

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

Título de disertación: Identificación molecular por prueba PCR de *Brucella abortus* en muestras de leche y sangre de bovinos provenientes de diversas fincas del Ecuador

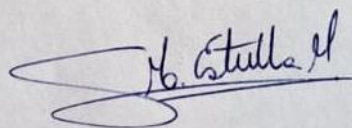
Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Microbiología

JAIME RODRIGO BURBANO SOSA

Quito, 2024

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología del señor Jaime Rodrigo Burbano Sosa ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Nombre de la directora de disertación
Directora de la Disertación **Mgtr. Sonia Margarita Estrella Vásquez**

Quito, 2024

DEDICATORIA

A mis padres Jaime y Ximena por siempre apoyarme, a mi abuela Adriana, quien fue mi guía y quien me enseñó a seguir adelante.

A mis tías Mónica, Esmeralda, Adriana, Cecilia, e Irene, quienes siempre han sido como mis segundas madres, alentándome a perseverar y continuar mis estudios.

A toda mi familia y amigos en quienes siempre he podido confiar.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, a mis tías y mi familia en general por su apoyo durante todo mi proceso universitario.

Al Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL) por abrirme las puertas para el desarrollo de la fase experimental de esta investigación. A mi tutora Sonia Margarita Estrella y a mi profesora Cristina Montalvo quienes me guiaron durante el desarrollo de este trabajo.

A mis profesores que se involucraron en este proyecto desinteresadamente y me ayudaron solventando las dudas que aparecieron en el transcurso de este proyecto.

A la Asociación Ecuatoriana de Buiatría y al grupo de médicos veterinarios por su apoyo durante la investigación de este proyecto.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

LPS: Lipopolisacáridos

PIB: Producto Interno Bruto

TSA: Agar-Triptosa-Suero

TABLA DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
LISTADO DE ABREVIATURAS	VI
LISTA DE FIGURAS, LISTA DE TABLAS Y LISTA DE ANEXO	VIII
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECIFICOS	7
4. METODOLOGÍA	8
4.1 Obtención de las muestras	8
4.2 Análisis de las muestras de sangre mediante la prueba de Rosa de Bengala	10
4.3 Análisis de las muestras de suero por ELISA competitivo	11
4.4 Análisis de las muestras de leche y sangre por PCR	12
5. RESULTADOS	15
5.1 Análisis Estadístico	16
6. DISCUSION DE LOS RESULTADOS	20
7. CONCLUSIONES	23
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	24
9. ANEXOS	30

LISTA DE FIGURAS, LISTA DE TABLAS Y LISTA DE ANEXO

Tabla 1. Muestras de sangre de los diferentes predios ganaderos	9
Tabla 2. Muestras de leche de los diferentes predios ganaderos	9
Tabla 3. Secuencias primers región IS711 elemento genético 16s ARNr Brucella abortus.....	13
Tabla 4. Número de casos positivos y negativos Rosa de Bengala y ELISAc	15
Tabla 5. Tabla de contingencia para pruebas de Rosa de Bengala y ELISAc	17
Tabla 6. Indicadores de sensibilidad diagnóstica (DSe) y especificidad diagnóstica (DSp)....	17
Figura 1. Gel de agarosa.....	16

1. RESUMEN

La brucelosis bovina es una enfermedad zoonótica causada principalmente por la bacteria *Brucella abortus*. Esta es una de las principales enfermedades reproductivas en el ganado destinado a la producción lechera, lo que repercute gravemente en el sector ganadero del Ecuador provocando pérdidas económicas. La enfermedad se transmite por el contacto con descargas infectadas como fetos, placenta o fluidos postparto. En el país esta enfermedad es de declaración obligatoria al ente regulador que es AGROCALIDAD y las pruebas utilizadas para la detección de *Brucella abortus* son Rosa de Bengala y ELISA competitivo, sin embargo, pueden arrojar resultados no concluyentes. Por esto, la investigación tuvo como objetivo identificar *Brucella abortus* mediante la técnica molecular de PCR a partir de muestras de leche y sangre de bovinos en base a la necesidad de pruebas que den resultados de forma rápida y precisa, como un complemento a las pruebas serológicas ya aplicadas. Se analizaron un total de 61 muestras de sangre de diferentes predios ganaderos y 30 muestras de leche, mediante las pruebas de Rosa de Bengala, ELISAc y la estandarización de la prueba de PCR para comparar la eficacia de la prueba PCR respecto a las otras pruebas serológicas. Adicionalmente se procesaron 30 muestras de leche de aquellas vacas que se encontraban en producción. La investigación demostró que la estandarización de la prueba de PCR puede ser un obstáculo a superar, además es necesario buscar el tipo de muestra idónea para una detección oportuna de la enfermedad. No se obtuvieron los resultados deseados en la prueba de PCR Convencional para detectar la presencia de *Brucella abortus*. La búsqueda de alternativas que permitan un diagnóstico de la enfermedad en etapas tempranas con el fin de evitar su propagación es de gran importancia.

Palabras clave: Bovinos, *Brucella abortus*, ELISAc, PCR, Rosa de Bengala

2. ABSTRACT

Bovine brucellosis is a zoonotic disease caused mainly by the bacterium *Brucella abortus*. This is one of the main reproductive diseases in cattle destined for dairy production, which has a serious impact on the livestock sector in Ecuador causing economic losses. The disease is transmitted by contact with infected discharges such as fetuses, placenta or postpartum fluids. In the country, this disease must be reported to the regulatory agency AGROCALIDAD and the tests used for the detection of *Brucella abortus* are Rose Bengal and competitive ELISA, however, they can yield inconclusive results. Therefore, the objective of the research was to identify *Brucella abortus* using the molecular PCR technique from bovine milk and blood samples, based on the need for tests that give fast and accurate results, as a complement to the serological tests already applied. A total of 61 blood samples from different cattle farms and 30 milk samples were tested using the Rose Bengal test, ELISAc and the standardization of the PCR test to compare the efficacy of the PCR test with respect to the other serological tests. Additionally, 30 milk samples from those cows that were in production were processed. The research showed that the standardization of the PCR test can be an obstacle to overcome, and it is necessary to look for the ideal type of sample for a timely detection of the disease. The desired results were not obtained in the conventional PCR test to detect the presence of *Brucella abortus*. The search for alternatives that allow early diagnosis of the disease in order to prevent its spread is of great importance.

Key words: Cattle, *Brucella abortus*, ELISAc, PCR, Rose Bengal.

3. INTRODUCCIÓN

La brucelosis bovina es una enfermedad zoonótica de gran relevancia económica en el ganado, causada por la bacteria de la familia Brucellae. Cada variedad de *Brucella* presenta afinidad por una especie animal en concreto, en el caso de bovinos, la infección es causada principalmente por *Brucella abortus* (World Organisation for Animal Health, 2022). Esta es una bacteria Gram negativa aerobia, se observa como bacilos cortos o cocobacilos inmóviles entre 0.5 a 1.5 micras de diámetro bajo microscopía.

