se enciende la luz, se inclina la placa hacia delante y luego lentamente hacia atrás fijándose atentamente en el sedimento que deja la prueba al correr de delante a atrás.

Dicho sedimento se interpreta a así en cada dilución:

Líquido uniforme sin grumos, reacción negativa (-). Líquido no tan uniforme, pequeños o medianos grumos, reacción incompleta (I). Líquido límpido, grandes grumos, reacción positiva (+).

La práctica continuada de la prueba ejercita para la buena y justa lectura.

La técnica antes descrita corresponde al estándar internacional y garantiza resultados comparables con otras pruebas serológicas de estricta exactitud pero complicado mecanismo de ejecución.

3.3.3.1. Los signos utilizados para la interpretación de los resultados

La nomenclatura utilizada en el diagnóstico serológico, tiene carácter de internacional. Como difiere de la habitualmente usada en Ecuador, es conveniente modificarla y adoptar aquella.

Las cruces con que se cuantifica cada dilución significan intensidad de reacción y no identificación de título aglutinante.

Así, una muestra de suero puede merecer una - dos - tres o cuatro cruces, en cada dilución, de acuerdo al tamaño de los grumos y la limpidez del líquido intermedio por ejemplo:

1/25 ++ Grumos apenas perceptibles, líquido turbio

1/25 ++ Grumos más grandes, líquido menos turbio

1/25 +++ Grumos algo más grandes, líquido menos turbio aún

1/25 ++++ Grumos bien grandes, líquido límpido.

Así para todas las diluciones: 1/50 – 1/100 – 1/200 – etc. Ver cuadro 2.

La posibilidad de determinar si una dilución es reaccióante a 1 – 2 – 3 cruces, es subjetiva, depende del observador y puede dar lugar a controversias, razón por la cual esa intensidad de reacción se ha resuelto representarla con la letra “i” que significa reacción incompleta y cuando se trata de una reacción 4 cruces se representa con el signo (+) como reacción completa. La práctica continuada de la prueba ejercita para una buena y ajustada lectura.

La técnica antes descrita, corresponde al estándar Internacional y seguirla estrictamente garantiza resultados comparables con otras pruebas serológicas de especifica exactitud, pero complicado mecanismo de ejecución.

Cuadros 3. Interpretación de los resultados

Bovinos no vacunados o vacunados después de los 8 meses

1/25	1/50	1/10	1/200	RESULTADOS
-	-	-	-	Negativa
	-	-	-	Negativa
+	-	-	-	Negativa
+		-	-	Sospechosa
+	+	-	-	Sospechosa
+	+		-	Sospechosa
+	+	+	-	Positiva

+	+	+	I	Positiva
+	+	+	+	Positiva

Bovinos vacunados a los 3 – 8 meses después de los 30 meses de edad

-	-	-	-	Negativa
I	-	-	-	Negativa
+	-	-	-	Negativa
+	I	-	-	Negativa
+	+	-	-	Negativa
+	+	I	-	Sospechosa
+	+	+	-	Sospechosa
+	+	+	I	Sospechosa
+	+	+	+	Positiva

(I) Reacción Incompleta; (+) Reacción Completa; (-) Reacción Negativa

3.4. Metodología

3.4.1. Campo

Se realizaron planificaciones y cronogramas de trabajo previos a las visitas a las explotaciones ganaderas. Los animales utilizados para la investigación fueron a nivel de cada finca de acuerdo al número de muestras que designada para cada cantón. Se extrajeron de la vena coccígea media o yugular, 5 mL por animal. Una vez tomada la muestra se identificaron para posteriormente transportarla al laboratorio de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. La sangre extraída se dejaron reposar por unas cuatro horas luego se tomaron el suero, y este se

congeló.

3.4.2. De laboratorio

Se utilizó el método de aglutinación rápida con antígeno de *Brucella* en Rosa de Bengala. Se prefirió este método por la seguridad de los resultados, por lo fácil de ejecutar y por su economía. Con esta prueba se detectó los animales infectados. En el laboratorio se utilizó el aglutinoscopio, que es una caja de madera con un foco y una placa de vidrio con varios cuadrantes. Se lavó con desinfectante, se enjuagó y se secó, después se desinfectó con alcohol, por último se secó con toallas absorbentes.

Una vez preparado todos los materiales a utilizar, con una pipeta de Pasteur se tomó de los tubos de ensayo, que contienen suero sanguíneo, una gota equivalente a 0,03mL, la misma que se colocó en cada cuadrante, donde posteriormente, con otra pipeta, se cogió el antígeno Rosa de bengala (la misma cantidad), el mismo que debe estar fuera de refrigeración por 15 minutos antes de la prueba. El antígeno se depositó encima de la gota de suero sanguíneo para luego procedió a homogenizar utilizando un mondadientes. Después se cogió la placa de vidrio del aglutinoscopio para realizar ligeros movimientos circulares de derecha a izquierda y viceversa, se dejó reposar aproximadamente de 3 a 5 minutos para observar a través de la luz artificial si existe o no aglutinación, si existe aglutinación (grumos) de la muestra es positiva caso contrario será negativa. Se monitoreará 400 animales.

3.4.3. Protocolo de extracción de ADN por el método de TENS.

Se utilizó el protocolo de TENS modificado. En el caso de muestras de sangre colectadas en EDTA lavar por dos o tres ocasiones con 200 µL de solución salina (CINa 0,9%) y centrifugamos por 30 seg. Este paso ayudará a eliminar el exceso de

proteínas. Agregamos 400 µL de tampón de extracción TENS (50mM de Tris-HCl, 50mM de EDTA, 100mM de NaCl y 1% de SDS), y 5 µL de proteinasa K (20mg/ml). Incubamos a 56 °C por 1 hora.

