

**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.***

Lesly Tatiana Martínez Salazar



Universidad Antonio Nariño

Facultad de Medicina Veterinaria

Programa Medicina Veterinaria

Popayán

2021

**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.***

Lesly Tatiana Martínez Salazar

Trabajo de grado en modalidad de Monografía presentado para optar el título de:
Médico veterinario

Director grado:

MV. Juan Pablo Andrade
Docente Universitario.

Universidad Antonio Nariño

Facultad de Medicina Veterinaria

Programa Medicina Veterinaria

Popayán

2021

a. Dedicatoria

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por mi vida y obtener un peldaño más en mi formación personal y profesional.

A mi familia, por estar a mi lado siempre apoyándome, por su confianza, por darme ánimos para avanzar hacia el camino de éxito y por sus sonrisas alegrías que se han convertido en mi aliciente de cada día.

Y a todos los amigos y compañeros que me tendieron una mano, gracias por darme ánimos para avanzar hacia el camino de éxito profesional.

Lesly Tatiana Martínez Salazar

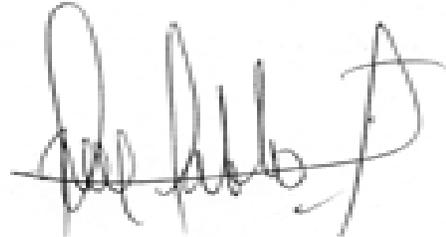
Nota de Aceptación

El trabajo presentado en modalidad de Monografía de grado titulado: **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).**

Revisión descriptiva. Ha sido aprobado como requisito parcial para obtener el título de: Médico Veterinario.



Asesor Temático



Asesor Temático

Asesora Metodológica

Popayán, noviembre de 2021

Tabla de contenido

Resumen	6
1. 10	
2. 12	
3. Justificación	14
4. Objetivos	16
4.1. Objetivo general	16
4.2 17	
5. Estado de arte	17
5.1. Estudios a nivel internacional.	19
6. Metodología.	43
6.1. Tipo de Estudio.	43
6.2. Población de estudio	44
6.3. Muestra	44
6.4. Fases metodológicas aplicadas	44
6.5. Criterios Metodológicos	45
46	
46	
7. Discusión	46
8. Conclusiones	49
9. Recomendaciones	52
Bibliografía 5	
5	
Anexo	60

2. Resumen

Los estudios sobre 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), argumentan que la Brucelosis Bovina es una patología infectocontagiosa conocida como aborto infeccioso que afecta a los bovinos en todo rango de edad con mayor frecuencia en animales sexualmente adultos en ganaderías de cría y leche, de ahí la necesidad de los métodos de detección como la prueba del Milk Ring Test (MRT) o también llamada prueba del anillo en leche (PAL) que se utiliza para el diagnóstico de la brucelosis en rebaños. Para ello se debe 1. Identificar las particularidades de la Brucelosis bovina para determinar la prevalencia y las características de la enfermedad. 2. Analizar los métodos de detección como la prueba del Milk Ring Test (MRT) y la prueba de Elisa Competitiva (Elisa-C), para conocer en diferentes estudios a nivel internacional y nacional que se ha avanzado con el análisis de Brucelosis bovina. 3. Establecer un plan de manejo adecuado de diagnóstico y control en la prevención de la enfermedad de Brucelosis bovina. Se recomienda Implementar los métodos diagnósticos Milk Ring Test (MRT) y Elisa-C, por tener la ventaja sobre las pruebas serológicas (tomadas de una manera invasiva), que estresan al animal con la consecuente pérdida de producción de leche u otro efecto indeseable como producto del manejo del momento de la toma de la muestra. Los estudios referenciados en esta investigación determinaron resultados de concordancia alta entre los métodos de detección Milk Ring Test (MRT) o también llamado Prueba del Anillo en Leche (PAL) y el método de Elisa-C, en lo referente a detectar anticuerpos IgG e IgM (que son inmunoglobulinas o anticuerpos en el suero sanguíneo), atados a los glóbulos de grasa en la leche y a un preparado de cultivos puros de abortus, que forman un anillo en la parte superior de la columna de leche y en las lecturas positivas lo que

permite observar aglutinación en el fondo del tubo y ocasionalmente copos de aglutinación dispersos en la columna de leche, obteniendo de esta manera mejores resultados en la vigilancia de la enfermedad.