Brucella abortus presenta un crecimiento lento, carece de formas de resistencia, pero tiene un alto nivel infectivo (Insst, 2021). Taxonómicamente, se clasifica en el dominio Bacteria, filo Proteobacteria, clase Alphaproteobacteria, orden Rhizobiales, familia Brucellaceae y al género *Brucella* (de la Puente et al., 2020). Es aerobia, de metabolismo oxidativo, utiliza nitratos como aceptores finales de electrones, es catalasa y oxidasa positivo (Álvarez-Hernández et al., 2015).

De acuerdo a lo mencionado por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina (SENASA, 2023), la brucelosis bovina es una de las principales enfermedades reproductivas en vacas destinadas a la producción lechera, subrayando la recurrencia y problemática que presenta *Brucella abortus* en el sector ganadero (Campos 2021).

En Ecuador, la ganadería constituye una actividad económica crucial, siendo que el sector agropecuario aporta con el 10.4 % del Producto Interno Bruto (PIB) (Hidalgo, Vargas, & Vite, 2020). Para finales del año 2023, el sector de agricultura, silvicultura, ganadería y pesca representó el 8,2 % de ventas nacionales (Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca, 2023). El ganado bovino constituye el 68 % del total de animales de la producción agropecuaria ecuatoriana (Sánchez, Vayas, Mayorga, & Freire, 2019).

Brucella abortus es considerada endémica en el Ecuador (Mainato, 2017) y esto refleja un impacto en la salud reproductiva del ganado bovino y un riesgo para la economía del sector

ganadero (Bravo & Zambrano, 2022). Por ello, la brucelosis bovina es controlada por la agencia de control zoonosario AGROCALIDAD. Además, representa un peligro para la salud pública al ser una enfermedad zoonótica.

Los signos clínicos visibles en hembras infectadas con *Brucella abortus* incluyen aborto entre el quinto y séptimo mes de gestación, nacimiento de crías débiles y descargas vaginales. Pueden presentar retención de placenta, disminución en la fertilidad tanto para machos como para hembras. También existe una baja producción de leche. En machos se puede observar orquitis unilateral o bilateral. Las vacas infectadas albergan la enfermedad durante toda su vida (California Department of Food and Agriculture, 2021).

La transmisión ocurre principalmente por contacto con descargas infecciosas o contaminadas como fetos, placenta o fluidos producidos postparto. Las vacas pueden contraer la bacteria al lamer las secreciones reproductivas, órganos reproductivos de algún otro bovino infectado o al consumir agua o alimento que se encuentren contaminados (Texas Animal Health Commission, 2020).

Brucella abortus se puede aislar en medios selectivos y enriquecidos con la adición de antibióticos para evitar el desarrollo de otras bacterias, como Agar sangre, Agar-Triptosa-Suero (TSA) y Agar *Brucella*. La incubación requerida es 5 al 10 % de CO₂. Las colonias se observarán transcurridos 3 a 5 días de incubación. En medio TSA, las colonias presentan forma circular, convexas, translúcidas con una coloración ámbar y ligeramente opalescentes (Vega, 2006). Las pruebas de catalasa y oxidasa son utilizadas para confirmar su presencia. Es de vital importancia manipular estas muestras con precaución y bajo estrictas normas de bioseguridad.

En el Ecuador, para la detección de esta enfermedad se utilizan principalmente la prueba de Rosa de Bengala y la técnica de inmunoensayo de adsorción ELISAc, por sus siglas en inglés, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ventanilla Digital de Trámites del Ecuador, 2023). Estas son pruebas aceptadas por la agencia de control nacional. Por ser una enfermedad de declaración obligatoria y de acuerdo a la resolución - 0131 del “Manual de procedimientos para la atención y control de brucelosis bovina en Ecuador” (Ministerio de Agricultura,

Ganadería y Pesca, 2016), es una enfermedad que debe ser notificada a AGROCALIDAD (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario del Ecuador).

La prueba de Rosa de Bengala utiliza una suspensión coloreada, inactivada y tamponada de *Brucella abortus* (cepas 1119-3 o S-99). Esta prueba se basa en la capacidad del antígeno teñido contenido en el reactivo (Rosa de Bengala) para unirse a anticuerpos dirigidos contra *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*. Detecta principalmente los anticuerpos IgM e IgG, produciéndose una reacción de aglutinación. Estos agregados son visibles a simple vista. La aparición o ausencia de aglutinación visible indica la presencia o ausencia de anticuerpos en la muestra. Este procedimiento es cualitativo y rápido, puede emplearse en muestras de suero de bovinos, ovinos, caprinos y porcinos. Se utiliza con un medio acidificado tamponado ($\text{pH } 3.65 \pm 0.05$), lo que ayuda a eliminar aglutinaciones no específicas. (IDEXX, 2019). Presenta una sensibilidad del 88.89 % y una especificidad del 69 % (Jurado 2020).

Por otro lado, la técnica de inmunoensayo ELISA competitivo es una prueba de diagnóstico cuantitativo que se fundamenta en la competencia entre los antígenos presentes en una muestra contra los antígenos marcados por las regiones de unión de los anticuerpos, inmovilizándolos en la placa (BioTech, 2013). Esta prueba emplea placas de microtitulación que contiene pocillos que están cubiertos con lipopolisacárido (LPS), que se extraen de la bacteria *Brucella abortus*. De existir anticuerpos anti-*Brucella* en la muestra, estos se unirán al LPS. Luego de una fase de lavado, con el fin de eliminar cualquier anticuerpo que no se haya adherido, se adiciona un anticuerpo monoclonal anti-*Brucella* de ratón, que es específico para el LPS. Si hay anticuerpos contra *Brucella* en las muestras de suero, la unión de los anticuerpos anti-*Brucella* de ratón se bloqueará. Posteriormente se adiciona anticuerpos secundarios anti-ratón conjugado con HRP, que se unen a los anticuerpos monoclonales anti-*Brucella* inmovilizados en los pocillos del kit. Después de otro lavado, cualquier anticuerpo conjugado unido se detecta empleando un sustrato TMB (sustrato cromogénico), el cual provoca un cambio de coloración en presencia de HRP. La densidad óptica del color generado se mide utilizando un lector de microplacas. La cantidad de coloración producida es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos anti-*Brucella* presentes en el suero

analizado. El inmuno ensayo ELISA competitivo detecta anticuerpos específicos contra *Brucella abortus* con una sensibilidad del 99.54 % y una especificidad del 99.42 % (EllieLab 2022). A pesar de ser considerada una prueba rápida, presenta un protocolo relativamente complejo.

En una mesa de trabajo que se llevó a cabo en junio de 2024, la agencia responsable para el control de brucelosis bovina causada por *Brucella abortus* en Ecuador (AGROCALIDAD), expresó su interés por implementar pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) al ser un método complementario, sensible, específico y aplicable para su detección.

La PCR es una prueba de alta precisión y rapidez que es utilizada para el diagnóstico de enfermedades de tipo infeccioso. Es capaz de detectar el ADN o ARN del patógeno, con la ventaja de poder detectar signos de la enfermedad en etapas tempranas (MedlinePlus, 2022).