Luego agregamos un volumen de fenol/cloroformo/isoamil alcohol (25:24:1) y homogenizamos para formar una emulsión, posteriormente centrifugamos a 10000 rpm por 10 minutos y transferimos la parte superior “acuosa” a un nuevo tubo. Posteriormente agregamos 2 volúmenes de Etanol 95% helado, y homogenizado para ayudar a la precipitación del ADN. A continuación centrifugamos a 10000 rpm por 5 minutos, descartamos el Etanol 95% y suspendemos con Etanol al 70% y centrifugamos a 10000 rpm por 5 minutos, al descartar el Etanol 70% se dejó secar a temperatura ambiente y se suspendió en 50 µL de TE buffer (10mM tris-HCL pH 8, y 1mM Disodiun EDTA).

Además se incluyó siempre un control negativo de la extracción de ADN empleando agua destilada estéril en vez de sangre total. (Ferreira y Amores2009).

3.4.3.1. Cantidad y compensación del ADN extraído

Se preparó un gel de agarosa al 1% disuelto en 50 mL de TAE 1X, se le agregó bromuro de etidio 0.5 µg /mL, luego se colocó en la cámara de electroforesis. Se preparó una mezcla con 3 µL de ADN, 3 µL de azul de bromofenol y 8 µL de agua ultra pura, se depositó un volumen de 14 µL de la solución en cada hoyo. Las muestras se corrieron a 75 V por 30 min. Después de la migración el gel es colocado en la band- deja del transluminador para observar comparativamente las bandas de ADN y ser fotodocumentado.

3.4.3.2. Diseño de los iniciadores sintéticos

Se utilizaron iniciadores dirigidos a la secuencia 16S ARNr que fueron publicados en el EMBL-X13695 del GenBank, se seleccionaron dos juegos de iniciadores que fueron evaluados para PCR. Cuadro. 3.

Cuadro 4. Juegos de iniciadores utilizados en la detección de brucelosis.

Iniciadores	Secuencia	Localización
AB1	5'-GCGACGATCCATAGCTG-3'	240 -257 (16S ARNr)
AR2	5'-AACCATAGTGTCTCCACTAA-3'	947-966 (16S ARNr)
BRU-2F	5' GTGGGGAGCAAACAGGATTA 3'	455-475(16S ARNr)
BRU-2R	5' CAAGGGCTGGTAAGGTTCTG 3'	655-675 (16S ARNr)

3.4.4. Protocolo de PCR Simple

La implementación de la reacción en cadena de la polimerasa se realizó a partir del protocolo estándar descrita por Romero *et al.* (1995a); tomando en cuenta la temperatura de hibridación del fabricante para cada juego de iniciadores. Para el análisis de la PCR se probó el juego de iniciadores AB1/AR2 en un volumen total de 50 µL utilizando 3 µL de ADN, 5 µL 10X Buffers KCl; 1U de taq polimerasa; 4 µL de DNTPS (200 mm); 1 µL de oligonúcleitidos (25pMol de cada iniciadores); 3 µL de MgCl₂ (1,5Mm) y 32.8 µL de agua ultrapura. La reacción fue programada en un termociclador (Techne), cuyo programa fue de 95 °C por 5 min y 40 ciclos de

95°C por 30 segundos; 54°C por 90 segundos y 72 °C por 90 segundos y una extensión final de 72°C por 6 min.

3.4.5. Análisis electroforético de los productos obtenidos en la PCR simple.

De cada producto de ADN amplificado se tomó 10 µL y se mezcló con 3 µL de tampón de depósito (13,3% (v/v) glicerol, 3,3% (p/v) azul de bromofenol) para depositar en un gel horizontal de agarosa al 2% (p/v) y se le agrego 4 UL de bromuro de etidio (0.5µg/mL), se migro a 75 V durante 40 min. Luego se visualizaron los productos de ADN utilizando un transiluminador de UV y se fotodocumento. Se utilizó un marcador peso molecular de 100 pb (Gilco BRL) para corroborar el tamaño de las bandas obtenidas.

3.5. Diseño experimental

3.5.1. Método Porcentual

Los casos positivos fueron evaluados mediante la Prueba No Paramétrica para una sola muestra, Prueba de Chi Cuadrado, cuya fórmula matemática es:

$$\chi^2 = (F_o - F_e)^2 / F_e$$

En donde:

$$\chi^2 = \text{Chi Cuadrado}$$

Fo = Frecuencias observadas.

Fe = Frecuencias esperadas.

El valor calculado de χ^2 se comparó con el valor tabulado de χ^2 con k – r grados de libertad.

Se realizó también el Análisis de sensibilidad del método de diagnóstico utilizados mediante la fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{A}{A + C} \times 100$$

Resultados de la Prueba	Resultados Verdaderos
Positivos	(A)
Negativos	(C)
Total	(A + C)

3.5.2. Datos a Evaluar

3.5.2.1. Prevalencia de brucelosis bovina

De acuerdo a los resultados del análisis laboratorio, de los casos positivos y mediante las pruebas aritméticas y porcentuales se establecieron su prevalencia mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PBB} = \frac{\text{N}^\circ \text{ Animales positivos}}{\text{Total}} \times 100$$

N°. Animales muestreados

Donde:

PBB= Prevalencia de brucelosis bovina.

3.5.2.2. Prevalencia de brucelosis bovina por raza criolla y europea

Sobre los casos positivos se realizó un análisis de la prevalencia por razas.

3.5.2.3. Zonas de mayores Prevalencias.

Luego de los análisis de las muestras serológicas en el laboratorio se procedió a determinar las zonas que tuvieron una mayor prevalencia. Además se realizó la comprobación de unos reactores positivos con la técnica de PCR.

3.5.2.4. Determinación de las pérdidas económicas.

Con la determinación de la prevalencia y su distribución por razas, se calculó el monto de las pérdidas económicas causadas por la enfermedad.

3.5.2.5. Medir la sensibilidad y especificidad de la pruebas de Rosa de Bengala.

Para medir la sensibilidad y la especificidad de la pruebas de Rosa de Bengala, se aplicaron la siguiente formula.