Palabras claves: *Brucelosis Bovina, Brucella abortus, prueba del Milk Ring Test (MRT), prueba de Elisa Competitiva (Elisa-C)*

Abstract

Studies on Bovine Brucellosis (*Brucella abortus*) through detection methods such as the Milk Ring Test (MRT) and the Competitive Elisa test (Elisa-C), argue that Bovine Brucellosis is an infectious disease known as infectious abortion that It affects bovines in all age ranges more frequently in sexually adult animals in dairy and dairy herds, hence the need for detection methods such as the Milk Ring Test (MRT) or also called the milk ring test. (PAL) used for the diagnosis of brucellosis in herds. 1. Identify the peculiarities of bovine brucellosis to determine the prevalence and characteristics of the disease. 2. Analyze detection methods such as the Milk Ring Test (MRT) and the Competitive Elisa test (Elisa-C), to find out in different international and national studies that progress has been made with the analysis of bovine Brucellosis. 3. Establish an adequate management plan for diagnosis and control in the prevention of bovine brucellosis disease. Implement the Milk Ring Test (MRT) and Elisa-C diagnostic methods, as they have the advantage over serological tests (taken in an invasive way), which stress the animal with the consequent loss of milk production or other undesirable effects such as product of the handling of the moment of taking the sample. The study's conclusion referenced in this investigation determined results of high concordance between the detection methods Milk Ring Test (MRT) or also called Milk Ring Test (PAL) and the Elisa-C method, in relation to detecting IgG antibodies. and IgM (which are immunoglobulins or antibodies in blood serum), bound to fat globules in milk and to a pure abortus culture preparation, which form a ring at the top of the milk column and on positive readings This makes it possible to observe agglutination at the bottom of the tube and occasionally agglutination flakes dispersed in the milk column, thus obtaining better results in disease surveillance.

Keywords: *Bovine Brucellosis, Brucella abortus, Milk Ring Test (MRT) test, Competitive Elisa test (Elisa-C)*

3. Introducción

La brucelosis es una enfermedad infecciosa presente en el ganado vacuno, caprino, y porcino, es una de las zoonosis que es naturalmente “transmisible desde animales vertebrados al hombre, considerada así por organismos internacionales como: “la Organización Mundial de la Salud (OMS), Fondo de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)”. (Garcell et al., 2016)

En este contexto, “la brucelosis del ganado bovino, es causada por la *Brucella abortus*, así como la brucelosis de caprino, causada por *Brucella melitensis*, que son enfermedades presentes en el código sanitario para los animales terrestres de la OIE (Organización Mundial de Sanidad); Una de las causas para que un rebaño se enferme, es debido a la introducción de animales infectados, a los que previamente no se ha diagnosticado la enfermedad. La incidencia de la enfermedad está dada por factores como manejo, tamaño del rebaño, densidad de población e inmunidad del rebaño”. (Boukary et al., 2013)

A causa de estos factores, “en las últimas décadas se han desarrollado programas de control y erradicación de la brucelosis bovina en varios países coadyuvando con la vacunación de cepa 19 o RB51 y la certificación de predios libres, donde todos estos procesos se apoyan en serodiagnósticos”. (Paulin, et cold., 2009., p.4)

Aunque se han establecido programas de control, “Para la detección de *Brucella* bovina, no es suficiente una sola prueba, sino un conjunto de métodos que comprenden características de crecimiento, en suero, plasma sanguíneo, leche y en otros fluidos orgánicos como plasma seminal y mucus vaginal, según las metodologías prescritas por el manual de la OIE, se

encuentra pruebas con antígeno tamponado de Brucella (BBAT), prueba de fijación del complemento (FC), prueba de ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas (ELISA- C) y Fluorescencia Polarizada (FPA). Actualmente se están usando métodos de detección como la prueba del Milk Ring Test (MRT) y la prueba de Elisa Competitiva (Elisa-C), aunque hay técnicas también muy eficaces como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis de campo pulsado (PFGE), pero son mucho más costosas”. (Román, et cold, 2017., p.10)

Aunado a lo anterior, cuando el diagnóstico es positivo, lo recomendado es el sacrificio del bovino, por lo tanto, “la eficiencia y eficacia de los test de seguimiento son una pauta importante, debido a que, si los resultados obtenidos constituyen falsos positivos, se estaría sacrificando animales sanos, mientras que, si los resultados son falsos negativos, se mantendría animales enfermos en el hato y constituirían una fuente de infección permanente para animales sanos” (Paulin et al., 2009., p.9).

En consecuencia, el objetivo de la presente investigación monográfica es comparar la eficiencia de la técnica de ELISA- C y el método de detección como la prueba del Milk Ring, previamente establecidos para la detección de Brucella bovina.