La prueba PCR para la detección de *Brucella abortus* presenta una sensibilidad del 100 % y una especificidad aproximada del 80 y 90 % (Alamian et al. 2017).

Sin embargo, implementar la técnica de PCR para el diagnóstico de *Brucella abortus* en Ecuador presenta ciertas complicaciones, debido al complejo proceso de estandarización, los costos elevados que implica la adquisición de los reactivos, la necesidad de equipamiento especializado y personal capacitado.

Aplicar la prueba PCR para el diagnóstico de *Brucella abortus* podría ofrecer ventajas significativas debido a su rapidez, alta especificidad y sensibilidad, beneficiando al sector ganadero a obtener un diagnóstico certero sobre todo cuando existan resultados serológicos no concluyentes, evitando la propagación de la enfermedad, reduciendo los costos de producción y minimizando la pérdida de animales de alto valor genético, siempre y cuando se encuentra la muestra más adecuada.

En este contexto, este estudio se enfocará en comparar los beneficios de la prueba PCR en términos de eficacia respecto a las pruebas ELISAc (de competición) y Rosa de Bengala, a partir de muestras de leche y de sangre provenientes de diversas fincas del Ecuador, especialmente cuando dichas pruebas serológicas no arrojan resultados definitivos. Esta propuesta de investigación pretendió responder ¿Si la PCR demuestra una mayor sensibilidad y especificidad para identificar *Brucella abortus* en muestras de leche y coágulo sanguíneo de bovinos en relación con las pruebas serológicas de Rosa de Bengala y ELISA competitivo

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Identificar *Brucella abortus* mediante la técnica molecular de PCR a partir de muestras de leche y sangre de bovinos provenientes de diversas fincas de producción lechera del Ecuador.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

Evaluar la eficacia de la PCR en la detección de *Brucella abortus* a partir de coágulo sanguíneo bovino en comparación con la prueba Rosa de Bengala y ELISA competitivo de muestras obtenidas en diversas fincas ganaderas del Ecuador.

Evaluar la eficacia de la PCR para la detección de *Brucella abortus* en muestras de leche provenientes de diversas fincas ganaderas del Ecuador.

4. METODOLOGÍA

4.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para esta investigación se recolectaron 61 muestras de sangre y 31 muestras de leche de bovinos de varias fincas del Ecuador. Se tomaron muestras de animales sospechosos para brucelosis. Las muestras fueron tomadas por un médico veterinario capacitado y responsable de los predios. Las muestras de leche fueron tomadas de manera aséptica en recipientes plásticos de boca ancha estériles, mientras que las muestras de sangre se tomaron en tubos de ensayo sin anticoagulante para su posterior obtención de suero. En algunos casos las muestras de leche y sangre no provenían de la misma vaca debido a que eran de hembras jóvenes entre 1 y 2 años de edad que aún no se encontraban en etapa de producción.

A las muestras recibidas se les asignó un código alfa numérico y secuencial de manera que puedan ser registradas en base a las fechas en las que se realizó el muestreo, la ubicación y el número de animales muestreados en el predio, cuando se trataban de muestras de leche se colocó la letra L con el fin de diferenciarlas de las muestras de sangre.

Las muestras de sangre recibidas se indican en la (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras de sangre de los diferentes predios ganaderos

Número de caso	Ubicación	No de animales muestreados
T-001	Pichincha/Mejía	5
T-002	Pichincha/Machachi	6
T-003	Pichincha/Los Bancos	4
T-004	Pichincha/Mejía	21
T-005	Pichincha/Machachi	4
T-006	Pichincha/Machachi	16
T-007	Pichincha/Machachi	5
Total		61

Las muestras de leche recibidas se indican en la (Tabla 2).

Tabla 2. Muestras de leche de los diferentes predios ganaderos

Número de caso	Ubicación	No de animales muestreados
T-008L	Pichincha/Mejía	4
T-009L	Pichincha/Los Bancos	2
T-010L	Pichincha/ Rumiñahui	2
T-011L	Pichincha/ Mejía	3
T-012L	Cotopaxi	19
Total		30

De igual manera se recibieron muestras de sangre de un mismo animal con diferentes tiempos de muestreo para observar la respuesta a la enfermedad.

Las muestras fueron transportadas al laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en un *cooler* con geles refrigerantes con el fin de mantener la cadena de frío de 2 a 8 °C y evitar que la muestra sufra algún daño por las alteraciones de temperatura. Las muestras de suero y de leche se mantuvieron en congelación a -22 °C hasta el momento de su análisis.

4.2 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE SANGRE MEDIANTE LA PRUEBA DE ROSA DE BENGALA

Para la obtención del suero bovino, se utilizó centrifugación a 3000 revoluciones por minuto. Todas las muestras fueron congeladas a -2 -5 °C hasta la realización de la prueba de Rosa de Bengala. El reactivo que se utilizó para esta prueba fue de la casa comercial IDEXX, que posee el antígeno contra las especies de *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*.

Previamente para esta prueba se llevó al antígeno y los sueros a temperatura ambiente. Se homogenizó el reactivo de Rosa de Bengala antes de su uso, igualmente las muestras de suero para ser procesadas.

Se dispensó 30 µL de las muestras de suero en los pocillos de la placa serológica y a continuación se adicionó 30 µL del antígeno Rosa de Bengala evitando que la punta de la pipeta entre en contacto con el suero. Con un palillo de madera se mezcló el antígeno con la muestra de suero realizando círculos.

Una vez homogenizadas todas las muestras, se rotó manualmente la placa serológica con movimientos circulares durante 4 minutos. Transcurrido ese tiempo, se colocó la placa bajo luz blanca para observar si existe presencia o ausencia de aglutinación.

Los resultados se registraron luego de observar de forma macroscópica si las muestras tienen presencia de aglutinación, de ser este el caso se reportó dicha muestra como positiva para anticuerpos contra *Brucella*. En caso de no tener aglutinación, la muestra se reportó como negativa.

4.3 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE SUERO POR ELISA COMPETITIVO

La prueba de ELISA competitivo (ELISAc) se realizó en un laboratorio veterinario acreditado, externo a la universidad para luego comparar con los resultados obtenidos en las pruebas de Rosa de Bengala y PCR. Esta prueba únicamente la pueden realizar los laboratorios acreditados para ello debido a que su reporte es obligatorio a la agencia nacional de control zoosanitario (AGROCALIDAD).

Con esta prueba se busca identificar la presencia de anticuerpos contra *Brucella abortus* en las muestras de suero.

El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo del Kit de Enzima Inmuno absorbente *Brucella* c-ELISA ELLIE de la casa comercial EllieLab (EllieLab, 2022), así como el kit de la casa comercial SVANOVIR (SVANOVA, 2021). El procedimiento que se siguió fue el propuesto por las casas comerciales en relación a la preparación de los diferentes componentes como la solución de Lavado (10X), anticuerpo competitivo, conjugado, solución sustrato, solución Stop y la dilución de las muestras de suero. En la prueba ELISAc de la casa comercial Ellie, se considera como resultado positivo a las muestras que presentan un Porcentaje de inhibición (PI) $> 50 \%$ y negativos a las muestras que presenten un PI $\leq 50 \%$.