Fórmulas.

$$Sensibilidad = \frac{Positivo}{Positivo + falso\ negativo} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Negativo}}{\text{Negativo} + \text{falso positivo}} \times 100$$

3.5.2.6. Establecer el costo por Diagnóstico

Para establecer el costo por diagnóstico por cada una de las pruebas y se consideró los costos totales. Los costos fijos son aquellos valores que se consideran constantes para las dos pruebas como, los equipos y materiales etc.; mientras que los variables guardan relación con el transporte, costo de reactivos, etc.

CAPITULO IV.

RESULTADO Y DISCUCION

4.1 RESULTADOS

El diagnóstico de este trabajo y dirigido a determinar la brucelosis bovina en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas la cual se comprobó con la prueba Rosa de Bengala y se hizo la comprobación con la técnica molecular PCR de los reactores positivo que salían con la prueba de serología. Además, se confirmó la sensibilidad y especificidad de la Rosa de Bengala.

El comportamiento de tan elevadas seroprevalencia con tendencia ascendente, es característico para los estados epizooticos naturales y espontáneos; es decir,

aquellos en los que no existe control sobre las fuentes y vías de transmisión de la brucelosis. Se ha demostrado que cuando la infección está establecida en forma endémica, prácticamente en los cantones y parroquia que no tienen un control en ingresos de animales que vienen de otros hatos y no se le hace un análisis rápido (RB) de esta enfermedad que causa grande pérdida económica a la ganadería de nuestros país y por ende a las personas que tienen o han tenido contacto con el patógeno, o consume producto lácteo sin pasteurizar por lo que existe respuesta inmunológica en personas portadores y no portadores de la bacteria.

En el presente trabajo de investigación que se desarrolló en la provincia ante mencionado se obtuvieron los siguientes resultados.

4.1.1. Prevalencia de brucelosis bovina en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

Extensiones de tierra en Santo Domingo están destinadas a pastizales para la crianza del ganado vacuno, tanto de carne como de leche. Es una zona en donde esta actividad se desarrolla en una forma intensa constituyéndose en la actividad económica y comercial más importante, la provincia cuenta con una población aproximada de 318.540 bovinos distribuidos en fincas de pequeños, medianos y grandes productores, de los cuales 87.540 cabezas corresponde a ganado de carne, 55.495 cabezas ha ganado criollo que tiene ese gen de rusticidad y 175.505 cabezas a ganado de doble propósito.

Esta población ganadera se encuentra asentada en una superficie de 193.776 hectáreas de pastos naturales. Del total de 55495 unidades bovinas, que constituye la población de ganado bovino criollos en todas, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, según el último censo agropecuario, de los cuales se evaluó un tamaño de la muestra experimental de 200 unidades bovinas criollas y 200 de las razas europeas (Brown Swiss, Holsteing,) de la cuales ; del cual se obtuvieron 174

unidades bovinas criollas negativas a brucelosis y 26 unidades bovinas proporcionaron positivo a brucelosis lo que produjo un total de 13 % de prevalencia, en cambio en la razas europea presentaron los siguientes resultados de las 200 muestras alcanzaron 168 unidades bovinas negativas a brucelosis y 32 unidades bovinas proporcionaron positivo a brucelosis lo que produjo un total de 16 % de prevalencia ver cuadro 5, figura 1.

Cuadro 5.-Resultados y porcentajes de bovinos reaccionantes a la prueba de Rosa de Bengala, la Provincia de Santo Domingo de los Tsachilas.2013.

Razas de Bovino	# de Casos Positivos	# de Casos Negativos	% de Prevalencia
Criollo 200	26	174	13
Europeo 200	32	168	16
Total	58	342	19

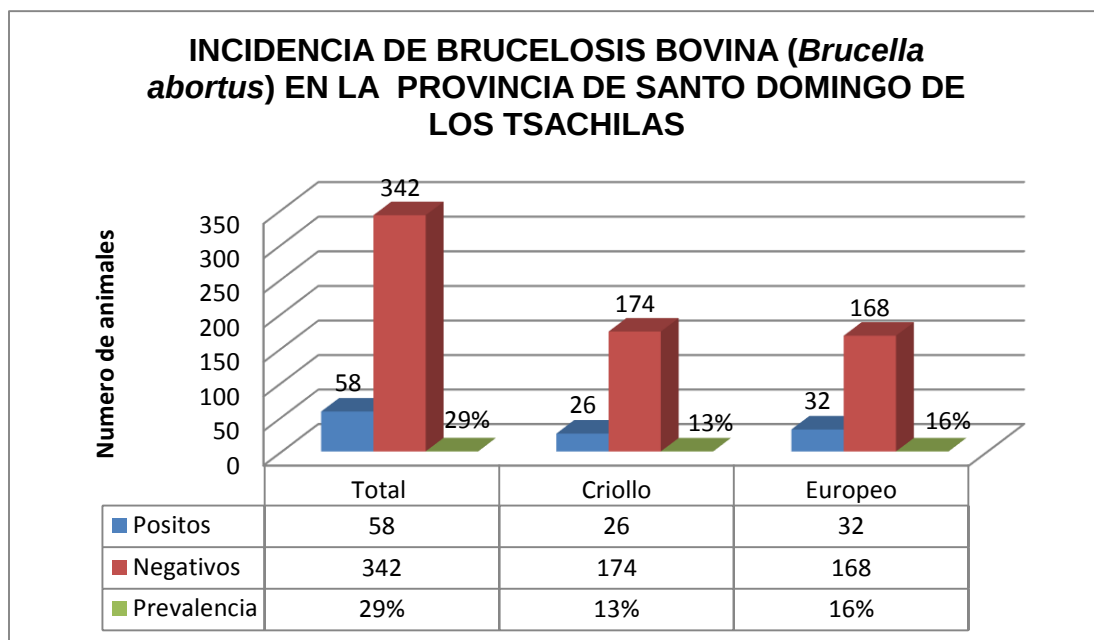


Figura1.- Numero de bovinos analizado con la prueba Rosa de Bengala, en la Provincia de Santo Domingo de los Tsachilas.2013.