4. Problema

“La brucelosis bovina es un problema para los animales como para la salud de los hatos ganaderos, está causada principalmente por biotipos de *Brucella abortus*, aunque en algunas ocasiones la *Brucella suis* puede infectar las mamas de las hembras sin llegar a causar aborto en las hembras no gestantes, esta enfermedad no presenta ningún síntoma, pero una vez se incuba la infección por *Brucellosis abortus* o *Brucellosis melitensis*, las hembras adultas en periodo de gestación generalmente desarrollan placentitis que finalmente conduce al aborto entre el quinto y noveno mes de gestación”. (Ortiz, et al, 2007., p.23)

A nivel Internacional la brucelosis bovina es catalogada como enfermedad de declaración obligatoria, “en países de América latina su control se realiza mediante programas direccionados por los servicios veterinarios oficiales. Sea compañía de erradicación se basan en la notificación obligatoria, la vacunación masiva el test diagnostico anterior del movimiento de animales, la declaración de explotaciones y áreas libres de la enfermedad y la identificación de animales infestados. Sin embargo, no en todos los países la eliminación los infectados es realidad, en razón a lo no compensación a ganaderos por el sacrificio de animales positivos, a lo que se considerara una de las causas por lo que la enfermedad continua presente” (Cardenas et al., 2017).

En consecuencia, hay una gran afectación en las hembras gestantes, “la afectación se manifiesta con grandes niveles de excreción de microorganismos por medio de la placenta, las descargas vaginales y los líquidos fetales, así como una afectación de las mamas y los ganglios linfáticos, lo que produce la aparición de algunos microorganismos en la leche; para el caso de

los machos, la brucelosis se manifiesta por medio de la Orquitis, e incluso puede causar esterilidad, aunque en algunos países del trópico, la enfermedad se manifiesta con la aparición de higromas en las articulaciones de las patas, cuyo líquido está infectado por Brucella”. (Ortiz, et al, 2007., p.29)

Otro problema muy evidente de la Brucella es su carácter infecto contagioso, constituidos por bacilos cortos Gram negativos o cocobacilos, “que se disponen de forma aislada y con menor frecuencia en pares o grupos pequeños, no motiles, no producen una verdadera cápsula, ni fimbrias, ni pilis y carecen de capacidad para sintetizar esporas.” (Ortiz, Silva e Izquierdo, 2007, p. 59)

Las secuelas por Brucella abortus dentro del organismo del bovino son muy agresivas, porque “una vez localizada en los ganglios cercanos a la puerta de entrada en sus primeras etapas, se multiplican e invaden el resto del organismo, mediante una descarga de bacterias en la sangre, que puede durar desde meses hasta años, después de la incubación dentro del organismo, la Brucella hace contacto con las células del sistema monocito macrófago, y sobrevive a la degradación enzimática mediante diferentes acciones, como la producción de enzimas antioxidantes, la sintonización de proteínas, la liberación de nucleótidos o mediante el uso de componentes de la su membrana externa, para mayor resistencia”. (Lucero et al, 2008)

Consecuentemente, la bacteria Brucella abortus “penetra en el organismo por vía oral, conjuntival y dérmica, siendo particularmente importantes la ingesta de anexos fecales y pastos contaminados, así como la contaminación de la ubre durante el ordeño; Las malas prácticas de inseminación artificial pueden ser causantes de transmisión de la bacteria, así mismo la bacteria puede ingresar al organismo del bovino a través de la conjuntiva ocular, o mediante la interacción de la vaca y el ternero”. (Ortiz, et al, 2008)

Aunque la bacteria *Brucella abortus* no parece constituir un problema de salud pública para la población, sin embargo hay que mencionar que “la brucelosis bovina puede afectar cualquier órgano de los humanos y su periodo de incubación en el organismo oscila entre 1 y 5 semanas, y puede ser de carácter sintomático o asintomático; una vez alojado en el organismo del huésped, este activa los mecanismos de defensa, pero se ha establecido que el agente desarrolla estrategias de solapamiento inmunológico, que le permiten convivir durante años, sin ser detectados.” (Reyes, et al, 2010).

Por todo lo planteado, se plantea la pregunta problema:

¿Los métodos de detención como las prueba de Milk Ring Test (MRT) y la prueba de ELISA - C son eficientes para la detección de la *Brucella abortus*?