Por otro lado, en las muestras analizadas por el kit SVANOVIR, presentan una variación respecto al kit Ellie debido a que, en este kit al momento de interpretar los resultados, se determina como positivo a las muestras que tengan un PI $\geq 30 \%$ y negativas a las que presenten un PI $< 30 \%$.

4.4 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE LECHE Y SANGRE POR PCR

Las muestras de leche y sangre se almacenaron en refrigeración (2-8 °C) y congelación (-22 °C) hasta su uso en la prueba PCR.

El ADN de las muestras de leche y de los coágulos sanguíneos se extrajeron con el kit ZYBIO “Nucleic Acid Extraction Kit (Magnetic Bead Method)” (Extraction Kit_Zybio, 2024). En conjunto con el robot 3Dmed ANDIS.

El Kit de extracción de ADN requiere de muestras líquidas por lo que se utilizó nitrógeno líquido para preservar la estructura y el estado biológico del coágulo sanguíneo y, por lo tanto, del material genético y de esta manera obtener una muestra líquida adecuada. Para lo cual se realizó lo siguiente:

Una vez retirado el suero que fue utilizado en las pruebas serológicas, el coágulo sanguíneo fue trasvasado de manera aséptica en una cabina de bioseguridad a un criovial de plástico de 5mL de capacidad y cerrado herméticamente. Cada criovial estuvo claramente identificado con el fin de mantener la trazabilidad de las muestras. Se introdujeron los crioviales con los coágulos de sangre en las canastillas del tanque de nitrógeno y se los sumergió por un lapso de tiempo de 5 a 10 minutos.

Para romper el coágulo se utilizó un vortex y agitación mecánica. Posteriormente se adicionó DNA/RNA *shield buffer* para preservar y facilitar la extracción del material genético.

Para la extracción del ADN, se utilizó el kit ZYBIO “Nucleic Acid Extraction Kit (Magnetic Bead Method).

Se adicionó 15 µL de proteinasa k en los pocillos indicados en el kit.

Posteriormente con una micropipeta se tomaron 200 µL de las muestras y se colocaron en los pocillos correspondientes, siguiendo el orden de rotulación preestablecido.

En el caso de las muestras de leche, estas deben estar a temperatura ambiente previas al proceso y como son de consistencia líquida siguen el mismo protocolo anteriormente mencionado.

Las placas se introdujeron en el robot (3Dmed ANDIS), junto con los tubos plásticos de la regleta del robot. Seguidamente, se configuró el programa para la extracción del ADN.

Las muestras de ADN se transportaron al laboratorio de biotecnología de la facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador manteniendo la cadena de frío (2-8 °C) donde se realizó las pruebas PCR.

Los protocolos de estandarización de PCR también se llevaron a cabo paralelamente en un laboratorio de la ciudad de Quito. Esto con el fin de realizar una comparación simultánea respecto a la estandarización de la prueba PCR.

Las secuencias de *primers* utilizadas se indican a continuación en la Tabla 3

Tabla 3. Secuencias primers región IS711 elemento genético 16s ARNr *Brucella abortus*

Región del genoma	Primer Forward	Primer Reverse	Tamaño del amplicón
IS711 elemento genético 16s ARNr	5'-GACGAACGGAATTTTCCAATCCC-3'	5'-TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT-3'	498 pb

En este ensayo se buscó amplificar la región del genoma IS711 elemento genético, ARNr 16S (Leary, Sheahan, & Sweeney, 2006).

Para iniciar con la prueba de PCR, primero se midió la pureza y concentración de las muestras de ADN extraído. En este ensayo se buscó amplificar la región del genoma IS711 elemento genético, ARNr 16S.

La estandarización de la prueba se hizo con ADN de *Brucella abortus* de la vacuna cepa 19 como control positivo y ADN de *Escherichia coli* como control negativo.

Se utilizó como base los parámetros indicados por (Leary, Sheahan, & Sweeney, 2006), que indican:

Denaturación inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 33 ciclos de denaturación a 95 °C por 1.15 minutos, anillamiento a 55.5 °C por 2 minutos y 2 extensiones a 72 °C por 2 minutos. Finalmente, una extensión final a 72 °C por 10 min.

Una vez concluida la reacción de PCR se observó la reacción por electroforesis en gel de agarosa 1 % (en tampón TAE 1X), donde se adicionó SYBR Safe.

En el primer pocillo del gel se dispensó la escalera molecular, en el segundo y tercer pocillo se colocaron el control negativo y positivo respectivamente.

Después, se realizaron ajustes al protocolo con el fin de mejorar los resultados, los cuales involucraron:

- Concentración del ADN por centrifugación
- Cambio de las temperaturas de reacción del PCR, a temperaturas inferiores y por un menor período de tiempo.
- Se utilizó el programa *Tm calculator* de Thermo Fisher para la obtención de la temperatura de anillamiento óptima.
- Finalmente se realizó un gradiente en la temperatura de anillamiento con una variación de ± 5 °C tomando como media 58 °C.

5. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la prueba de Rosa de Bengala y ELISAc se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Número de casos positivos y negativos Rosa de Bengala y ELISAc

Prueba	No. de casos positivos	Porcentaje de positivos	No. de casos negativos	Porcentaje de negativos	Total de muestras
Rosa de Bengala	26	42,62 %	35	57,37 %	61
ELISAc	28	45,90 %	33	54,09 %	61

Del total de 61 muestras analizadas por la prueba de Rosa de Bengala, el 57,37 % fueron negativas, mientras que 42.62% fueron positivas. En cambio, por la prueba ELISAc se determinó que, del total de muestras analizadas, el 54,09 % fueron negativas y el 45,90 % fueron positivas.

A pesar de los protocolos aplicados y de todas sus variaciones, no se obtuvieron resultados positivos en la amplificación del ADN en las muestras de coágulo sanguíneo y de leche.

De forma complementaria, para determinar la presencia de ADN bacteriano, se realizó la identificación del gen 16S por PCR al control positivo y adicionalmente a 5 muestras al azar determinadas como positivas mediante las pruebas de Rosa de Bengala y ELISAc en donde se obtuvo un resultado positivo únicamente en la muestra control (vacuna cepa 19) como se observa en la Figura 1.