En la (Figura No 2) se describe que el total de la dos población tiene un (29%) de brucelosis, de los cuales 13% pertenece a la raza criolla y 16% a las razas europea, esto nos da una idea de que la raza criolla además de tener ese gen de rusticidad al medio ambiente en la época critica presenta también en la parte de sanidad.

4.1.2. Zonas de mayores prevalencias de brucelosis en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

De los 400 animales muestreados (200 criollos y 200 europeos); obtenidos en 43 fincas de las cuales procedieron de ochos parroquia de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, un total de 58 animales resultaron positivos (26 criollos y 32 europeo respectivamente) y procedieron de las siguientes zonas:

En las parroquias Valle Hermoso y Alluriquín con 2 casos positivos cada zona; El Esfuerzo, y Santa María del Toachi con 3 caso en cada sector, Luz América con 4

caso; La Concordia con 6 casos positivos, Puerto Limón 18 casos positivos y San Jacinto del Búa 20 casos, como se muestra en el cuadro 5. Indicando que si hay significancia estadística con respecto a la procedencia. ($P \leq 0.05$). Ver anexo II, figura 1.

Cuadro 6.-Procedencias de los animales positivos y negativos a brucelosis de, la Provincia de Santo Domingo de los Tsachilas.2013

Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas	# de animales	# de animales	# de animales	% de Casos
Parroquias	muestreados	Positivos	Negativos	Total
Valle Hermoso	20	2	18	1
San Jacinto del Búa	120	20	100	10
Puerto Limón	100	18	82	9
El Esfuerzo	20	3	17	1.5
Alluriquín	26	2	24	1
Luz América	24	4	20	2
Santa María del Toachi	30	3	27	1.5
La Concordia	60	6	54	3
TOTAL	400	58	342	29

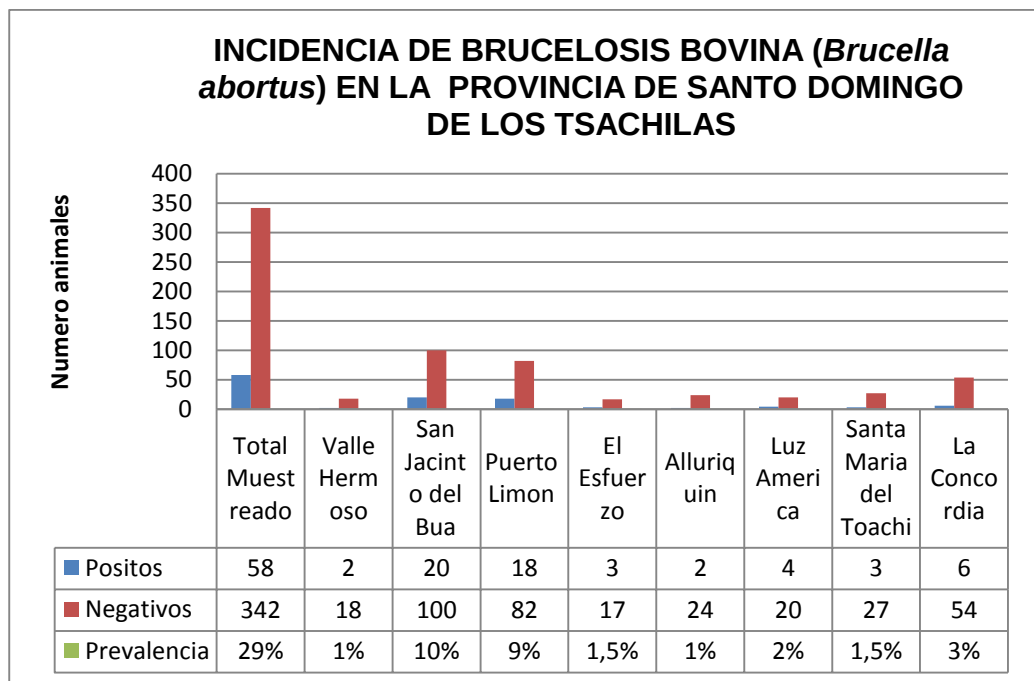


Figura 2. Prevalencia de la Brucelosis bovina, de acuerdo a la Procedencia de la Provincia de Santo Domingo de los Tsachilas.2013

Los resultados de la (Figura No 3) indican que del total de muestras de sangre y plasma analizado, un promedio del 29% dio positivo con el análisis de RB, mientras tanto que con PCR fue del 25 %, el índice de correlación entre RB vs PCR dio un promedio del 86%, lo que sugiere que la técnica molecular de PCR versus RB es 14% más sensible, con el objetivo de revalidar los datos obtenidos en los ensayos anteriores e incrementar la sensibilidad para la detección de *Brucella abortus* en sangre de bovino.

Los resultados demostraron que hubo amplificaciones a partir de muestras positivas por RB. Como se muestran en la figura 6; la aplicación de la técnica PCR para reconfirmar los resultados que salieron positivos con la prueba Rosa de Bengala (58 animales) al aplicar la PCR 50 animales resultaron positivos lo ocho animales fueron falso negativos están técnica aumenta la sensibilidad y especificidad de la brucelosis en el diagnóstico.

En gel de agarosa al 2 % se muestran los resultados de la PCR empleando el juego de primer AB1 - R2. Los resultados obtenidos en la figura 6, se demuestran los resultados obtenidos por amplificaciones de PCR a partir de fuentes de ADN de muestra de sangre de animal con señales clínicas de la enfermedad. La línea MPM: indica el marcador de peso molecular de 100 pb, C+: control positivo.

En las líneas 1 hasta la 11 son los productos de amplificación de la PCR, línea C-: control de los reactivos de la PCR, entonces se establece que hay asociación estadística entre la aplicación de PCR y la Rosa de Bengala con la brucelosis a una confianza del 99 por ciento.