5. 3. Justificación

El presente estudio presentado bajo la modalidad de monografía, se justifica porque permite ampliar los conocimientos que se tienen sobre la Brucelosis Bovina y los métodos de detección como son: Milk Ring Test (MRT) y la prueba de Elisa Competitiva (Elisa-C). Así mismo, esta monografía resulta oportuna teniendo en cuenta la importancia que tiene para la salud pública y la parte económica, de ahí que podría resultar de gran importancia para la medicina veterinaria ampliar las perspectivas sobre la enfermedad y ayudar a que se establezcan medidas de prevención y detección temprana que permitan disminuir sus consecuencias para la salud animal y humana.

En este entorno, este tipo de investigación se justifica para evidenciar la importancia del tema de la Brucelosis Bovina, que para algunos pasa desapercibido a nivel de los productores y falta más estudios para los médicos veterinarios. “Si no se realizan tareas de diagnóstico y saneamiento, la enfermedad perdura en el rodeo por más que las hembras hayan sido inmunizadas, puesto que ninguna vacuna confiere una protección total”. (Lucero et al, 2008., p.12)

Por lo tanto, al contar con una bibliografía seleccionada que aporta una serie de estudios sobre Brucelosis Bovina tanto a nivel Internacionales como Nacional, permiten conocer los últimos avances y métodos de tratamientos de la enfermedad, que son muy valiosos para la investigadora dentro de la profesión de la medicina veterinaria igualmente es un material documental y de consulta para los interesados en el tema.

Igualmente, este trabajo se justifica porque este tipo de enfermedad es muy común y es tema de consulta por parte de los dueños de los hatos a los profesionales de la medicina veterinaria, de ahí que se convierte en un documento de consulta que ayuda al diagnóstico y tratamiento, que servirán a diseñar campañas para la adecuada aplicación de medidas preventivas, lo que podría redituarse en la disminución de los casos reportados de este padecimiento en los bovinos.

Por último, los estudios científicos son un pilar fundamental, porque contribuyen en la formación como profesionales en Medicina veterinaria y además porque los encaminan hacia la investigación, además porque aporta criterios aprendidos desde la universidad y que son valiosos a la hora de consultar, y permite de esta manera establecer un contacto con la realidad de este tipo de enfermedad con el fin de que sea conocida.

6.

7. 4. Objetivos

a. 4.1. Objetivo general

Describir la 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), para conocer los factores de riesgo y establecer como médicos veterinarios un adecuado diagnóstico para el control y prevención de la enfermedad.

b. 4.2. Objetivos específicos

1. Identificar las particularidades de la Brucelosis bovina para determinar la prevalencia y las características de la enfermedad.
2. Analizar los métodos de detección como la prueba del Milk Ring Test (MRT) y la prueba de Elisa Competitiva (Elisa-C), para conocer en diferentes estudios a nivel internacional y nacional que se ha avanzado con el análisis de Brucelosis bovina.
3. Establecer un plan de manejo adecuado de diagnóstico y control en la prevención de la enfermedad de Brucelosis bovina.

8. 5. Estado de arte

La Brucelosis Bovina (*Brucella abortus*), “es una patología infectocontagiosa conocida como aborto infeccioso que afecta a los bovinos en todo rango de edad con mayor frecuencia en animales sexualmente adultos en ganaderías de cría y leche, de ahí la necesidad de los métodos de detección como la prueba del Milk Ring Test (MRT) o también llamada prueba del anillo en leche (PAL) que se utiliza para el diagnóstico de la brucelosis en rebaños”. (Martínez, 2013., p.6)

Referente a la prueba de Elisa Competitiva (Elisa-C), es una variante más compleja de la técnica ELISA, también conocido como ELISA de inhibición debido al uso de un antígeno de referencia que competirá con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo primario;” es un método empleado habitualmente para la detección y cuantificación de sustancias, generalmente proteínas, que se encuentran en concentraciones muy bajas. El método combina la especialidad de unión de los anticuerpos con la amplificación de señal que brindad las reacciones catalizadas por enzimas en la práctica clínica es la técnica inmunológica más empleada. Se utiliza para cuantificar entre otras marcadoras tumorales, y determinar la presencia de antígenos microbianos y para la determinación cualitativa o cuantitativa de anticuerpos totales o frente algún antígeno en particular”. (Nicola et cold, 2019., p.29)

Igualmente, la prueba del Anillo en leche (Pal o MRT) “detecta la presencia en anticuerpos en leche de bovinos. Estos anticuerpos reaccionan con el antígeno coloreado con hematoxiloxina formando un complejo antígeno que queda adherido a la superficie de los glóbulos grasos y asciende con ellos a la superficie formando una capa o anillo de crema e color

purpura azulada, de intensidad variable según el grado de reacción. Paralelamente, desaparece parcial o totalmente la tinción de la columna de leche. Si la muestra no contiene anticuerpos específicos, el antígeno no se fijará a los que la capa de crema forma un anillo de color blanco natural. Es decir el porcentaje de grasa de la muestra influye en la prueba, ya que la formación de anillo de crema en la superficie dependerá del tenor graso” (Nicola et cold, 2019., p.26)