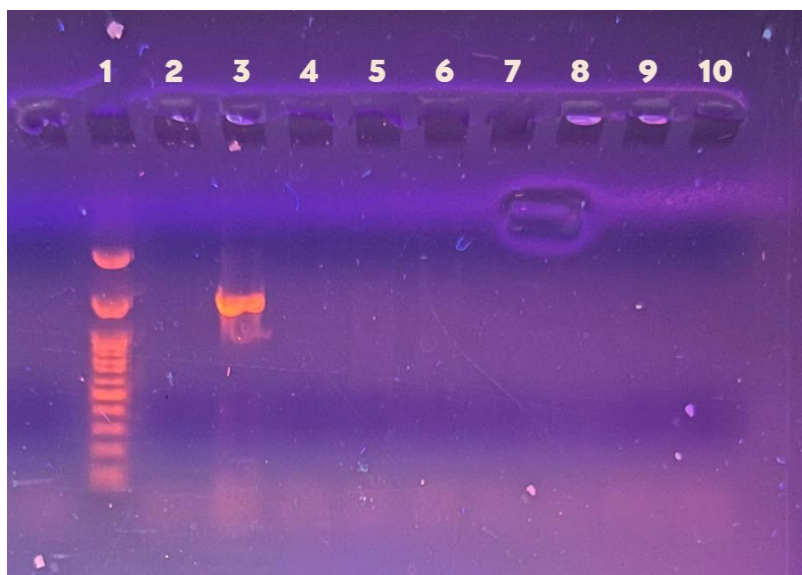


Figura 1 Gel de agarosa que contiene bandas amplificadas para gen 16S para ARNr bacteriano. En el pocillo 1 se puede observar la escalera molecular o Ladder de 3000 pb, en el pocillo 2 el control negativo y en el pocillo 3, el control positivo (cepa 19) con una banda de 1500 pb aproximadamente. Del pocillo 3 al pocillo 9 se encuentran las muestras las muestras de coágulo sanguíneo tomadas al azar entre las muestras con resultados negativos y positivos en las pruebas serológicas, en el pocillo 10 la muestra de leche de una vaca sospechosa de estar infectada. Solamente hubo amplificación en el control positivo.

Finalmente, se realizó la secuenciación por el método de Sanger para determinar si la amplificación obtenida en la prueba de PCR 16S correspondía al ADN de la bacteria *Brucella abortus*. De esta manera se logró determinar en la muestra control la presencia de ARN ribosomal 16S de *Brucella abortus* con un porcentaje de identidad del 99,21 %.

5.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con los datos obtenidos a partir de los resultados de las pruebas de Rosa de Bengala y ELISAc se determinó la sensibilidad y especificidad diagnóstica basándose en los criterios especificados en el “Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas, para los Animales Terrestres” (World Organisation for Animal Health, 2022).

Los análisis se realizaron conforme a lo establecido en la Tabla 5.

Tabla 5. Tabla de contingencia para pruebas de Rosa de Bengala y ELISAc

Resultado de la prueba	Infección presente	Infección ausente	TOTAL
Positivas	21 (VP)	5 (FP)	26
Negativas	7 (FN)	28 (VN)	35
TOTAL	28	33	61

Donde:

Verdadero Positivo (VP): Animal que se sabe que está infectado con un resultado positivo confirmado. Corresponde a 21 animales

Falso negativo (FN): Animal que tuvo un resultado negativo en la prueba de Rosa de Bengala y positivo en la prueba confirmatoria. Corresponde a 7 animales.

Falso positivo (FP): Animal que tuvo un resultado positivo para la prueba tamiz de Rosa de Bengala, pero negativo en la prueba confirmatoria ELISAc. Corresponde a un total de 5 animales.

Verdadero negativo (VN): Animales que se sabe que no están infectados y que han dado un resultado negativo en ambas pruebas. Corresponde a un total de 28 casos.

Para determinar los resultados de estas pruebas diagnósticas se calculó la sensibilidad y especificidad diagnóstica como se indica en la Tabla 6.

Tabla 6. Indicadores de sensibilidad diagnóstica (DSe) y especificidad diagnóstica (DSp)

PARÁMETRO	FÓRMULA	VALOR	RESULTADO (%)
DSe	$\frac{VP}{(VN + FP)}$	0,75	75
DSp	$\frac{VN}{(VN + FP)}$	0,85	85
Eficiencia	$\frac{(VP + VN)}{\text{Total de la población}}$	0,80	80
Falsos negativos	$\frac{FN}{\text{Tot. de Mues. que se sabe que son POS}}$	0,25	25
Falsos positivos	$\frac{FP}{\text{Tot. de Mues. que se sabe que son Neg}}$	0,152	15,15
Prevalencia aparente (PA)	$\frac{N. animales diagnosticados como enfermos}{N. total de población estudiada}$	0,459	45,90
Prevalencia real (PR)	$\frac{PA + DSp - 1}{DSe + DSp - 1}$	0,514	51,38
Valor predictivo Positivo (VPP)	$\frac{PA * DSe}{PA * DSe + (1 - PA) * (1 - DSp)}$	0,81	80,77
Valor predictivo Negativo (VPN)	$\frac{(1 - PA) * DSp}{PA * (1 - DSe) + (1 - PA) * DSp}$	0,80	80

La sensibilidad diagnóstica en esta investigación indica que la prueba de Rosa de Bengala tiene una capacidad del 75 % para detectar a los animales infectados. Los resultados referentes a la especificidad indicaron que Rosa de Bengala tiene una capacidad discriminar a los individuos sanos del 85 %. En cuanto a la eficiencia, que indica el número de resultados correctos obtenidos correspondiendo al 80 %.

Los falsos positivos son muestras que arrojan un resultado positivo, sin ser realmente positivas, el animal no está enfermo, en este caso fue del 25 %. Y los falsos negativos son muestras que arrojan un resultado negativo siendo realmente positivas, el animal está enfermo y se obtuvo un valor de 15,15 %.

La prevalencia aparente (AP), indica el número de animales con un resultado positivo en la prueba de Rosa de Bengala independientemente de si el animal se encuentra infectado o no, siendo en este caso del 45,90 %.

En la prueba de Rosa de Bengala la Prevalencia Real es de 51.38 % siendo esta la proporción de animales que presentan la enfermedad dentro de la población estudiada.

El valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo, nos indican la probabilidad de que el individuo esté verdaderamente enfermo y verdaderamente sano respectivamente. Siendo que este caso sean 88,77 % y 80 %.

6. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

La brucelosis bovina es una enfermedad con una alta prevalencia en el Ecuador (Zambrano & Pérez, 2015), y al ser una enfermedad zoonótica representa no únicamente una problemática para el sector ganadero del país sino también, un riesgo para la salud pública. Las personas con la mayor probabilidad de contraer la infección son aquellas que tienen un contacto directo con los animales infectados, como, por ejemplo: ganaderos, analistas, trabajadores de los mataderos o veterinarios (Álvarez-Hernández et al., 2015).

En el caso de la prueba de aglutinación en placa Rosa de Bengala, los resultados obtenidos nos indican que esta presenta una sensibilidad del 75 % y una especificidad del 85 %. Estos datos tienen relación con los obtenidos por Rosero Peñaherrera & Soria Rojas (2018), quienes determinaron que la prueba de Rosa de Bengala presentaba una sensibilidad del 89 % y una especificidad del 69 %. En cambio, Ortiz & Acosta (2014) mencionan que esta prueba presenta una sensibilidad del 94 % y una especificidad del 100 %. Se puede apreciar que en los 3 estudios tanto la sensibilidad como la especificidad presentan valores que no son inferiores al 65 %, lo cual es un buen indicador de cuán útil es esta prueba. Los falsos positivos que se obtuvieron podrían ser porque la recolección de ciertas muestras se dio luego de que el ganado haya sido vacunado debido a una reacción cruzada causada por bacterias Gram negativas. (Meza et al., 2005).

