



PORTADA

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

Tema tesis

**“INCIDENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA (*Brucella abortus*) EN EL
CANTON PICHINCHA, PROVINCIA DE MANABÍ”.**

**Previo a la obtención del título de:
INGENIERO AGROPECUARIO**

Autor

RUBÉN DARÍO VERA GANCHOZO

Director de Tesis

ING. ORLY CEVALLOS FALQUEZ

PICHINCHA – MANABI - ECUADOR

2013

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Rubén Darío Vera Ganchozo**, 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 la normatividad institucional vigente.

RUBÉN DARÍO VERA GANCHOZO

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

El suscrito, **Ing. Orly Cevallos Falquéz**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el Egresado **Rubén Darío Vera Ganchozo**, realizó la tesis de grado previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario de grado titulada “**INCIDENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA (*Brucella abortus*) EN EL CANTON PICHINCHA, PROVINCIA DE MANABI**” bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

ING. ORLY CEVALLOS FALQUÉZ, MSc.
DIRECTOR DE TESIS



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

**“INCIDENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA (*Brucella abortus*) EN EL
CANTON PICHINCHA, PROVINCIA DE MANABÍ”.**

TESIS DE GRADO

Presentado al Comité Técnico Académico como requisito previo a la obtención
del título de **INGENIERO AGROPECUARIO**

Aprobado:

**Ing. Lauden Rizzo Zamora, MSc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

**Ing. Guido Álvarez Perdomo, MSc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE TESIS**

**Ing. Geovanny Suárez Fernández, MSc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE TESIS**

QUEVEDO - LOS RÍOS – ECUADOR

AÑO 2013

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, porque en sus aulas, recibimos el conocimiento intelectual y humano de cada uno de los docentes de esta digna institución.

Especial agradecimiento a mi Director de Tesis el Ing. Orly Cevallos Falquéz por sus conocimientos y amistad.

Agradezco a todas las personas que de una u otra forma estuvieron conmigo, porque cada una aportó con un granito de arena.

A ti Dios mío, por darme la oportunidad de existir así, aquí y ahora; por mi vida, que la he vivido junto a ti. Gracias por iluminarme y darme fuerzas y caminar por tu sendero.

A ti Papi, por tu incondicional apoyo, tanto al inicio como al final de mi carrera; por estar pendiente de mí a cada momento. Gracias Papá por ser ejemplo de arduo trabajo y tenaz lucha en la vida.

A ti Mamá, que tienes algo de Dios por la inmensidad de tu amor, y por ser mi ángel de la guarda y por tus incansables cuidados. Porque si hay alguien que está detrás de todo este trabajo, eres tú, que has sido, eres y serás el pilar de mi vida.

A ti Ñaño, porque juntos aprendimos a vivir, crecimos como cómplices día a día y somos amigos incondicionales de toda la vida, compartiendo triunfos y fracasos. Doy gracias a Dios porque somos hermanos.

A ti, querida y adorada esposa, que me has ayudado a continuar, haciéndome vivir los mejores momentos de mi vida. Gracias a ti mi Flaca tu cariño y comprensión, porque sé que siempre contaré contigo.

A mi familia, ustedes queridos abuelitos, tíos y primos, porque de una u otra forma, con su apoyo moral me han incentivado a seguir adelante, a lo largo de toda mi vida.

A todos, mis amigos y amigas que me han brindado desinteresadamente su valiosa amistad, entre ellos a mis padrinos; gracias por ser la sal que condimenta mi vida.

DEDICATORIA

A Dios, verdadera fuente de amor y sabiduría.
A mi padre, porque gracias a él sé que la responsabilidad se la debe vivir como un compromiso de dedicación y esfuerzo. A mi madre, cuyo vivir me ha mostrado que en el camino hacia la meta se necesita de la dulce fortaleza para aceptar las derrotas y del sutil coraje para derribar miedos. A mi hermano, el incondicional abrazo que me motiva y recuerda que detrás de cada detalle existe el suficiente alivio para empezar nuevas búsquedas. A mi esposa y a mis hermosas hijas, Va por ustedes por que las adoro. A mis familiares, viejos amigos y a quienes recién se sumaron a mi vida para hacerme compañía con sus sonrisas de ánimo.

Rubén Darío Vera.

ÍNDICE

Portada	I
Declaración de autoría y cesión de derechos	II
Certificación del director de tesis	III
Agradecimiento	V
Dedicatoria.....	VII
Resumen ejecutivo	XII
Abstrac.....	XIII
CAPÍTULO I.....	1
MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN	1
1.2. Objetivos	4
1.2.2. Específicos.....	4
1.3. Hipótesis	4
CAPÍTULO II.....	5
MARCO TEÓRICO	5
2.1. Brucelosis	5
2.1.1. Generalidades.....	6
2.1.2. Brucelosis bovina.....	7
2.1.3. Etiología	8
2.1.4. Epidemiología	8
2.1.5. Patogénesis	9
2.1.6. Transmisión	12
2.1.7. Resistencia	13
2.2. Diagnóstico de brucelosis bovina.....	13
2.2.1. Métodos directos.....	13
2.2.2. Diagnóstico bacteriológico	13
2.2.3. Diagnóstico por PCR	14
2.3. Métodos indirectos: serología	14
2.4. Supervivencia de brucella en el ambiente.....	16
2.5. Obtención de la muestra para serología	17
- obtención del suero	17
-conservación del suero	17

Capítulo iii	21
Metodología de la investigación.....	21
3.1. Materiales y métodos.....	21
3.1.1. Localización y duración del experimento	21
3.1.2. Datos generales del cantón pichincha provincia de manabí	22
3.2. Materiales y equipos	23
3.3. Protocolo.....	24
3.3.1. Introducciones.....	24
3.3.1.1. Manejo del antígeno.....	24
3.3.1.2. Aglutinoscopio.....	25
3.3.1.3. Pipetas	25
3.3.1.4. Goteros	25
3.3.2. Técnica de la prueba en placa	25
3.3.3. Lectura de la prueba en placa.....	27
3.3.3.1. Los signos utilizados para la interpretación de los resultados	27
3.4. Metodología	29
3.4.1. Campo	29
3.4.2. De laboratorio	30
3.4.3. Protocolo de extracción de adn por el método de tens.	30
3.4.3.1. Cantidad y compensación del adn extraído	31
3.4.3.2. Diseño de los iniciadores sintéticos	31
3.4.4. Protocolo de pcr simple.....	32
3.4.5. Análisis electroforético de los productos obtenidos en la pcr simple.	33
3.4.6. Diseño experimental	33
3.4.6.1. Método porcentual	33
3.5. Mediciones experimentales.....	34
3.5.1. Prevalencia de brucelosis bovina.....	34
3.5.2. Prevalencia de brucelosis bovina por raza criolla y europea	34
3.5.3. Zonas de mayores prevalencias.	34
3.5.4. Determinación de las pérdidas económicas.....	34
3.5.5. Sensibilidad y especificidad de la pruebas de rosa de bengala.	35
3.5.6. Costo por diagnóstico	35
Capítulo iv	36
Resultados y discusión	36