A lo que refiere a la Brucelosis Bovina (*Brucella abortus*), es una enfermedad causada por la bacteria *Brucella abortus*, que provoca abortos en el ganado bovino,” El agente causal de la brucelosis es una bacteria del genero *Brucella*, del cual existen 7 especies, *Brucella abortus* que infecta bovinos, caninos y al hombre, *Brucella mellitensis* que infecta cabras, bovinos, caninos y al hombre, *Brucella Caninis* que infecta a canidos y al hombre, *Brucella ovis* que infecta ovinos, *Brucella suis* que infecta o cerdos, caninos y al hombre, *Brucella maris* que infecta mamíferos marinos, *Brucella neotomae* que infecta roedores”. (Barrios, 2016., p.10)

En cuanto a sintomatología. la brucelosis en el bovino se manifiesta con fiebre, dolor en las articulaciones y fatiga, por lo general, escalofríos, debilidad, fatiga, “Los síntomas de la brucelosis pueden desaparecer durante semanas o meses y después volver a aparecer, algunos bovinos tienen brucelosis crónica y tienen síntomas durante años, incluso después del tratamiento”. (Barrios, 2016., p.13)

Para este estado de arte, la investigación se realiza a través de una Revisión descriptiva que proporciona al investigador los estudios útiles en el área de la medicina veterinaria la cual está en constante evolución en relación a la Brucelosis Bovina y a los métodos de detección como la prueba del Milk Ring Test (MRT) y la prueba de Elisa Competitiva (Elisa-C).

Los objetivos trazados para esta investigación están direccionados, al lograr Identificar las particularidades de la Brucelosis bovina para determinar la prevalencia y las características de la enfermedad. Analizar los métodos de detección como la prueba del Milk Ring Test (MRT) y la prueba de Elisa Competitiva (Elisa-C), para conocer en diferentes estudios a nivel internacional y nacional que se ha avanzado con el análisis de Brucelosis bovina. Y, por último, Establecer un plan de manejo adecuado de diagnóstico y control en la prevención de la enfermedad de Brucelosis bovina. Estos objetivos están correlacionados se con la base bibliográfica

A continuación, se presenta una matriz bibliográfica a nivel internacional y nacional que encausan los objetivos trazados.

a. 5.1. Estudios a nivel internacional.

En Guatemala, se realizó un estudio sobre la “Determinación de la presencia de anticuerpos contra *Brucella abortus* en leche de vaca utilizada en procesadoras, del municipio de Asunción Mita, Jutiapa. Se analizaron un total de 57 muestras de leche, las cuales representan el total de hatos bovinos que proveen leche a las 11 procesadoras identificadas. Las muestras fueron obtenidas en cada hato, identificadas, refrigeradas y transportadas al Laboratorio del Departamento de Microbiología de la FMVZ/USAC, donde fueron analizadas mediante la prueba de anillo en leche (PAL). En 4 (36%) de las 11 procesadoras estudiadas se encontraron anticuerpos contra *B. abortus*. De las 57 muestras (15.79%), 9 resultaron positivas a la presencia de anticuerpos contra *B. abortus*. La cantidad de litros analizados por hato no influyeron en los resultados obtenidos por la PAL, demostrando que el factor de dilución no afectó, ya que con la

prueba de Chi2 se indicó que no hubo asociación entre ambas variables. La procedencia de la leche no fue un factor influyente en los resultados obtenidos, ya que no hubo diferencia significativa estadísticamente. Los anticuerpos postvacunales no influyeron en el resultado de la prueba ya que el 100% de los hatos muestreados no son vacunados contra la brucelosis bovina” (Barrios, 2016., p.6).