La prueba de ELISAc, como lo mencionan Tovar & Yepes (2022), presenta una especificidad mayor respecto a la prueba de Rosa de Bengala. Sin embargo, la problemática que presenta esta prueba es el requerimiento de personal capacitado, así como de equipamiento específico y de instalaciones adecuadas. También mencionan que esta prueba presenta una mayor sensibilidad para el diagnóstico de seropositividad, siendo así una prueba confiable y considerada como confirmatoria respecto a otras pruebas como Rosa de Bengala. Así mismo, Martínez (2021) indica que la prueba de ELISA competitivo presenta una sensibilidad del 99 % y una especificidad del 91 %. En base a los resultados obtenidos en esta investigación, la prueba de ELISAc pudo demostrar la seronegatividad de los falsos positivos obtenidos en Rosa de Bengala. Corroborando la especificidad mencionada de esta prueba.

Pese a que estas pruebas son la herramienta diagnóstica utilizado en este momento, han presentado inconvenientes, proporcionando resultados no concluyentes en algunos casos, por lo que en la búsqueda de nuevas opciones para un diagnóstico preciso de brucelosis bovina, se presenta la alternativa de una prueba molecular como es la PCR convencional que sin duda presenta una elevada sensibilidad y especificidad. Una vez estandarizado su protocolo se lo puede realizar a gran escala. Además de que se podría aplicar como un mecanismo complementario a las pruebas serológicas de Rosa de Bengala y ELISAc. (Wakjira et al., 2022)

Leary, Sheahan, & Sweeney (2006) en su investigación indican que la prueba de PCR es capaz de detectar *Brucella abortus* en muestras de sangre y leche, teniendo una alta efectividad, incluso adquiriendo la capacidad de detectar la presencia de la bacteria en muestras con resultado negativo en cultivo bacteriano.

Pacheco y Mosquera (2015) mencionan la prueba de PCR tiene resultados positivos a partir de muestras de sangre, recalcando incluso la posibilidad de que los resultados mediante esta prueba sean considerados como un diagnóstico definitivo siendo que las pruebas serológicas no presentan el mismo nivel de eficacia. Los autores sugieren usar la prueba de PCR como una prueba confirmatoria a la par de ELISA competitivo.

De igual manera, Wubishet et al. (2018) mencionan que la prueba de PCR en muestras de coágulo sanguíneo, resultó ser efectiva para la detección de la bacteria *Brucella abortus*. Además señalan, que la prueba PCR en conjunto con las pruebas serológicas pueden ayudar a dar un diagnóstico preciso que conlleve a la toma de decisiones oportunas para prevenir la propagación de la enfermedad. Sin embargo, los datos presentados por los autores discrepan de los resultados obtenidos en la presente investigación, puesto que no se obtuvo ningún resultado positivo en muestras de coágulos sanguíneos o en las muestras de leche. Por otro lado, Wakjira et al. (2022) en su estudio de 4274 animales, indican que todos los coágulos analizados mediante la prueba de PCR dieron resultado negativo, a pesar de que los animales fueron seropositivos. Recalcan, que las causas de este resultado pudieron deberse a que la

infección haya ocurrido tiempo atrás o que no había circulación de *Brucella abortus* en el torrente sanguíneo al momento en que se tomó la muestra. Concluyen que durante la infección inicial existe una bacteriemia constante, pero que una vez infectados los animales permanecen enfermos de por vida y que la bacteria se aloja principalmente en el tejido linfático y es desde este lugar, que la bacteria migra de forma periódica a otras regiones del organismo, como la placenta.

Tomando en cuenta lo mencionado por Rivers et al. (2006), la bacteria *Brucella abortus* se aloja en la placenta y en los órganos reproductores del ganado bovino por su afinidad al eritritol y que está presente mayormente en estos órganos. Córdova (2020), también explica que *B. abortus* presenta una afinidad por el útero gestante y la placenta ya que estos presentan estructuras hormonales y eritritol, siendo estos los componentes adecuados para el desarrollo de la bacteria. Por lo que se puede decir que los resultados obtenidos no fueron óptimos debido a que la muestra analizada no provino de los órganos mencionados. Con esta información se puede definir como órganos blanco de *Brucella abortus* a la placenta en el caso de vacas preñadas y los órganos reproductores en el caso de ambos sexos. Como también lo indica World Organization for Animal Health (2022), que para la realización de la PCR para la detección de *Brucella abortus*, se sugiere previamente aislar la bacteria cultivando muestras como tejidos provenientes de fetos, órganos reproductores, ganglios linfáticos y secreciones uterinas o de las ubres.

Para determinar la correcta extracción del ADN se realizó la prueba de la PCR 16S y luego la secuenciación Sanger, demostrándose en el control positivo la presencia de la bacteria, con un porcentaje de identidad del 99,21 %, lo que confirma que durante la extracción de ADN se siguieron correctamente los protocolos y lineamientos indicados en el kit de extracción utilizado, en conjunto con técnicas complementarias, como el uso de un separador magnético con el fin de mejorar la calidad del ADN. Mediante las pruebas de PCR 16S, y secuenciación por el método Sanger se determinó que en el control positivo únicamente hubo presencia de ADN bacteriano de *Brucella abortus* obtenido de la vacuna Cepa 19. (Wakjira et al., 2022).

7. CONCLUSIONES

1. Se logró determinar mediante análisis estadísticos que la prueba de diagnóstico serológica de Rosa de Bengala presenta una sensibilidad del 75 % y una especificidad del 85 % para la detección de *Brucella abortus*, respecto a la prueba de ELISAc como prueba diagnóstica.

2. La prueba de Rosa de Bengala, pese a su buena sensibilidad y especificidad puede dar lugar a falsos positivos o falsos negativos, mientras que la prueba de ELISAc presenta la capacidad de discernimiento de animales seropositivos, siendo así la prueba confirmatoria.

3. Mediante la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR convencional, no se obtuvieron los resultados deseados para detectar la presencia de la bacteria *Brucella abortus* en muestras de coágulo sanguíneo y leche, debido a que la concentración bacteriana posiblemente no era la adecuada y porque las muestras analizadas no provenían de órganos blanco o de regiones específicas en donde se aloja la bacteria en el organismo del animal infectado.