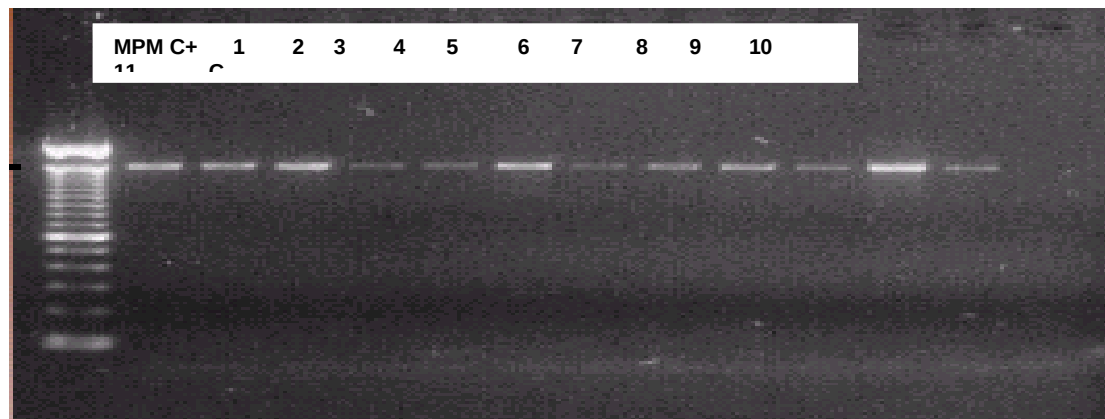


Figura 3: Gel de electroforesis, productos de amplificación de la PCR

4.1.3. Determinación de las pérdidas económicas

En el cuadro 7, se observan los resultados a cerca de las pérdidas económicas que sufre el ganadero cuando una vaca aborta. Se estima que en las ganaderías de la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas el productor deja de percibir \$ 886,00 por cada aborto, por concepto de venta de leche (\$ 736,00) y por el precio del ternero (\$ 150,00); lo cual da un total de (\$ 886,00). A más de los resultados obtenidos se debe considerar la pérdida que tiene el ganadero que por efecto de la brucelosis el animal queda infértil o portador sano, lo que conlleva a que tome medidas drásticas como es la venta para camal del animal infectado.

Cuadro 7.- Estimación de la pérdida económica causada por el aborto producido en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas 2013.

Parámetros	Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas
Duración de la lactancia (días)	230
Promedio de producción de leche (Llts) vaca día	8
Precio del litro de leche a nivel de finca	\$ 0,40
Sub total pérdida en leche (\$)	736,00
Valor del ternero	150,00
Total de pérdida (\$)	886,00

4.1.4. Medir la sensibilidad y especificidad de la pruebas de Rosa de Bengala.

Para medir la sensibilidad y la especificidad de la pruebas de Rosa de Bengala, se aplicaron la siguiente formula.

Fórmulas.

$$Sensibilidad = \frac{58}{400} \times 100$$

La sensibilidad de la prueba Rosa de Bengala fue de 14.5 %

$$Especificidad = \frac{342}{400} \times 100$$

La especificidad de la prueba Rosa de Bengala fue de 85.5 %

4.1.5.1. Costos por diagnóstico

Dentro de los costos por análisis de muestras durante la investigación en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas dados a conocer en el Cuadro, 7 podemos determinar que el precio promedio de un análisis por reacción de (PCR) es de 6.16 dólares y para la prueba Rosa de Bengala de 1.26 dólares.

CUADRO 8. Costo de las pruebas para el diagnóstico de brucelosis en Bovino. Laboratorio de biotecnología. UTEQ. Quevedo, 2013.

PRUEBAS	COSTOS		TOTAL COSTOS	NUMERO MUESTRAS	COSTOS POR MUESTRAS (\$)
	FIJOS	VARIABLES			
Reacción en Cadena de la Polimerasa					
Equipos	450.00	0.208	93.60	58	1.61
Materiales	500.00	0.180	90.00	58	1.55
Reactivos	850.00	0.205	174.25	58	3.00
					6.16
TOTAL DE					
Rosa de Bengala					
Equipos	300	0.073	21.90	400	0.05
Materiales	550	0.79	434.50	400	1.09
Reactivos	520	0.089	46.28	400	0.12
					1.26
TOTAL DE LA PRUEBA					

4.2. DISCUSIÓN

En la presente investigación que trata de determinar la incidencia de brucelosis en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, se estableció que esta enfermedad alcanza un promedio de 13%, en animales de bovinos criollo menor a las razas europea que alcanza un 16%. Estos resultados concuerdan con lo sostenido por Acha, (1.977), que manifiesta que la infección ocurre en todas las edades pero más comúnmente afecta a animales sexualmente maduros y que los distintos grados de susceptibilidad a la infección varían según la edad, el sexo y la rusticidad del animal.

Además esto nos ha llevado ampliar las investigaciones, especialmente sobre el uso de las nuevas tecnologías para enfrentar los problemas sin resolver el diagnóstico referente a la brucelosis. Los análisis de este estudio revelan que la PCR es un método eficaz para identificar brucelosis en bovino, a partir de muestras de sangre periférica total. Su presencia quedó demostrada por la amplificación del segmento de ADN de 725pb, la cual se realizó la comprobación de las muestras que salieron positiva con la prueba rosa de bengala (58 animales positivos) y al hacer la técnica de PCR surgieron (50 animales).

La Rosa de Bengala mostró baja eficiencia respecto a la PCR, lo que podría estar asociado a una actividad controlada de *Brucella spp.* Envacas infectadas. Esto se vio reflejado por el 25 % de incidencia de brucelosis con la técnica de PCR, encontrándose falso positivo y una conjugación de los anticuerpos de otra bacteria como (*E. coli*; *V. cólera*, *Y. enterocolítica*.) con las pruebas serológicas.

Esto no significa que la PCR utilizada en este estudio haya tenido una sensibilidad del 100%, ya que existen variantes de esta prueba que incrementan su sensibilidad en forma exponencial y podría identificar infecciones crónicas no detectadas por las pruebas serológicas convencionales (Rosa de Bengala). Similares resultados obtuvieron (Leal- Klevezas *et al.*, 1995), en un grupo de 22 individuos expuestas a infección natural donde aislaron *Brucella spp.* De sólo un individuo, mientras que por la PCR se identificaron 19, de las cuales sólo 14 fueron positivas serológicamente.