En Ecuador, se realizó una investigación en la asociación agropecuaria, el Ordeño con el fin de (1) determinar la prevalencia de Brucelosis bovina mediante análisis de laboratorio en vacas productoras, (2) determinar los factores de riesgo, (3) elaborar un plan sanitario para el control y erradicación de la enfermedad. De 1380 vacas en producción muestreadas se determina una prevalencia aparente de Brucelosis bovina del 3.26 % en los hatos. El Riesgo relativo en el grupo de los expuestos es de 29,67 veces más la probabilidad de contagio de la enfermedad mientras que el grupo de los no expuestos es de 0,034 veces menos probabilidad de contagiarse. La tasa reproductiva base es de 1,03 lo que nos indica que la enfermedad tiene tendencia a convertirse en epidemia. Los factores de riesgo de la enfermedad son: la procedencia de animales de remplazo desde las ferias; la falta de inmunización; la presencia de abortos, aunque esto puede ser por Brucelosis u otras enfermedades bacterianas o carenciales; la forma de reproducción y la falta de pediluvios en la entrada de las fincas para realizar la desinfección. Encontrándose la presencia Brucelosis bovina en la comunidad La Chimba”. (Neppas, 2013., p.9).

En Uruguay, en un estudio sobre “Evaluación de Elisa indirecta y polarización de Fluorescencia como alternativa de "Screening" para Brucelosis Bovina. Uruguay – Montevideo. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. La Brucelosis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa causada por *Brucella abortus* que afecta principalmente a los bovinos y

secundariamente a otras especies animales y a los humanos (fiebre ondulante). Normalmente, la enfermedad es asintomática en hembras no gestantes. En caso de infección por *B. abortus* las hembras adultas en gestación desarrollan una placentitis que por lo general conduce al aborto entre el quinto y el noveno mes de gestación. Pocas enfermedades infecciosas disponen para su diagnóstico de tantas pruebas serológicas como la brucelosis bovina”. (Rosas, 2011., p.10)

En Uruguay, se utiliza como prueba de screening Rosa de Bengala (RB) y como prueba confirmatoria Rivanol. Siendo estas técnicas junto a la Fijación del Complemento (FC) y a 2-Mercapto-etanol las únicas legalmente aceptadas en el país. Los objetivos de este estudio fueron:

1) Evaluar y validar las pruebas de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) indirecta y Polarización Fluorescente (FPA) en suero como herramienta para la vigilancia epidemiológica de la Brucelosis bovina y su control-erradicación en el Uruguay, y 2) determinar la sensibilidad analítica de las pruebas de ELISA indirecta sobre pools de suero en busca de una alternativa para la vigilancia de rodeos a menores costos. Para ello se utilizó: 100 sueros negativos seleccionados de establecimientos ganaderos sin antecedentes históricos de *Brucella*, abortos infecciosos, y/o serología y 100 sueros positivos seleccionados del banco de sueros que se generaron a partir de focos activos de la enfermedad, a los cuales se les habían realizado las pruebas confirmatorias en la DiLaVe” (Rosas, 2011., p.10).

Por tanto, “Las pruebas serológicas utilizadas para analizar todas las muestras fueron: FPA, ELISA indirecto, RB y Rivanol. A los valores cuantitativos obtenidos se les realizaron curvas ROC (Receiver operating characteristic curve), los resultados obtenidos al comparar la eficacia de las pruebas de ELISA indirecto y de Polarización Fluorescente fueron de 0,9989 y 0,9990 respectivamente. Los resultados correspondientes a la sensibilidad analítica en diluciones

no mayores a 1/8 fueron de un 94,44%. Se concluye que ninguna técnica diagnóstica es capaz de detectar el 100% de los animales infectados. Cada país debería adecuar las metodologías diagnósticas acorde a sus posibilidades y necesidades. Uruguay debería poner énfasis en mejorar la sensibilidad y especificidad de las técnicas utilizadas para el diagnóstico de la Brucelosis, debido a la baja prevalencia que se presenta en él actualmente. Las técnicas de ELISA indirecto y Polarización Fluorescente, utilizadas ampliamente a nivel internacional y recomendadas por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), tendrían que ser reevaluadas para implementarlas como alternativas más eficientes”. (Rosas, 2011., p.10).

En Venezuela, en una investigación se analizaron 6 técnicas de ELISA para el diagnóstico y epidemiología de la brucelosis bovina se conformó un banco de 1.251 sueros sanguíneos de vacas adultas provenientes de tres niveles epidemiológicos diferentes: 244 de vacas infectadas, vacunadas cuando terneras con cepa 19 de *B. abortus*; 507 vacas pertenecientes a fundos libres de infección y vacunadas cuando terneras con cepa 19 y 500 libre de infección y sin vacunación. Todos los sueros fueron sometidos a los test rutinarios de Rosa de Bengala (RB), Rivanol (RIV) y Fijación de Complemento (FC) y adicionalmente a tres enzimoimmuno ensayo (ELISA); dos de ellos fueron técnicas de ELISA-indirecto, uno utilizando anticuerpos policlonales (I-ELISAp) y el otro, utilizando anticuerpos monoclonales (I-ELISAm). El tercer ELISA fue de competencia (ELISA-C), efectuado con antígeno LPSs, anticuerpo monoclonal M-84 y anticuerpo anti-ratón preparado en cabra, conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRPO). Al detectar los reactores positivos a partir del estrato de animales infectados se encontró en RB 13,5%, RIV 11,9%, FC 12,7%, I-ELISAp 50,8% e I-ELISAm 22,9% y ELISA-C fue de 44,4%.”. (Sánchez, 2009., p.3)