4. La prueba de PCR 16S en conjunto con secuenciación Sanger permitió comprobar que en el control positivo, la carga bacteriana correspondía a *Brucella abortus* con un porcentaje de identidad del 99,21%. Por lo que esta prueba podría ser una alternativa para confirmar la presencia de la bacteria, en aquellas muestras con resultados no concluyentes mediante las pruebas serológicas, siempre y cuando la carga bacteriana sea suficiente como para poder detectarla.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AGROCALIDAD. (2020). *Dirección de Control Zoonosario - AGROCALIDAD*. https://www.agrocalidad.gob.ec/?page_id=372
- Alamian, S., Esmaelizad, M., Zahraei, T., Etemadi, A., Mohammadi, M., Afshar, D., & Ghaderi, S. (2017). *A novel PCR assay for detecting Brucella abortus and Brucella melitensis. Osong public health and research perspectives*, 8(1), 65-70. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2017.8.1.09>
- Álvarez-Hernández, N., Díaz-Flores, M., & Ortiz-Reynoso, M. (2015). *Brucelosis, una zoonosis frecuente | Revista de Medicina e Investigación*. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medicina-e-investigacion-353-linkresolver-brucelosis-una-zoonosis-frecuente-S2214310615000382>
- Bio-Rad Laboratories. (2014). *Brucella Rose Bengale*. https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/63231_881168_ES.pdf
- BioTech. (2013). Tipos de ELISA. <https://biotech-spain.com/es/articles/tipos-de-elisa-conoces-las-diferencias/>
- Boletines de cifras del sector productivo 2023 – *Ministerio de Producción Comercio Exterior Inversiones y Pesca*. (2023). <https://www.produccion.gob.ec/boletines-de-cifras-del-sector-productivo-2023/>
- Bravo, A., & Zambrano, D. (2022). *Prevalencia Epidemiológica de Brucella abortus en la Parroquia Eloy Alfaro del cantón Chone*. https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1885/1/TIC_MV11D.pdf
- California, Department of Food and Agriculture. (2021). *CDFA - search results*. <https://www.cdffa.ca.gov/v6/serp.html?q=brucella%20abortus>

Campos, L. (2021). Expone especialista principales enfermedades reproductivas en bovinos. Universidad de Colima. https://www.ucol.mx/noticias/nota_8986.htm#!

Córdova, A. (2020). *Brucelosis bovina: repercusión sobre parámetros productivos y reproductivos*. BM EDITORES. <https://bmeditores.mx/ganaderia/brucelosis-bovina-repercusion-sobre-parametros-productivos-y-reproductivos/>

de la Puente, V., Jiménez, A., & López, T. (2020). *Marcadores moleculares para la taxonomía e identificación del género brucella (Alphaproteobacteria)*. Rev. cuba. invest. bioméd;39(1): e336, ene.-mar. 2020. graf | CUMED | LILACS. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1126572#:~:text=El%20g%C3%A9nero%20Brucella%20est%C3%A1%20incluido,su%20alto%20grado%20de%20patogenicidad>

Documento, P., Carlos, J., Muñoz, J., & Peñaherrera, M. R. (2020). *Universidad técnica de Ambato Facultad de Ciencias Agropecuarias carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia tema "Comparación de dos pruebas diagnósticas Brucella ab test kit-ELISA competitivo de alta sensibilidad para brucelosis bovina en un hato lechero del cantón Cayambe provincia de Pichincha. Edu.ec*. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/32030/1/Tesis%20175%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20681%20Juan%20Carlos%20Jurado.pdf>

EllieLab. (2022). *Brucella cELISA*. <https://ellielab.com/wp-content/uploads/2022/04/B1300-PSS-Brucella-cELISA-04212.pdf>

Extraction Kit_Zybio. (2024). <https://www.zybio.com/productxq/40/25.html>

Hidalgo Cumbicos, M. R., Vargas González, O. N., & Vite Cevallos, H. A. (2020). *Análisis situacional de la actividad ganadera en la parroquia Palmales del cantón Arenillas. Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(2), 124-130.

- Insst. (2021). *Brucella abortus*. Portal INSST. <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/brucella-abortus>
- Leary, S. O., Sheahan, M., & Sweeney, T. (2006). *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. 171-173.
- Mainato, S. (2017). *Seroprevalencia de la brucelosis bovina en la provincia del Cañar, Ecuador*.
[https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1480#:~:text=La%20brucelosis%20bovina%20tiene%20una,2009%20\(AGROCALIDAD%2C%202009\)](https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1480#:~:text=La%20brucelosis%20bovina%20tiene%20una,2009%20(AGROCALIDAD%2C%202009))
- Martínez Salazar, L. Prevalencia de Brucelosis Bovina (*Brucella abortus*) mediante los métodos de detección como la prueba del Milk Ring Test (MRT) y la prueba de Elisa Competitiva (Elisa-C). Una Revisión descriptiva. [Universidad Antonio Nariño] <http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/6123>.
- MedlinePlus. (2022). Pruebas de PCR. [https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/pruebas-de-pcr/#:~:text=Las%20pruebas%20de%20PCR%20\(reacci%C3%B3n,c%C3%A9lulas%20anormales%20en%20una%20muestra](https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/pruebas-de-pcr/#:~:text=Las%20pruebas%20de%20PCR%20(reacci%C3%B3n,c%C3%A9lulas%20anormales%20en%20una%20muestra)
- Meza, S., Falcón, N., Hung, A., & Casas, E. (2005). Cuantificación de *Brucella* sp. en bovinos de la provincia de Canta, Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 16(2), 160-163.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. (2016). Agrocalidad. Manual de procedimientos para la atención y control de brucelosis bovina en Ecuador <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/resolucion-0131.pdf>

- MONLAB. (2023). *Rosa de Bengala*.
<https://www.monlab.es/document/Microbiologia/Rosa%20de%20bengala/IFU%20rosa%20bengala%20monlabtest.pdf>
- Mosquera, C. X., Bernal, V., Muskus, L. C., & Berdugo, G. J. (2008). *Detección de Brucella abortus por PCR en sangre y leche de vacunos*. Revista Mvz Cordoba, 13(3).
<https://doi.org/10.21897/rmvz.382>
- Ortiz, M., & Acosta, M. (2014). *Prueba de Rosa de Bengala y/o Tarjeta en el Diagnóstico de Brucelosis Bovina*. <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2014/12/Prueba-de-Rosa-de-Bengala.pdf>
- Pacheco, N., & Mosquera, O. (2015). Detección de *Brucella* sp. por PCR en sangre de bovinos. [file:///C:/Users/DELL/Downloads/885-Texto%20del%20art%C3%ADculo-691-1-10-20180702%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/DELL/Downloads/885-Texto%20del%20art%C3%ADculo-691-1-10-20180702%20(1).pdf)
- Rosero Peñaherrera, D. F., & Soria Rojas, M. E. (2018). Evaluación de pruebas diagnósticas para *Brucella abortus* en bovinos lecheros. Revista Científica de la Universidad Estatal de Quevedo, 8(2), 1-8.
- Sánchez, A., Vayas, T., Mayorga, F., & Freire, C. (2019). Universidad Técnica de Ambato.
https://fca.uta.edu.ec/v4.0/images/OBSERVATORIO/dipticos/Diptico_N20.pdf
- SENASA. (2023). *Prevención de enfermedades reproductivas en vacas lecheras*.
https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/prevencion_de_enfermedades_reproductivas.pdf
- SVANOVA. (2021). *Brucella-AB Competitive*.
<https://www.svanova.com/products/bovine/bp09.html>