El diagnóstico de la brucelosis en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas es realizado mediante la prueba de aglutinación Rosa de Bengala, como prueba tamiz, seguida por la prueba confirmatoria de PCR. La prueba Rosa de Bengala es una prueba de campo de simple realización con una especificidad de 100% y una sensibilidad de 75%, (Corbel, 2009 y Tizard, 1995). Por lo tanto se acepta la primera hipótesis alternativa.

Para estudios de seroprevalencia en lugares donde no se practica la vacunación contra la brucelosis, como es el caso de esta provincia en la mayoría de la ganadería no lo hacen. De los 200 animales criollo salieron 26 positivo, por el otro lado de la 200 muestras tomado de la muestras de la raza europea arrojaron 32 positivo esto los animales criollo representan magníficas ventajas frente a otras áreas ganaderas donde la infección está presente y constituyen permanentes amenazas para la salud animal y la salud pública. Por lo tanto se acepta la otra hipótesis alternativa.

Las razas europea obtuvo mayor porcentaje de incidencia de esta enfermedad, lo que un factor para que se presente Brucelosis abortus es que las hembras en esa ganadería fueron adquiridos en feria ganadera y no fueron chequeados antes de ser ingresados al hato, lo que coincide con Corbel et al; (2009), que indican que una forma de prevenir la presencia de *B. abortus* en el rebaño es llevando a cabo un manejo seleccionado como: diagnóstico, vacunación, sistema de vigilancia, saneamiento ambiental, técnicas de manejo, desecho de los productos provenientes de hatos o animales infectados.

El diagnóstico de la brucelosis se realiza mediante la utilización de distintos métodos, los que de acuerdo con las características de la enfermedad, permiten determinar la situación en el hombre y los animales en esta provincia.

Las parroquias más afectadas por esta enfermedad se establecen en las zonas de San Jacinto del Búa y Puerto Limón 10 y 9 % respectivamente debido posiblemente

a que los ganaderos no aplican medidas profilácticas y una oportuna vacunación de las terneras entre los 3 y 6 meses de edad.

El efecto de la brucelosis se lo mide a través de la producción de leche que la vaca deja de producir cuando esta aborta, debido a que se producen cambios hormonales en el animal por la ausencia de la oxitocina, induciendo a la producción de progesterona que inhibe la producción de leche, además se debe considerar lo indicado por Acha (2001), quienes manifiestan que son muy pocas las vacas infectadas que se curan completamente por lo tanto se las debe considerar portadoras permanente de la infección por lo que el ganadero debe optar por deshacerse de los animales con brucelosis.

Los índices indican en el presente trabajo de investigación, que la Brucelosis bovina se encuentra en umbrales considerados peligrosos en los hatos ganaderos de la, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. En la que se deberán tomar todas las medidas necesarias de control y erradicación para así evitar la diseminación de esta enfermedad, que originan grandes pérdidas económicas.

Los índices indican en el presente trabajo de investigación, que la Brucelosis bovina se encuentra en umbrales considerados peligrosos en los hatos ganaderos de la provincia de los Tsáchilas. En la que se deberán tomar todas las medidas necesarias de control y erradicación para así evitar la diseminación de esta enfermedad, que originan grandes pérdidas económicas.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

De la presente investigación se determinaron las siguientes conclusiones y recomendaciones.

5.1. Conclusiones

- La raza criolla presento 26 de casos positivos con un equivalente a 13%, en cambio la raza europea 32 casos positivos con un equivalente al 16 %.
- La sensibilidad y especificidad de esta prueba (Rosa de Bengala) fue de 14.5 y 85.5 % respectivamente.
- La presencia de *Brucella abortus*, en los hatos ganaderos es mayor en las razas europea que la criolla. El análisis mediante la Prueba No Paramétrica de χ^2 no determinó significancia estadística ($P \leq 0.05$).
- Se estableció que el costo para cada una de técnica utilizada fue para la prueba rosa de bengala de \$ 1.26 mientras que para la técnica de PCR es \$ 6,16.
- Se determinó que las pérdidas económicas producidas en vacas enfermas es de \$ 886 Dólares.

5.2. RECOMENDACIONES

- Sacrificar a los animales con reacción positiva a brucelosis en la presente investigación, para evitar de esta manera posible contagio y la diseminación de la enfermedad.

- Aplicar con carácter obligatorio a la vacunación a animales destinados a la reproducción con el fin de llevar un control epidemiológico de esta enfermedad.
- Tomar las medidas preventivas más adecuadas para poder llegar a mantener la zona con niveles bajos de infección.
- LaPCR es una buena alternativa ya que es económica, rápida y segura, por lo que puede ser utilizada para detectar brucelosis en sangre total, y como una herramienta para comprobar si la muestras realizada con rosa de bengala es positiva.
- Que las personas que laboren en el manejo de los animales, sean sometidos a un análisis con la Técnica molecular (PCR) para conocer si han sido infectados.
- Concientizar a los productores a realizar análisis de seroaglutinación a todos los animales.
- Que los gobiernos actuales realicen campañas de difusión, control y erradicación, dando a conocer los riesgos que representa la brucelosis como enfermedad tanto en el hombre como en la producción animal que repercute en lo económico.

CAPITULO VI.