4.1. Resultados	36
4.1.1. Prevalencia de brucelosis bovina en el cantón pichincha	37
4.1.3. Pérdidas económicas.....	40
4.1.4. Sensibilidad y especificidad de la prueba de rosa de bengala.....	41
4.1.5 costos por diagnóstico	42
4.2. Discusión	43
Capítulo v.....	46
Conclusiones y recomendaciones	46
5.1. Conclusiones	48
5.2. Recomendaciones	49
Capítulo vi	50
Bibliografía.....	50
6.1. Literatura citada	50
Capítulo vii	55
Anexos.....	55
7.1. Anexos.....	55
Anexo 1. Fotografías de la investigación	56
Anexo 2. Fotografías del proceso de aglutinación con rosa de bengala.....	57
Anexo 3. Resultados de la investigación.	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Condiciones meteorológicas del cantón Pichincha, en incidencia de brucelosis bovina (<i>Brucella abortus</i>) en el cantón Pichincha, provincia de Manabí.	21
2	Detalle de materiales y equipos en, incidencia de brucelosis bovina (<i>Brucella abortus</i>) en el cantón Pichincha, provincia de Manabí.	22
3	Cantidades de suero antígeno y diámetros	25
4	Interpretación de los resultados	27
5	Juegos de iniciadores utilizados en la detección de brucelosis.	30
6	Porcentaje de bovinos reaccionantes a la prueba de Rosa de Bengala, cantón Pichincha, 2013.	36
7	Porcentaje de bovinos reaccionantes a la prueba de Rosa de Bengala, por zonas en el cantón Pichincha, 2013.	37
8	Comprobación de reactores positivos con la técnica de PCR, cantón Pichincha, 2013	38
9	Estimación en dólares de la pérdida causada por el aborto producido en el cantón Pichincha, 2013.	39
10	Costos en dólares da la prueba de brucelosis en muestras de sangre de bovinos. Laboratorio de biotecnología. UTEQ. Quevedo, 2013	41

RESUMEN EJECUTIVO

La investigación realizada tuvo por objeto determinar la prevalencia de Brucelosis bovina en el Cantón Pichincha, Provincia de Manabí, mediante las pruebas de Rosa de Bengala y confirmación con la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El estudio se desarrolló en el Cantón Pichincha, Provincia de Manabí, durante los meses de enero a marzo del 2013. Para la investigación, se tomaron muestras de 5cc de sangre por individuo adulto, obteniendo un total de 300 muestras de animales bovino de las razas criollo y mestizos.

Los animales utilizados en la investigación fueron seleccionados en las fincas que fueron previamente asignadas para el muestreo de los animales; y, en cada finca se tomó las muestras de acuerdo al número de muestras asignadas. La muestra de sangre se extrajo de la vena coccígea media, se extrajo 5 ml/animal. La sangre se dejó reposar por unos minutos luego se tomó el suero.

En laboratorio, se utilizó el método de aglutinación rápida con antígeno de Brucella en Rosa de Bengala y confirmación con la prueba (PCR). Con esta prueba se detectó los animales infectados.

Los casos positivos fueron evaluados mediante la Prueba No Paramétrica para una sola muestra. De un total de 300 muestras recolectadas en 20 hatos del cantón Pichincha provincia de Manabí, se tienen 234 unidades bovinas negativas a brucelosis y 66 unidades bovinas reaccionaron positivas a brucelosis lo que produce un total de 28,21 % de prevalencia. La pérdida causada por esta enfermedad es de \$ 532,50 por animal

Palabras Clave: Bovino, Brucella, Rosa de Bengala

ABSTRACT

The carried out investigation had for object to determine the prevalence of bovine Brucellosis in the Canton Pichincha, County of Manabí, by means of the tests of Rose of Flare and confirmation with the reaction test in chain of the polymerase (PCR). The study was developed in the Canton Pichincha, County of Manabí, during the months of January to March of the 2013. For the investigation, they took samples of 5cc of blood for mature individual, obtaining a bovine total of 300 samples of animals of the Creole races and mestizos.

The animals used in the investigation were selected in the properties that were previously assigned for the sampling of the animals; and, in each property he/she took the samples according to the number of assigned samples. The sample of blood was extracted of the vein half coccyges, 5 ml/animal was extracted. The blood was allowed to rest then for some minutes he/she took the serum.

In laboratory, the method of quick agglutination was used with antigen of Brucella in Rosa of Flare and confirmation with the test (PCR). With this test it was detected the infected animals.

The positive cases were evaluated by means of the Non Parametric Test for a single sample. Of a total of 300 samples gathered in 20 clusters of the canton Pichincha county of Manabí, 234 negative bovine units are had to brucellosis and 66 bovine units reacted positive to brucellosis what produces a total of 28, 21 prevalence%. The loss caused by this illness is of \$532,50 for animal

Key Words: Bovine, Brucella, Rosa of Flare

CAPÍTULO I

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Introducción

La brucelosis es una de las cinco zoonosis bacterianas más comunes en el mundo, producida por una bacteria de vida endo celular facultativa, de gran impacto tanto en la salud pública como en la producción pecuaria. Afecta la economía de los países que aún no la han podido erradicar y produce pérdidas económicas en la industria pecuaria, por la disminución en la producción de carne como consecuencia de los abortos, nacimientos de crías débiles, muerte perinatal de terneros, lechones, chivitos, menor producción de leche, disminución de la fertilidad, esterilidad.

La comunidad científica cataloga a la brucelosis (*Brucella abortus*) como una de las zoonosis más importantes en el mundo (Dajer et al., 1998).

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 (Corbel, 2009).

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.

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. SESA (2002).

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.

En nuestro país existen alrededor de 4' 486.021 unidades bovinas, siendo Manabí la provincia donde se encuentra el mayor número de cabezas de ganado de todo el país con explotaciones dedicadas a la producción de carne y leche lo que estima un aproximado de 783.592 cabezas.

En el Ecuador., se le considera a la brucelosis como el principal problema en la reducción de la producción de leche y carne con pérdida que van más allá \$ 3000.000 anual (Sesa, 2002).

El diagnóstico de la brucelosis es relativamente complejo porque la fase de incubación es variable, promete pocos síntomas clínicos como el aborto, reducción en la producción de leche, nacimiento de crías débiles.

Por esta razón el diagnóstico debe basarse en una combinación de prueba serológica y la prevalencia histórica del rebaño, esta enfermedad infectocontagiosa, aguda y crónica, caracterizada por el aborto en la hembra al final de la gestación, el mismo que sobreviene especialmente en los últimos meses de gestación, es un síntoma que hace pensar en la infección por brucelosis y cifras elevadas de infertilidad, además, se puede presentar retención placentaria (Homedes, 1963).

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 (Paulin, 2006 a).

1.2. Objetivos

1.2.1. General

- Determinar la prevalencia de Brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en el Cantón Pichincha Provincia de Manabí 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 el Cantón Pichincha Provincia de Manabí 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 el Cantón Pichincha Provincia de Manabí.
- La prueba Rosa de Bengala, representa una herramienta certera en el estudio de focos de la enfermedad.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Brucelosis

2.1.1. Generalidades

La brucelosis bovina es una enfermedad contagiosa del ganado bovino, También se transmite al hombre. Produce abortos, retención de placenta y producción de crías débiles. El Agente Causal es la bacteria *Brucella abortus*. Se ubica intracelularmente por lo que no es posible eliminarla del organismo con el uso de antibióticos es sensible al medio ambiente, con los desinfectantes comunes muere fácilmente. **(Boffil et al., 1989).**

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.