De igual manera en Venezuela, se realizó un estudio en Monitoreo Epidemiológico para *Brucella Abortus* en fincas doble propósito del municipio Machiques de Perijá, Venezuela. parte ii: validez y seguridad de las pruebas anillo de la leche y Rosa de Bengala, Se evalúa la capacidad operativa de las pruebas diagnósticas: anillo de la leche (PAL), inmuno ensayo enzimático indirecto (ELISA-i), rosa de bengala (RB) y ELISA competitivo (ELISA-c), utilizadas tras 5 años (2003-2007) de vigilancia epidemiológica para brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en el municipio Machiques de Perijá, partiendo de la revalorización de un conjunto de muestras de leche y suero probados positivos y negativos. La garantía de diagnóstico previamente positivo fue alcanzada a través de evidencias epidemiológicas y positividad comprobada en suero sanguíneo al ensayo con antígeno buferado en placa y confirmación mediante fluorescencia polarizada (FP); sólo se consideraron negativos probados, los sueros y leches globales provenientes de animales negativos a FP que a lo largo del estudio no presentaron antecedentes serológicos alguno. Los resultados en leche muestran superioridad de ELISA-i versus PAL, en sensibilidad, 98,55 contra 56,52%; especificidad 99,41 y 98,82%; predicción positiva 98,58 y 95,12%; predicción negativa 99,49 y 84,84%; y cocientes de probabilidad. El nivel de concordancia entre los resultados y el verdadero estatus de las muestras fue también preferente para ELISA-i, 97,8 contra 55,3%. Las evidencias sobre sueros probados dejan en duda la contribución de RB en el diagnóstico, control y erradicación de la enfermedad en el área de estudio, al demostrarse valores medios de validez (169,92 versus 197,21) y seguridad (171,74 versus 197,02), además de bajos coeficientes de verosimilitud entre sus resultados. ELISA-c, en cambio, mantuvo excelente capacidad diagnóstica”. (Sánchez, 2009., p.1)

Otro estudio realizado en Buenos Aires- Argentina, en una investigación sobre *Brucelosis bovina*, se realizaron pruebas usadas para el diagnóstico de brucelosis para detectar anticuerpos que reconocen la cadena O del LPS de la membrana externa. Si bien estas pruebas son de elevado valor diagnóstico no permiten determinar si se trata o no de una infección actual. Para medir anticuerpos aglutinantes se utilizan la prueba del Rosa de Bengala y la aglutinación en tubo que tienen una estrecha correlación. En la cronicidad se incrementa la producción de anticuerpos no aglutinantes de la clase IgG, que alcanzan en ciertos casos al 80 % de los anticuerpos totales. La prueba de Coombs indirecta es la más importante en la detección de este tipo de anticuerpos con métodos de detección la prueba de Elisa Competitiva (Elisa-C). En la etapa de curación de la enfermedad el título de anticuerpos medido por pruebas de aglutinación descende en la detección de este tipo de anticuerpos. En la etapa de curación de la enfermedad el título de anticuerpos medido por pruebas de aglutinación descende lentamente y se negativiza entre los 6 y 12 meses posteriores, mientras que la prueba de Coombs puede mantenerse positiva aún por más tiempo.” (Castro, et al, 2005., p.14)

En México, en un estudio sobre Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con brucelosis y revacunado con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19, “se realizó en bovinos Holsteing con brucelosis, donde se revacuna la totalidad de las vacas seronegativas con la dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19, para obtener la especificidad de pruebas utilizadas en el diagnóstico. Se trabajó con 73 hembras adultas, seis de ellas fueron positivas y permanecieron en el establo, pero no fueron revacunados: 67 se revacunaron con la cepa 19 de *B. abortus* (3 x 10 unidades formadoras de colonias).