- Texas Animal Health Commission. (2020). *La Brucelosis bovina*. https://www.tahc.texas.gov/news/brochures/TAHCFactsheet_BovineBrucellosisSPANISH.pdf
- Tovar, I., & Yepes, A. (2022). *Brucelosis bovina y la efectividad de las pruebas diagnósticas*. Universidad Cooperativa de Colombia.
- Vega, D. (2006). *Brucella abortus: antecedentes y avances en aspectos de patogénesis, diagnóstico y control*. Pontificia Universidad Javeriana. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8252>
- Ventanilla Digital de Trámites del Ecuador. (2023). *Tramites en línea. Brucella abortus*. https://www.gob.ec/tramites/buscar?search_api_fulltext=Brucella%20abortus
- Wakjira, B. S., Jorga, E., Lakew, M., Olani, A., Tadesse, B., Tuli, G., Belaineh, R., Abera, S., Kinfe, G., & Gebre, S. (2022). Animal Brucellosis: Seropositivity rates, Isolation and Molecular Detection in Southern and Central Ethiopia. *Veterinary Medicine*, Volume 13, 201-211. <https://doi.org/10.2147/vmrr.s372455>
- World Organisation for Animal Health. (2022). Acceso en línea al Manual Terrestre - OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal. OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/>
- World Organisation for Animal Health. (2022). *Brucellosis - OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal. OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal*. <https://www.woah.org/es/enfermedad/brucellosis/>
- Wubishet, Z., Getachew, A., Redeat, B., Abde, A., Bayata, S., & Chala, G. (2018, 13 diciembre). Detection of *Brucella* Species from Seropositive Animal Blood Clots using real time PCR assay. <https://www.jsimedcentral.com/journal-article-info/Annals-of->

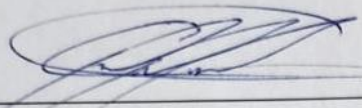
[Clinical-Cytology-and-Pathology/Detection-of-Brucella-Species--from-Seropositive-Animal-Blood-Clots-using-real-time-PCR-assay-9308#section-41980](#)

9. ANEXOS

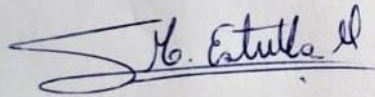
Anexo 1. Resultados Rosa de Bengala y ELISAc por número de casos

Número de caso	No	Observaciones	Resultado Rosa de Bengala	KIT	Resultado ELISAc	Diagnóstico
T-001	1	1+	POSITIVO	ELLIE	55,75	POSITIVO
T-001	2	d	POSITIVO	ELLIE	56,62	POSITIVO
T-001	3	1+	POSITIVO	ELLIE	49,37	Negativo
T-001	4	1+	POSITIVO	ELLIE	70,77	POSITIVO
T-001	5	d	POSITIVO	ELLIE	46,38	Negativo
T-002	6	-	Negativo	SVANOVA	45,57	POSITIVO
T-002	7	-	Negativo	SVANOVA	44,6	POSITIVO
T-002	8	-	Negativo	SVANOVA	38,36	POSITIVO
T-002	9	-	Negativo	SVANOVA	48,0	POSITIVO
T-002	10	-	Negativo	SVANOVA	46,64	POSITIVO
T-002	11	-	Negativo	SVANOVA	40,31	POSITIVO
T-003	12	3+	POSITIVO	SVANOVA	91,13	POSITIVO
T-003	13	d	POSITIVO	SVANOVA	23,95	Negativo
T-003	14	d	POSITIVO	SVANOVA	11,88	Negativo
T-003	15	d	POSITIVO	SVANOVA	9,83	Negativo
T-004	16	-	Negativo	ELLIE	5,23	Negativo
T-004	17	-	Negativo	ELLIE	-4,93	Negativo
T-004	18	-	Negativo	ELLIE	-7,06	Negativo
T-004	19	-	Negativo	ELLIE	35,5	Negativo
T-004	20	1+	POSITIVO	ELLIE	96,22	POSITIVO
T-004	21	-	Negativo	ELLIE	87,63	POSITIVO
T-004	22	d	Negativo	ELLIE	19,3	Negativo
T-004	23	-	Negativo	ELLIE	3,15	Negativo
T-004	24	-	Negativo	ELLIE	0	Negativo
T-004	25	-	Negativo	ELLIE	29,08	Negativo
T-004	26	-	Negativo	ELLIE	11,1	Negativo
T-004	27	3+	POSITIVO	ELLIE	95,96	POSITIVO
T-004	28	d	Negativo	ELLIE	-10,12	Negativo
T-004	29	2+	POSITIVO	ELLIE	96,39	POSITIVO
T-004	30	1+	POSITIVO	ELLIE	96,39	POSITIVO
T-004	31	2+	POSITIVO	ELLIE	96,34	POSITIVO
T-004	32	2+	POSITIVO	ELLIE	95,54	POSITIVO
T-004	33	3+	POSITIVO	ELLIE	97,28	POSITIVO
T-004	34	1+	POSITIVO	ELLIE	96,34	POSITIVO
T-004	35	-	Negativo	ELLIE	9,82	Negativo
T-004	36	-	Negativo	ELLIE	-30,95	Negativo
T-005	37	-	POSITIVO	ELLIE	85,27	POSITIVO

T-005	38	-	POSITIVO	ELLIE	73,91	POSITIVO
T-005	39	-	POSITIVO	ELLIE	94,12	POSITIVO
T-005	40	-	POSITIVO	ELLIE	85,27	POSITIVO
T-006	41	-	Negativo	ELLIE	12,45	Negativo
T-006	42	-	Negativo	ELLIE	5,82	Negativo
T-006	43	-	Negativo	ELLIE	9,18	Negativo
T-006	44	-	Negativo	ELLIE	16,47	Negativo
T-006	45	-	Negativo	ELLIE	1,55	Negativo
T-006	46	-	Negativo	ELLIE	10,92	Negativo
T-006	47	-	Negativo	ELLIE	3,11	Negativo
T-006	48	-	Negativo	ELLIE	20,85	Negativo
T-006	49	-	Negativo	ELLIE	12,06	Negativo
T-006	50	-	Negativo	ELLIE	1,82	Negativo
T-006	51	d	Negativo	ELLIE	16,59	Negativo
T-006	52	-	Negativo	ELLIE	1,82	Negativo
T-006	53	-	Negativo	ELLIE	22,09	Negativo
T-006	54	-	Negativo	ELLIE	19,64	Negativo
T-006	55	-	Negativo	ELLIE	2,37	Negativo
T-006	56	d	Negativo	ELLIE	10,11	Negativo
T-007	57	-	POSITIVO	ELLIE	90,89	POSITIVO
T-007	58	-	POSITIVO	ELLIE	82,85	POSITIVO
T-007	59	-	POSITIVO	ELLIE	92,32	POSITIVO
T-007	60	-	POSITIVO	ELLIE	69,15	POSITIVO
T-007	61	-	POSITIVO	ELLIE	74,71	POSITIVO



Firma de la estudiante
Jaime Rodrigo Burbano Sosa
Quito, 12 de julio de 2024



Firma del director/a de disertación
Mgtr. Sonia Margarita Estrella Vásquez
Quito, 12 de julio de 2024

Firma de la coordinadora de carrera
PhD. Diana Astorga García
Quito, 12 de julio de 2024