El único síntoma visible es el aborto espontaneo que se produce en el último tercio de la preñez. Puede ser diagnosticada por pruebas serológicas que detectan la presencia de anticuerpos. Las hembras que adquieren el contagio pueden presentar sobrerreacción 6 semanas a 6 meses después. **(Corbel, 1997).**

2.1.2. Brucelosis bovina

La enfermedad presenta diferentes tasas de incidencia y prevalencia de acuerdo a los países y las diferentes regiones. La brucelosis bovina es aún una enfermedad muy extendida en algunos países de África, Asia, América y Europa (fundamentalmente Rusia). Las especies de *Brucella* difieren marcadamente en su capacidad de producir enfermedad en el hombre. *B. melitensis* es la más patógena y está emergiendo como un serio problema en la Salud Pública de los países en desarrollo, mientras que *B. abortus* está asociada con una infección menos frecuente y en mayor proporción en casos subclínicos. **(Boffil et al., 1989).**

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).**

En Ecuador la *Brucella abortus* es la principal causa de brucelosis en el hombre, siendo *B. canis* la menos importante. La infección en seres humanos depende de los reservorios animales y se produce usualmente, por la exposición de tipo ocupacional o por el contacto con animales infectados, sus carcasas, o debido al consumo de productos contaminados. **(Sesa, 2002).**

La respuesta inmune de los bovinos ante la infección o vacunación con *B. abortus*, revierte gran importancia para el diagnóstico y vigilancia de la enfermedad. Los isótopos de inmunoglobulinas que intervienen en la respuesta inmune contra *Brucella abortus* son las inmunoglobulinas M (IgM),

inmunoglobulinas G (IgG) e inmunoglobulinas A (IgA). **(Cortina y Fernández, 1991).**

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 Brucellaceae 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, etcétera. En los animales silvestres, en las ratas del desierto, y otros muridos, 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

El género *Brucella* se caracteriza por ser un parásito intracelular facultativo. Es importante considerar esta característica en el estudio de la patogenia, patología, manifestaciones clínicas y control de la enfermedad. Las brucellas pueden ingresar al organismo a través de las mucosas, siendo la vía oral la de mayor frecuencia por la ingestión de productos animales contaminados, aunque también pueden acceder a través de la vía conjuntival y a erógena mediante aerosoles. Puede ocurrir infección fetal en distintos períodos de la gestación (infección congénita), o en el recién nacido (infección neonatal) a través del calostro, leche o el medio ambiente. **(Arestegui y Gualtieri, 2005)**.

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 ilíacos **(Blood y Radostits, 1992)**.

Las brúcelas 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 córeo, propagándose por entre la mucosa uterina y el córeo, 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. **(Cranford, 1972).**

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 **(Merchan 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 morbo, el feto es expulsado en el plazo normal o se produce simplemente un parto prematuro **(Crawford, 1986).**

Las Brucellas virulentas necesitan evadir la fusión del fago-lisosoma para multiplicarse dentro de los fagocitos profesionales y no profesionales. La eficiencia en la replicación endocelular parecería ser independiente de la adherencia. La cadena O del LPS ha sido implicada como una molécula clave en la sobrevivencia endocelular. **(Arestegui y Gualtieri, 2005).**

Brucellaspp. 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.

El periodo de incubación oscila de 2 a 3 semanas, pero puede ser mayor (300 días o más) dependiendo del tamaño del inóculo y la vía de infección. Después del ingreso al organismo, los microorganismos son rápidamente fagocitados. La *Brucella* sobrevive y se multiplica en las células fagocíticas e inhibe los mecanismos bactericidas. El SFM es utilizado por la bacteria como medio para su diseminación y persistencia. Las bacterias una vez que atraviesan la puerta de entrada alcanzan la vía linfática y se multiplican en los ganglios regionales. **(Arestegui y Gualtieri, 2005).**

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 degranulación de los gránulos peroxidasa positivos de los PMN, y el sistema antibacteriano mieloperoxidasa H₂O₂ **(Yong, 1994).**

Si no abortaran podrían quedar como portadoras eliminando *Brucellas*, al igual que sus crías. Una explicación al menos parcial de este hecho estaría dada por el aumento del eritritol placentario, potente factor de replicación en la mayoría de las especies domésticas. La presencia de eritritol en los testículos, glándulas seminales, y en los tejidos embrionales y fetales, estimula la multiplicación de la *Brucella*. **(Arestegui y Gualtieri, 2005).**

En las infecciones crónicas, la bacteria se localiza en el útero, glándula mamaria, testículos, glándulas sexuales masculinas accesorias y ganglios linfáticos. El género *Brucella*, expresa su tropismo por diferentes órganos y tejidos (placenta, glándula mamaria, órganos sexuales, articulaciones, bolsas sinoviales, pulmón y abomaso fetal) con periodicidad desconocida. Finalmente se excreta en exudados uterinos, fetos abortados, leche, semen y orina. De esta manera,

completa el ciclo infeccioso y posibilita el inicio de otros. **(Arestegui y Gualtieri, 2005).**

2.1.6. Transmisión

Como fuentes de infección se plantean los fetos, envolturas fetales y descargas vaginales que contienen gran número de microorganismos pertenecientes al género *Brucellas* (Boffilet *al.*, 1989), además de las heces fecales, leche y el esperma de los toros. Tienen también un significado trascendental los alimentos de origen animal, productos y subproductos de matadero no procesados correctamente. (Bathke, 1981). La vía de penetración más importante es el tracto gastrointestinal por ingestión de pastos, forrajes y aguas contaminadas (Boffil y 1989), además de la costumbre de las vacas de lamer otros animales y superficies contaminadas (Bathke, 1981).

Cotrina y Fernández en 1991 planteó que la *Brucella* penetra al organismo por las membranas mucosas, considerando la conjuntiva como vía más común. En la transmisión mecánica se señalan los perros y animales de rapiña que llevan fetos y envolturas fetales a lugares no afectados, sin dejar de mencionar al hombre. La transmisión vertical-horizontal se plantea en un 5% y el semen de toros infectados desempeña un papel importante en la transmisión (Cotrina y Fernández, 1991).

Como fuentes de infección se plantean los fetos, envolturas fetales y descargas vaginales que contienen gran número de microorganismos pertenecientes al género *Brucellas* (Boffil et al., 1989), además de las heces fecales, leche y el esperma de los toros. Tienen también un significado trascendental los alimentos de origen animal, productos y subproductos de Matadero no procesados correctamente. (Bathke, 1981).

La vía de penetración más importante es el tracto gastrointestinal por ingestión de pastos, forrajes y aguas contaminadas (Boffil, 1989), además de la costumbre de las vacas de lamer otros animales y superficies contaminadas (Bathke, 1981).