BIBLIOGRAFIA

6.1. BIBLIOGRAFÍA

1. **Acha, P.** 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3a ed. Washington, editorial O. P. S, p 28 – 52.
2. **Arestegui .M.B. y Gualtieri. C.** 2005. Brucelosis bovina. Cátedra de Sueros y Vacunas. Facultad de Cs. Veterinarias UNR. México.
3. **Blood, D., Radostits, O.** 1992. Medicina Veterinaria.7a ed. México. Editorial Interamericana p 729 – 750.
4. **Boffil, P.; Rivas, A.; Ramirez, W.; Montañez, J.; Martínez, A.; Quincoses, T.; González, L. R. y Fustes, E.**1989. "Manual de Enfermedades Infecciosas". Tomo I. Ed.S.A.C.H., M.E.S. Brucelosi bovina. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.69, n.4, p.41- 47.
5. **Cancellan, A.**1981. Manejo de animales: Salud y Enfermedad. Editorial Aedos segunda edición Barcelona – España.
6. **Cherwonogrodzky, J.W., Dubra, Y. G., Moreno, E., Mayer, H.** 1990. Antigens of Brucella. In: Nielsen K. y Duncan J.R, (Eds.) Animal Brucellosis. CRC Press, Boca Raton, 19-64 pp.
7. **Corbel, M.J., Bringley Morgan, W.J.** 2009. OIE (World Organisation for Animal Health). In. Manual of Diag-nostic and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.8.5. Genus Brucella. In: Bergey's Manual of Determinative Bac-teriology. Krieg N.R, Holt J.G. (Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, USA, (1984, OIE 2009) 377-388 pp.

8. **Cranford, L.** 1972. Medicina veterinaria 7a ed. España, editado por Interamericana Hill Mc. Crows P 25 - 35
9. **FAO/OMS.** 1986. Sexto informe del Comité Mixto de Expertos en Brucelosis. Serie de Informes técnicos 740. Ginebra.
10. **Ferreira. C. R; Amores. S.I.**2009. Extracción de ADN a partir de Muestras de Biopsias.Disponible en la página de internet. *Consultado en marzo del 2009.*
11. **Leal-Klevezas D. S; Martínez-Vásquez I. O; López-Merino A, et al.** 1995b. Single step PCR for the detection of Brucella spp. From blood and milk of infected animals. J. Clin. Microbiol. 33, 3087-3090.
12. **Merchán, I., Packer.** 1970 Bacteriología y Virología Veterinaria 3era. Ed.Acribia., p 339 – 340.
13. **OPS.** (Organización Panamericana de la Salud) 1986. Programa de adiestramiento en Salud Animal para América Latina, Cuarentena Animal; Bogotá, Colombia. OMS/OPS/BID. 315 – 318p Vol 1.
14. **Paulin, L.M.S.** 2006a. Estudio comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecciones por Brucellaabortus en búfalos (Bubalusbubalis). São Paulo, 2006. 92p. Tese (Doutorado) – Facultades de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidad de São Paulo, São Paulo.
15. **Paulin, L.M.S.** 2006b.Brucelosis en animales de América del Sur. Estrategias de control. In: CACHIONE, R. A.; DURLACH, R.; LARGHI, O.P.; MARTINO, P. (Ed.). Temas de zoonosis III. Buenos Aires: Asociación Argentina de Zoonosis, p.130-140.

16. **Paulin, L.M.S.; Prado, G.E.S.; Federsoni, I.S.P.; Teixeira, A.C.; Castro, V.; Genovez, M.E.** 2002. Estudo comparativo dos testes 2-mercaptoetanol e reacao de fixação do complemento no sorodiagnóstico.
17. **Plommet, M.** 1972. "Survie the Brucella abortus dans le lisier the bovins Desinfection par le xylene". Ann. Rech. Vet. . 10 (2): 19-23.
18. **Priadi, U. N.; Hirst, R. G.; Soeroso, M. y Koesharyono, C.** 1992. "Infección de Brucellasuis como Zoonosis en Java". Balai Penelitian Veteriner. Bogor. Indonesia. 24 (44):110-112.
19. **Rhaway, N.** 1993. "Manual Merck de Veterinaria". España.
20. **Revet.** 2007. Revista electrónica de Veterinaria. Volumen VIII Número 4. Eva E. Ortiz Losada MSc, Eladio Silva Cabrera Dr. C., Maricela Izquierdo Márquez. Normalización y evaluación del inmunoensayo ABICAP-BRU para el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina. La Habana, Cuba.
21. **Romero C; Gamazo C; Pardo M, et al.** 1995a.- Specific detecction of Brucella DNA by PCR. J. Clin. Microbiol. 33. 615-617.
22. **Samartino, L.** 2003. Conceptos generales de la brucelosis bovina INTA, Instituto nacional de tecnología agropecuaria. Castelar, Argentina.
23. **Samartino, L.; Navarro, F.; Gregoret, R.** 1997. La Aplicación de la Técnica Antígeno Buferado en Placa (BPA) como prueba tamiz en el diagnóstico de la Brucelosis. IV Jornada Científica-Técnica. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba. Argentina. 20 y 21 de Agosto.
24. **Sandoval. V. P.** 2007. Manual de normas y procedimientos para la toma y envío de muestras para el laboratorio veterinario, estandarización y validación de

pruebas para el diagnóstico y plan de contingencia de brucelosis. SESA. Servicio ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria.

25. SESA. (2002). Servicio ecuatoriano de Sanidad Animal. Control de Brucelosis Bovina. Manual Técnico, Quito, Ec.

26. Tizard, I. 1995. Inmunología Veterinaria. 4° Edición. México, Interamericana 245-249.

27. Yong. E.J. 1994. *Brucella* species. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Disease. New York: Churchill Livingstone, 2.053-2.060.

ANEXOS

**ANEXO I.- Evaluación de casos positivos mediante la Prueba No Paramétrica
para una sola muestra, Prueba de Chi Cuadrado para las razas.**

Casos Positivos	Fo	Fe	(Fo – Fe)	(Fo – Fe) ²	(Fo – Fe) ² /Fe
Criollos	26	29	3	9	0.31
Europeo	32	29	-3	9	0.31
Total	58	58	0	NS	0.62

$$58/2=29$$

El resultado obtenido es 0.62.

Los g.l. = (r – 1)

$$g.l. = 2 - 1 = 1$$

$$g.l. = 1$$

Buscamos en la tabla χ^2 con un α 0,05 y 1 g.l. = **3,841**; Por tanto no se acepta la hipótesis de investigación porque el χ^2 calculado es inferior al χ^2 de la tabla. No hay significancia estadística ($P \leq 0.05$).

ANEXO II. Evaluación de casos positivos mediante la Prueba No Paramétrica para una sola muestra, Prueba de Chi Cuadrado para la procedencia.