2.1.7. Resistencia

La edad, sexo, tiempo de gestación y la resistencia natural a la enfermedad pueden influenciar la evolución de la infección. Las terneras nacidas de hembras infectadas usualmente son cero negativas a *Brucella* por un largo período (Bercovich, 1998). Debido a que el tiempo de gestación al momento de la infección determina el período de incubación, el aborto en bovinos causado por *B. abortus* raramente ocurre antes del cuarto o quinto mes de gestación (Bercovich, 1998). Las hembras preñadas son más susceptibles a contraer la enfermedad que las no preñadas o los machos. Esto sucede porque el útero grávido facilita el crecimiento del microorganismo (Crawford *et al.*, 1990). Además, el curso e incidencia de la enfermedad son también influenciados por la resistencia natural a la infección con *Brucella* (Bercovich, 1998).

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.

2.2.2. 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).**

2.2.3 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* y 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 las 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. **(Yong, 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.

- 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.

-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).

2.6. Investigaciones relacionadas

El objetivo de esta investigación fue: Determinar y comparar la presencia de Brucelosis del personal que labora en los camales de los cantones, Buena Fé, Quevedo, El Empalme y Pichincha, utilizando la prueba serológica Rosa de Bengala (RB) y la técnica molecular (PCR). Se utilizó como fuente de ADN y anticuerpos sangre periférica. De un total de 115 muestras de sangre recolectadas al personal que labora en los camales como faenadores y operadores, 54 (47%) y 15 (13%) fueron positivas con RB y PCR respectivamente, dando 61(53%) y 100 (87%) negativas para las dos pruebas correspondientemente. El promedio de casos positivos para las tres poblaciones excepto Pichincha por PCR fue de 3.4% y para RB 39.4%. Se toma atención con el cantón Pichincha debido a que 19 (70.3%) de las muestras salieron positivas con RB de las cuales 12 (44.4%) al ser analizadas con PCR fueron negativas, teniendo una correlación de 52.6%, lo que indica una alta incidencia de la enfermedad. Mientras tanto que de las 8 muestras negativas con RB, 2 fueron positivas con PCR dando una correlación entre negativos del 75%. Las muestras positivas amplificaron un fragmento de 725 pb. 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 humanos. **(Cevallos, et,al 2010).**

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. **(Vera, 2012).**

El presente trabajo de investigación sobre brucelosis bovina se realizó en la provincia de Manabí y su análisis se lo ejecuto en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo El objetivo general de esta investigación fue: Determinar el porcentaje de la *Brucella abortus* en bovino criollo, en la provincia de Manabí mediante la prueba serológica Rosa de Bengala. En este estudio se estipulo el porcentaje de brucelosis en bovino de la raza criolla y europea, en hatos con prevalencia histórica y también se determinó la sensibilidad y especificidad de la prueba Rosa de Bengala (RB). Para determinar el grado de prevalencia de la brucelosis, se muestrearon un total de 334 bovinos (167 criollo y 167 europeo), se alcanzó un positivismo, de 19 (11.37 %); 148 (88.63%) negativo, no así en la raza europea que fue de 30 (17.96 %) de positivo; 137 (82.04%) negativos. La prueba Rosa de Bengala reveló una (sensibilidad 14.63% y especificidad 85.37%). Los resultados muestran que la detección de los animales positivos mediante la prueba de Rosa de Bengala fue específicas y sensibles, por lo tanto la prueba puede ser una herramienta muy útil en el diagnóstico de *Brucella abortus* y en el programa de erradicación. Persiste el riesgo de Brucelosis humana en toda la provincia ante la presencia

de ganado bovino infectado con dicha enfermedad y si no se toma las medidas puede contagiarse al consumir leche y producto lácteo mal pausterizado. Por último se analizó las pérdidas económicas por vaca que aborta la cual fue de \$ 520. **(Arias, 2013).**

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Materiales y Métodos

3.1.1. Localización y duración del experimento

El presente estudio se desarrolló en 20 fincas del Cantón Pichincha Provincia de Manabí. Se tomaron 5cc de sangre por individuos adultos que dan un total de 300 animales bovino criollo y mestizos. Esta investigación tuvo una duración de cuatro meses.

3.1.2. Datos generales del Cantón Pichincha Provincia de Manabí

Pichincha es un cantón de la Provincia de Manabí, está ubicado en el extremo oriental de Manabí, bañado por las aguas del Río Daule, cuyos márgenes es la línea divisoria de esta provincia con Guayas.

Pichincha tiene una extensión territorial de 1075,26 kilómetros cuadrados según los datos del INEC; sin embargo, de acuerdo con la información del Gobierno Municipal la extensión es de 1067.30 kilómetros cuadrados.

El cantón tiene una parroquia urbana o cabecera cantonal, que es Pichincha, y dos parroquias rurales que son San Sebastián, y Barraganete. Limita al norte con Chone, y El Carmen (por el sector de La Manga del Cura), al sur y al este con la provincia del Guayas, y al oeste con los cantones de Bolívar, Santa Ana, y Portoviejo.

En la provincia de Manabí existen 166.185,00 unidades bovinas, de las que 13,930 han tenido abortos; esto corresponde al 8,4 % de la población bovina; el cantón Pichincha tiene 54.013,00 hectáreas de pastos en la que se manejan 32.194,00 unidades bovinas que corresponden al 19, 37% de la población bovina de la Provincia. **(Inec, 2002).**

Cuadro 1. Condiciones meteorológicas en la tesis, “incidencia de brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en el cantón Pichincha, provincia de Manabí”, 2013.

Parámetros	Promedios
Temperatura °C	21.69
Humedad relativa %	86.54
Nubosidad actas	6,57
Precipitación anual mm	793.13

Topografía	Irregular
Zona ecológica	S-t

Fuente: INAMHI 2012.

3.2. Materiales y equipos

El principal material utilizado fueron bovinos hembras adultas de raza criolla presentes en el Cantón Pichincha Provincia de Manabí.

Cuadro 2. Detalle de materiales y en la tesis, “incidencia de brucelosis bovina (Brucella abortus) en el cantón Pichincha, provincia de Manabí”, 2013.

Equipos de Laboratorio	Cantidad
Refrigeradora	1,0
Estufa	1,0
Centrífuga	1,0
Antígeno Rosa de Bengala(Frascos)	1,0
KIT de PCR	2,0
Reloj	2,0
Eppendorf	2000,0
Gasa (paquete)	6,0
	23

Alcohol 90 grados (L)	0,5
Micropipeta	1,0
Punta amarilla2000	4,0
Mandil	1,0
Toallas(paquetes)	2,0
Mascarilla	4,0
Agua destilada(L)	1,0

Materiales y equipos	Cantidad
De campo	
Bovinos	300,0
Tubos vacutainer (tapa roja)	300,0
Tubos vacutainer (tapa lila)	300,0
Jeringuillas de 5 ml.	300,0
Gel refrigerante (pilas)	3,0
Termo	1,0
Tablero	1,0
Esferográficos.	2,0
Lápiz	1,0
Hojas de registro para la toma de muestras.	300,0
Guantes (caja)	1,0
Etiquetas.	300,0
Mapas.	1,0
Gradillas.	5,0
Vestimentas (overol, botas)	2,0
Cintas Scott	2,0
Fundas plásticas	24,0
Equipos y materiales de oficina	Cantidad
Computador	1,0
Calculadora	1,0
Programa de procesamiento de datos1	1,0
Fórmulas de cálculo bovino métrico, etc.)	1,0

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 realizó según normas estándar internacionales.

3.3.1. 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 y Jones 1969).**

3.3.1.2. Aglutinoscopio.

Fabricado en madera. Medidas: largo 45 cm. ancho 35 cm., alto 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 0.03 ml. El uso de estos goteros es muy importante para mantener la relación antígeno-anticuerpo.

3.3.2. Técnica de la prueba en Placa

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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, se comienza a mezclar de abajo hacia arriba es decir de la dilución mayor a la menor.

Cuadro 3. Cantidades de suero antígeno y diámetros en la tesis, “incidencia de brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en el cantón Pichincha, provincia de Manabí”, 2013.

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

5. Se tomó la placa y se hizo un suave movimiento de rotación 5 vueltas a la derecha y 5 a la izquierda.
6. Se volvió 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.
7. Transcurridos cinco minutos de la iniciación de las pruebas se volvió a rotar la placa 3 veces en cada sentido. Se apoyó la placa en el aglutinoscopio y se espero 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 etc.

La posibilidad de determinar si una dilución es reaccíonate 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.

Cuadro 4. Interpretación de los resultados en la tesis, “incidencia de brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en el cantón Pichincha, provincia de Manabí”, 2013.

Bovinos no vacunados o vacunados después de los 8 meses

1/25	1/50	1/100	1/200	RESULTADOS
-	-	-	-	Negativa
I	-	-	-	Negativa

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

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

1/25	1/50	1/100	1/200	RESULTADOS
-	-	-	-	Negativa
	-	-	-	Negativa
+	-	-	-	Negativa
+		-	-	Negativa
+	+	-	-	Negativa
+	+		-	Sospechosa
+	+	+	-	Sospechosa
+	+	+		Sospechosa
+	+	+	+	Positiva

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

3.4. Metodología

3.4.1. Campo

Se realizó las visitas y toma de muestras en campo de acuerdo a la planificación y cronograma de trabajo previamente establecidos. Los animales utilizados en la investigación fueron de cada finca, de acuerdo al número de muestras

asignadas. Se extrajo de la vena coccígea media, 5 ml de sangre por animal. Una vez tomada la muestra se identificó para posteriormente transportarla al laboratorio de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. La sangre extraída se dejó reposar por unos minutos luego se tomó el suero, este suero se congeló.

3.4.2. Análisis 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, con una pipeta de Pasteur se tomó de los tubos de ensayo, que contienen suero sanguíneo, una gota equivalente a 0,03 ml, 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 proceder 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 monitoreó 385 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 (ClNa 0,9%) y centrifugamos por 30 s. 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 Disodium 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 µL¹ 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 minutos. Después de la migración el gel es colocado en la bandeja del transiluminador para observar comparativamente las bandas de ADN y ser fotodocumentado.

3.4.3.2. Diseño de los iniciadores sintéticos

¹ Mililitros

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 5.

Cuadro 5. Juegos de iniciadores utilizados en la detección de brucelosis en la tesis, “incidencia de brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en el cantón Pichincha, provincia de Manabí”, 2013.

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 ADN², 5 µL 10X Buffers KCl; 1U de taq polimerasa; 4 µL de DNTPS (200 mM); 1 µL de oligonúcleítidos (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.

² ARNr. Ácido ribonucleico ribosomal

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 agregó 4 UL de bromuro de etidio (0.5µg/mL), se migró a 75 V durante 40 minutos.

Luego se visualizaron los productos de ADN utilizando un transiluminador de UV y se fotodocumentó. Se utilizó un marcador peso molecular de 100 pb (Gilco BRL) para corroborar el tamaño de las bandas obtenidas.

3.4.6. Diseño experimental

3.4.6.1. 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:

χ^2 = 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. Mediciones experimentales

3.5.1. 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:

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

Dónde:

PBB= Prevalencia de brucelosis bovina.

3.5.2. Prevalencia de brucelosis bovina por raza criolla

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

3.5.3. 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.

3.5.4. 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.

3.5.5. 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.

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

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

3.5.6. Costo por Diagnóstico

Para establecer el costo por diagnóstico por cada una de las pruebas y se consideró los costos totales por muestra.

3.6. Manejo de la investigación

La investigación inició con la selección de 20 fincas ganaderas del cantón Pichincha, en las que se seleccionaron 300 animales (Ver anexo 3), a los que se les extrajo de la vena coccígea 5 ml de sangre, de esta muestra se extrajo el suero, el mismo que fue analizado en laboratorio mediante las prueba de rosa de bengala (RB), los resultados de (RB), fueron confirmados mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descritos en el protocolo de laboratorio para esta pruebas.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

Con los datos de campo obtenidos en la investigación se tiene los siguientes resultados.

4.1.1. Prevalencia de brucelosis bovina en el cantón Pichincha

En el cantón Pichincha, la actividad ganadera se desarrolla en una forma intensa constituyéndose en una de las principales actividades económicas y comercial del cantón que tiene una población aproximada de 32.194,00 bovinos distribuidos en fincas de pequeños, medianos y grandes productores.

Esta población ganadera se encuentra asentada en una superficie de 54.013,00 hectáreas de pastos cultivados y naturales. Según el último censo agropecuario el total de unidades bovinas es 32.194,00 que constituye la población de ganado bovino criollo en Pichincha; de los cuales se evaluó un tamaño de muestra experimental de 300 unidades bovinas criollas y mestizas; de la cuales, como se observa en el cuadro 5 y figura 1, se tienen 234 unidades bovinas criollas negativas a brucelosis y 66 unidades bovinas reaccionaron positivo a brucelosis lo que produce un total de 22,00 % de prevalencia.

Cuadro 6. Porcentaje de bovinos reaccionantes a la prueba de Rosa de Bengala en la tesis, “incidencia de brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en el cantón Pichincha, provincia de Manabí”, 2013.