Casos Positivos	Fo	Fe	(Fo – Fe)	(Fo – Fe) ²	(Fo – Fe) ² /Fe
Valle Hermoso	2	7.25	-5,25	27.56	3.80
San Jacinto del Búa	20	7.25	12.75	162.56	22.42
Puerto Limón	18	7.25	10.75	115.56	15.94
El Esfuerzo	3	7.25	- 4.25	18.06	2.49
Alluriquín	2	7.25	-5.25	27.56	3.80
Luz América	4	7.25	-3.25	10.56	1.46
Santa María del Toachi	3	7.25	-4.25	18.06	2.49
La Concordia	6	7.25	-1.25	1.56	0.22
TOTAL	58	58	0	*****	52.62

$$58/8 = 7.25$$

El resultado obtenido es 52.62.

$$\text{Los g.l.} = (r - 1)$$

$$\text{g.l.} = 8 - 1 = 7$$

$$\text{g.l.} = 7$$

Buscamos en la tabla χ^2 con un α 0,05 y 7 g.l. = **14,067**; Por tanto si se acepta la hipótesis de investigación porque el χ^2 calculado es superior que el χ^2 de la tabla. Si hay significancia estadística con respecto a la procedencia. ($P \leq 0.05$).



Foto.1. Hato en el recinto El esfuerzo caudal



Foto.2. Toma de la muestra de la parte



Foto.3. colocación de la sangre extraída en el tubo



Foto.4. Muestra almacenada para respectivo análisis



Foto.5. colocación de muestra en aglutinoscopio



Foto.6. Muestra para ser analizada



Foto.7. Análisis de muestra



Foto.8. Muestra positiva y negativa

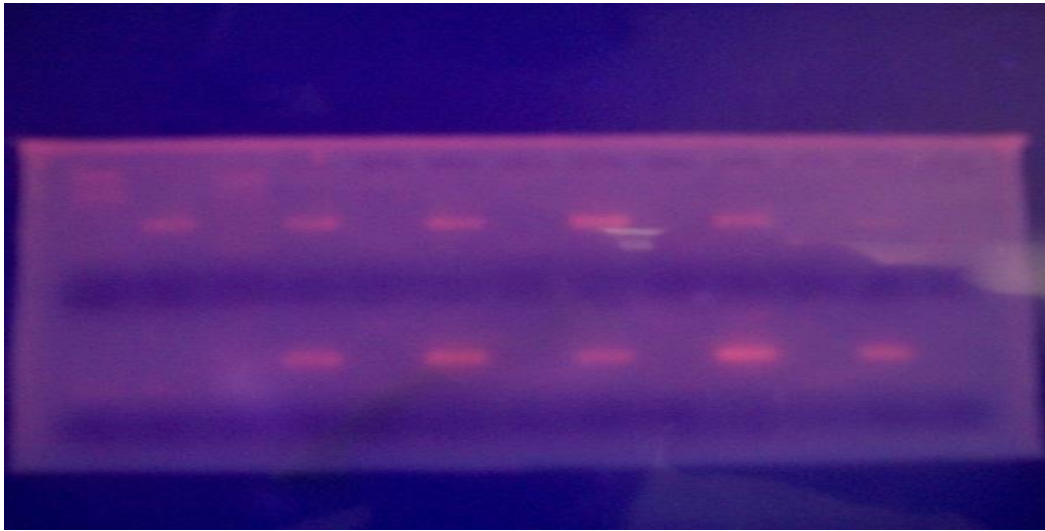
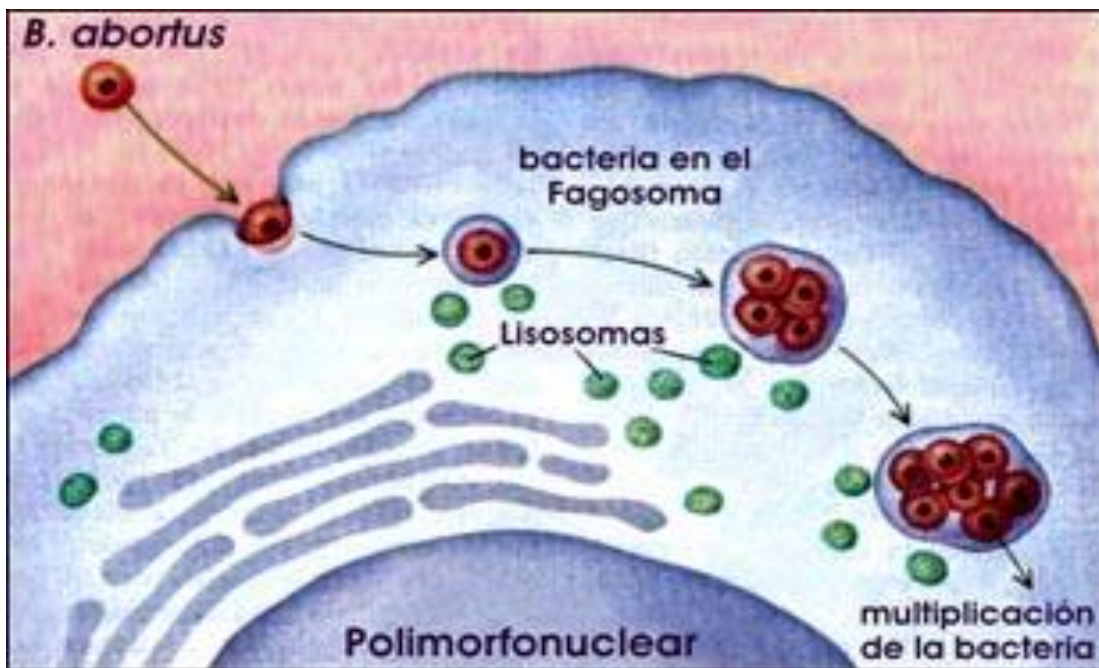


Foto.9. Confirmación con PCR



Penetración de la bacteria *Brucella*spp al huésped