Total Animales	Número de casos positivos	Número de casos negativos	Porcentaje de prevalencia
300	66	234	22,00

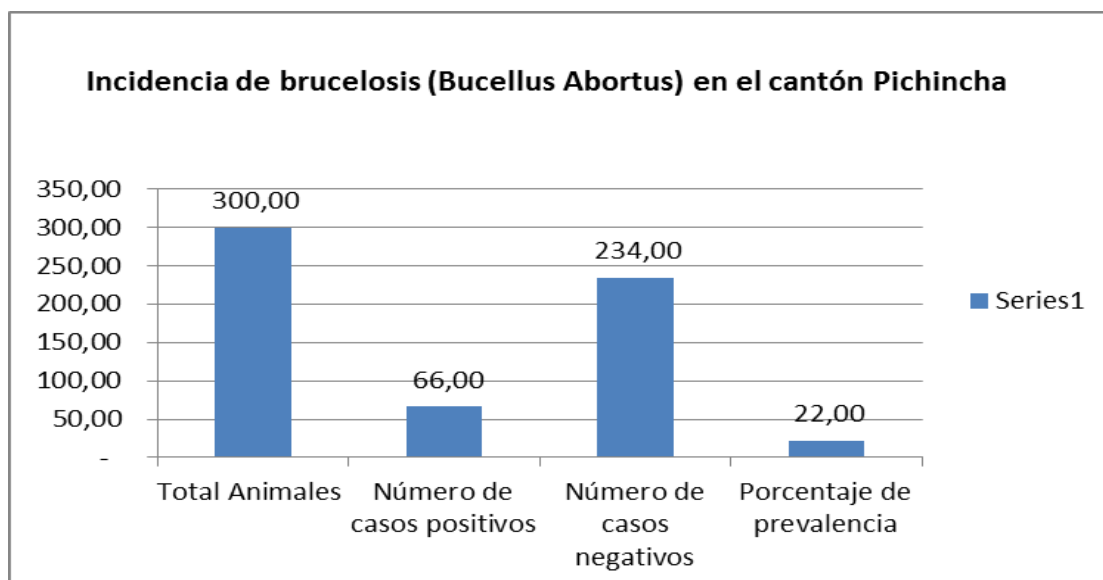


Figura1. Resultados con la prueba Rosa de Bengala, en el cantón Pichincha, 2013.

En la figura1, se observa que del total de la población se tiene un 22,00% de prevalencia de la enfermedad.

4.1.2. Zonas de mayor prevalencia de brucelosis en el cantón Pichincha

Cuadro 7. Porcentaje de bovinos reaccionantes a la prueba de Rosa de Bengala, por zonas en la tesis, “incidencia de brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en el cantón Pichincha, provincia de Manabí”, 2013.

Zonas de estudio	Total Animales	Número de casos positivos	Número de casos negativos	Porcentaje de casos
Zona Norte	132	24	108	08,00
Zona Sur	168	42	126	14,00
Total	300	66	234	22,00

En el cuadro 6 y gráfico 2, se reporta que los 300 animales muestreados fueron seleccionados en 20 fincas, de las cuales 10 se ubican en la zona norte del cantón Pichincha y 10 en la zona sur del cantón, los resultados de la prueba de Rosa de Bengala arrojan 24 casos positivos en la zona norte, lo que representa un 08,00% de prevalencia, de un total de 132 animales muestreados; en la zona

sur se tiene que resultaron positivos 42 y 168 negativos, lo que arroja como resultado un 14,00% de prevalencia de la enfermedad.

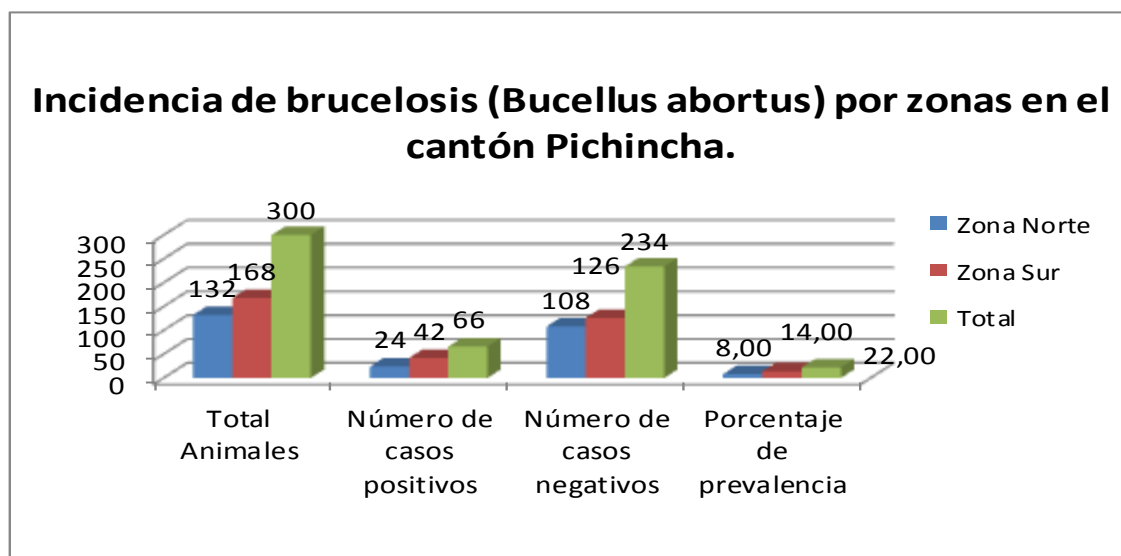


Figura 2. Resultados con la prueba Rosa de Bengala, en el cantón Pichincha, 2013.

Cuadro 8. Comprobación de reactores positivos con la técnica de PCR, en la tesis, “incidencia de brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en el cantón Pichincha, provincia de Manabí”, 2013.

Total Muestras	Número de casos positivos	Número de casos negativos	Porcentaje de prevalencia
66	29	37	43,94

Los resultados de la (Figura No 3) indican que del total de muestras de sangre y plasma analizado, un promedio del 22% dio positivo con el análisis de RB, mientras tanto que con PCR fue del 9,67 %, 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.

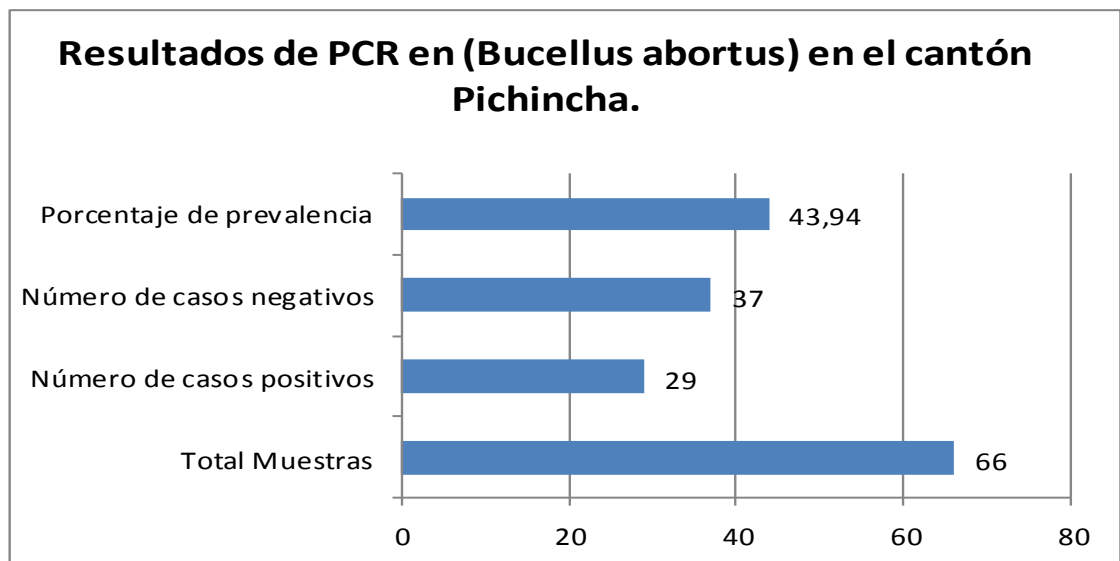


Figura 3. Resultados de comprobación de reactores positivos con la técnica de PCR, en el cantón Pichincha, 2013.

Los resultados demostraron que hubo amplificaciones a partir de muestras positivas por RB. Como se observa en la figura 6; la aplicación de la técnica PCR para reconfirmar los resultados obtenidos con la prueba Rosa de Bengala (66 positivos) al aplicar la PCR 29 muestras reaccionaron positivo y 37 animales fueron falso negativos están técnica aumenta la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la brucelosis. Eentonces 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.

4.1.3. Pérdidas económicas

En el cuadro 8, se observan los resultados de la proyección estimada de las pérdidas económicas que afectan al ganadero con el aborto de una vaca. Se estima que en las ganaderías del cantón Pichincha el productor deja de percibir \$ 532,50 por cada aborto, por concepto de pérdida en leche \$ 402,50 y por el precio del ternero \$ 130,00; el total de dinero que deja de percibir el ganadero es de \$ 532,50. Adicionalmente se debe considerar la pérdida que tiene el ganadero que por efecto de la brucelosis; pues, el animal queda infértil o portador

sano, lo que conlleva a que tomar medidas drásticas como es el descarte del animal.

Cuadro 9. Estimación en dólares de la pérdida causada por el aborto producido en el cantón Pichincha, en la tesis, “incidencia de brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en el cantón Pichincha, provincia de Manabí”, 2013.

Parámetros	Total en dólares USD
Duración de la lactancia (días)	230,00
Promedio de producción de leche (L) vaca día	5,00
Precio del litro de leche a nivel de finca (0.35)	
Sub total pérdida en leche (\$)	402,50
Valor del ternero	130,00
Total perdidas (\$)	532,50

4.1.4. Sensibilidad y especificidad de la prueba de Rosa de Bengala.

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

Fórmulas.

$$Sensibilidad = \frac{66}{300} \times 100$$

La sensibilidad de la prueba Rosa de Bengala fue de 22%

$$Especificidad = \frac{234}{300} \times 100$$

La especificidad de la prueba Rosa de Bengala fue de 78 %

4.1.5 Costos por diagnóstico

Los costos por análisis de muestras para determinar la presencia de brucelosis en la sangre de bovinos en el cantón Pichincha se observan en el cuadro 9, se puede establecer que el precio promedio de un análisis por reacción de (PCR) es de 6,16 dólares y para la prueba Rosa de Bengala de 1,68 dólares; en consecuencia el costo total por muestra para realizar las dos pruebas en la determinación de la presencia de brucelosis en el suero sanguíneo de bovinos es de 7,84 dólares por muestra.

Cuadro 10. Costos en dólares da la prueba de brucelosis en muestras de sangre de bovinos. Laboratorio de biotecnología. UTEQ. Quevedo, en la tesis, “incidencia de brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en el cantón Pichincha, provincia de Manabí”, 2013.

PRUEBAS	COSTOS en USD		TOTAL COSTOS	NUMERO MUESTRAS	COSTO POR MUESTRA
	Fijos	Variables			
Reacción en cadena de polimerasa					
Equipos	450,00	0,21	93,60	66,00	1,42
Materiales	500,00	0,18	90,00	66,00	1,36
Reactivos	850,00	0,21	174,00	66,00	2,64
Subtotal de la reacción 1					6,16
Rosa de Bengala					
Equipos	300,00	0,07	21,90	300,00	0,073
Materiales	550,00	0,79	434,50	300,00	1,45
Reactivos	520,00	0,09	46,28	300,00	0,15
Subtotal de la reacción 2					1,68
TOTAL DE LA PRUEBA					7,84

4.2. Discusión

Los resultados obtenidos en la presente investigación en la se busca establecer la incidencia de brucelosis en el cantón Pichincha, se establece que la enfermedad alcanza un 22%, en animales de bovinos adultos de razas criollas y mestizas. 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.

Estos resultados difieren y son superiores a los que reporta (Inec 2002), que manifiesta que en la provincia de Manabí la prevalencia de la enfermedad es con el 8,4% de animales que han tenido aborto.

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 (66 animales positivos) y al hacer la técnica de PCR surgieron (29 animales).

La Rosa de Bengala mostró baja eficiencia respecto a la PCR, lo que podría estar asociado a una actividad controlada de *Brucella spp.* En vacas infectadas.

Esto se vio reflejado por el 43,94 % 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. enterolítica*.) 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 el cantón Pichincha, 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, 1989). Por lo tanto se acepta la hipótesis: La Rosa de Bengala permitirá mostrar el porcentaje de incidencia de *Brucella abortus* en el cantón Pichincha.

En cuanto a la sensibilidad y especificidad de las pruebas de laboratorio, se tiene que para la investigación realizada en el cantón Pichincha los valores encontrados son de 22% y 78% respectivamente; resultados que difieren de los reportados por (Cevallos, et al, 2010) 47%, y 53%; (Arias, 2013) 11.37% y 88.63% y (Vera, 2013) 29% y 71%. Resultados que nos indican que las personas que trabajan en el camal están más expuestas al contagio de esta enfermedad; en la provincia de Manabí la incidencia de la brucelosis es del 11.37% y en Santo Domingo de los Tsachilas es del 29%. También se observa que la incidencia de brucelosis en el cantón Pichincha es superior al promedio de la provincia de Manabí.

Para estudios de seroprevalencia en lugares donde no se practica la vacunación contra la brucelosis, como es el caso de este cantón, en la mayoría de la ganadería no lo hacen. De los 300 animales criollos salieron 66 positivo, los animales criollos 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 hipótesis: 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.

Las ganaderías más afectadas por esta enfermedad son las que se encuentran ubicadas en la zona sur con 44 animales infectados, 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), quien manifiesta 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 porcentajes de prevalencia de brucelosis encontrados en este trabajo, permiten inferir que la Brucelosis bovina se encuentra en umbrales considerados peligrosos para los hatos ganaderos del cantón Pichincha.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación se tienen las siguientes conclusiones

- La prevalencia de la brucelosis de terminada mediante el análisis de Rosa de Bengala en el cantón Pichincha es del 22,00%, pues, se presenta en 66 de los 300 animales muestreados.
- La sensibilidad y especificidad de esta prueba (Rosa de Bengala) en esta investigación es de 22 y 78 % respectivamente.
- Los costos por aplicación de las técnicas de detección de brucelosis en sangre de bovinos para la prueba rosa de bengala es de \$ 1.68 mientras que para la técnica de PCR es \$ 6,16.

5.2. Recomendaciones

- ✓ Realizar la vacunación contra brucelosis a todos los animales hembras y de preferencia a los pequeños
- ✓ Mantener estrictamente el calendario de vacunación.
- ✓ Sacrificar a los animales que en esta investigación dieron positivo para brucelosis.
- ✓ Tomar las medidas preventivas más adecuadas para poder llegar a mantener la zona con niveles bajos de infección.
- ✓ Realizar muestreos periódicos de la enfermedad a los animales y a las personas que trabajan con ellos y, sean sometidos a un análisis con la Técnica molecular (PCR) para conocer si han sido infectados.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6.1. Literatura Citada

- Acha, P. 2001.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3a ed. Washington, editorial O. P. S, p 28 – 52.
- Alton, G. y Jones, L. 1969.** Las técnicas de laboratorio en la Brucelosis. Ginebra, 1969, Organización Mundial de la Salud., 1969. In 4, rústica editorial, 95 pp
- Arestegui .M.B. y Gualtieri. C. 2005.** Brucelosis bovina. Cátedra de Sueros y Vacunas. Facultad de Cs. Veterinarias UNR. México.
- Arias, G. 2013.** Determinación de la prevalencia de brucelosis bovina (Brucella Abortus) en la provincia de Manabí mediante La Prueba De La Rosa Bengala.
- Bathke, W. 1981.** Brucelosis. En “ Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos” JoachimBeer. Ed. Acribia. Tomo II. Zaragoza España. Págs. 142-156.
- Bercovich, Z.1998.** Maintenance of Brucella abortus-free herds: a review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. : Vet Q. Jul; 20(3): 81-8.
- Blood, D., Radostits, O. 1992.** Medicina Veterinaria.7a ed. México. Editorial Interamericana p 729 – 750.
- Boffil, P.; Rivas, A.; Ramírez, 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.
- Cancellan, A.1981.** Manejo de animales: Salud y Enfermedad. Editorial Aedos segunda edición Barcelona – España.

- Cevallos, O., Carranza, M., Saucedo, S., Romero, D. 2010.** Diagnóstico serológico (Rosa De Bengala) y Molecular (PCR) de brucelosis en humano. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo. Ecuador.
- Corbel, M. J. 1997.** Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* . Apr-Jun;3(2): 213- 219.
- Corbel, M.J., Bringley Morgan, W.J. 2009.** OIE (World Organisation for Animal Health). In. Manual of Diagnostic and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.8.5. Genus *Brucella*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Krieg N.R, Holt J.G. (Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, USA, (1984, OIE 2009) 377-388 pp.
- Cotrina, N. y Fernández, A. 1991.** Brucelosis, problema sanitario y económico. Ed. Científico-técnico, La Habana.
- Cranford, L. 1972.** Medicina veterinaria 7a ed. España, editado por Interamericana Hill Mc. Crows P 25 - 35
- Dajer Abimerhi A. F; Gutiérrez E.J; Zapatas D. 1998.** Uso de las pruebas de ensayo inmune absorbentes ligados a enzimas y aglutinación con rivanol para el diagnóstico de brucelosis bovina en Yucatán Mérida México, D.F. *Vet. Méx.* p.167 – 171
- FAO/OMS. 1986.** Sexto informe del Comité Mixto de Expertos en Brucelosis. Serie de Informes técnicos 740. Ginebra.
- 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.*
- Homedes. J., 1963.** Veterinaria Práctica. Colección Agrícola Salvat. Segunda Edición. Pp. 670 – 675

Instituto Nacional de estadísticas y censos (Inec). 2002. III censo nacional agropecuario, Ministerio de Agricultura y Ganadería. Quito. Ecuador.

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.

Merchán, I., Packer. 1970 Bacteriología y Virologia Veterinaria 3era. Ed Acribia., p 339 – 340.

Paulin, L.M.S. 2006a. Estudio comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecciones por *Brucella abortus* en búfalos (*Bubalus bubalis*). São Paulo, 2006. 92p. Tese (Doutorado) – Facultades de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidad de São Paulo, São Paulo.

Revet. 2007. Revista electrónica de Veterinaria. Volumen VIII Número 4. Eva E. Ortiz Losada MSc, Eladio Silva Cabrera Dr. C., Maricela Izquierdo Marquéz. Normalización y evaluación del inmunoensayo ABICAP-BRU para el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina. La Habana, Cuba.

Rhaway, N. 1993. "Manual Merck de Veterinaria". España.

Romero C; Gamazo C; Pardo M, et al. 1995a.- Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J. Clin. Microbiol. 33. 615-617.

Samartino, L. 2005. Conceptos generales de la brucelosis bovina INTA, Instituto nacional de tecnología agropecuaria. Castelar, Argentina.

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.

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

Tizard, I.1989. Inmunología Veterinaria. 4° Edición. México, Interamericana 245-249.

Vera, N. 2013. Incidencia de brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en la provincia de Santo Domingo de los Tsachilas. Unidad de Estudios a Distancia. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo. Ecuador.

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.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

7.1. Anexos

Anexo 1. Fotografías de la investigación



Ganado en el corral y en manga listos para ser muestreados



Materiales y manga utilizados para tomar las muestras de sangre

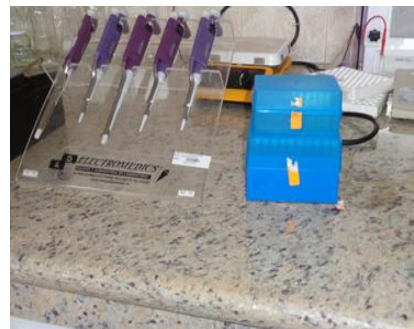


Toma de muestras de sangre en bovinos

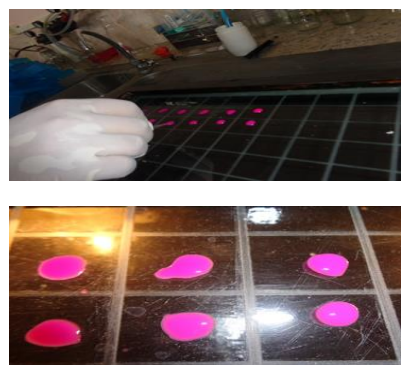
Anexo 2. Fotografías del proceso de aglutinación con rosa de Bengala



Laboratorio de microbiología y recepción de muestras



Reactivos de rosa de bengala y equipos de aplicación



Aplicación de reactivo y respuesta de la muestra a la aglutinación

Anexo 3. Resultados de la investigación.

Nro.	Nombre Del Propietario	Numero de muestras	Técnica R B		Confirmación PCR	
			+	-	+	-
1	Letty Basurto	10	1	9	0	1
2	Bosco Tuarez	10	2	8	1	1
3	Andrés Basurto	20	4	16	2	2
4	Regino Alcívar	10	0	10	0	0
5	Enrique Vera	18	4	14	2	2
6	Quime Vera	10	3	7	3	0
7	Tito Ruiz	14	2	12	0	2
8	Wilfrido García	19	5	14	2	3
9	Francisco Basurto	11	2	9	0	2
10	José Gómez	10	1	9	0	1
11	Vicente Ganchozo	20	7	13	4	3
12	Juan Arteaga	10	3	7	1	2
13	Nery Tuarez	20	6	14	1	5
14	Oswaldo Vera	40	8	32	3	5
15	Facundo Tuarez	30	10	20	4	6
16	Milagro Ganchozo	15	1	14	0	1
17	Porfirio Basurto	11	2	9	2	0
18	Ramón Loor	10	4	6	3	1
19	Ramona Menéndez	5	0	5	0	0
20	Francisco Mendoza	7	1	6	1	0
	TOTAL	300	66	234	29	37