Por lo anterior en este estudio se obtuvo suero los días 0, 30, 60, 180, y 270 pos revacunación, y se utilizó tarjeta, Rivanol, fijación de complemento (FC), inmunodifusión radial (IDR), ELISA, indirecto (ELISA-I) y ELISA-C e IDR, se aisló *B. abortus* biotipo 1. En tarjeta, Rivanol Elisa. I y FC, se detectaron más reactores positivos de los 30 a los 270 días pos revacunación: ELISA – C e IDR presentaron bajo número de positivos, que correspondieron a las seis vacas positivas al día 0. La especificidad para ELISA – C e IDR siempre fue del 100%. A los 270 días, tarjeta, Rivanol, FC y ELISA – I dieron 53, 74, 59 y 76% respectivamente. Se concluye que ELISA-C e IDR son capaces de diferenciar vacunados de infectados; para el serodiagnóstico en animales revacunados es necesario esperar más de 10 meses, ya que a los 9 meses más de 5% de los animales revacunados seguían siendo positivos a las pruebas oficiales de diagnóstico”. (Aparicio et al, 2005., p.12)

En Brasil, en un estudio realizado sobre, Evaluación entre cuatro técnicas serológicas para el diagnóstico de infecciones causadas por *Brucella abortus* en bovinos, se analizaron muestras de suero de 200 hembras bovinas adultas vacunadas de dos rebaños mediante la prueba en placa acidificada con antígeno tamponado (AAT) (prueba en placa de rosa de Bengala), el ensayo de inmuno absorción indirecta ligado a enzimas (ELISAI), la prueba de 2-mercaptoetanol (2-ME) y el complemento prueba de fijación (FC). Para ELISAI, se utilizó el valor fijo de 45 por ciento de positividad (PP). El grupo A estuvo compuesto por 100 animales, con descripción de alteraciones reproductivas compatibles con brucelosis y reactivo para la AAT. El grupo B estaba compuesto por 100 animales serológicamente libres de *B. abortus* durante al menos dos años. Además, todas las muestras de suero se analizaron utilizando el AAT, el 2-ME y el FC para confirmar el estado negativo. La combinación de dos pruebas, FC y 2- ME se utilizó como estándar de oro. Se calcularon la sensibilidad y especificidades relativas y el Kappa para cada

prueba. El resultado de kappa para 2-ME en relación al FC y del AAT y del ELISAI en relación al patrón oro fue, respectivamente, 0,78, 0,86 y 0,84. Las sensibilidades relativas (Sr) fueron, respectivamente, 84,1% (53/63), 100% (53/53) y 98,1% (52/53), y las especificidades relativas (Er) fueron 93,3% (111/119), 90,1% (100/111) y 90,1% (100/111). Para la comparación entre ELISAI y AAT, se obtuvo un Kappa de 0.91, Sr de 93% (93/100) y Er de 98% (98/100).

Conclusiones: 1 - La opción de constituir el patrón oro con base en al menos dos pruebas y Er similar a la AAT. Por lo tanto, el AAT y el ELISAI son buenos para el cribado en lo que respecta a que fue el más adecuado para este estudio; 2 - El ELISAI arrojó valores de Sr al diagnóstico de brucelosis". (L.M.S. Paulin, 2009., p.2)

5.2. Estudios Nacionales

En Bogotá. Colombia, en un estudio realizado, Los análisis de concordancia se usan para comparar métodos de diagnósticos cuando se aplican al mismo grupo de individuos (muestras pareadas). En el presente artículo se analiza el caso de dos métodos de laboratorio, cuyos resultados se expresaron en forma de variable cualitativa dicotómica (positivo/negativo). Para analizar el problema de la concordancia se utilizó el método *visión dual de la concordancia*, que se basa en un supuesto principal: dos métodos diagnósticos concuerdan cuando tienen la misma sensibilidad y especificidad. El estudio fue realizado con 153 muestras de leche correspondientes a igual cantidad de rebaños de la zona central de Chile; estos se clasificaron en tres estratos, definidos según el número de vacas en lactancia en el momento de obtener la muestra. Se aplicó la metodología estándar para prueba del anillo en leche (PAL) y ELISA indirecto (ELISA-i). Para determinar la concordancia entre los dos métodos diagnósticos, se utilizaron los valores

observados en los tres estratos (A, B y C); para cada uno se calculó la tasa de concordancia (λ). Los resultados de concordancia obtenidos fueron altos en todos los estratos, por lo que se concluye que tanto PAL como ELISA-i se podrían usar para diagnosticar la brucelosis bovina”. (Moreira, 2017., p.33)

En Bogotá – Colombia, se realizó un estudio, *Brucella abortus*: Antecedentes y avances en aspectos de patogénesis, diagnóstico y control. En el presente trabajo, Se realizó una revisión bibliográfica con descripciones detalladas de las características morfológicas y fisiológicas del género *Brucella*, enfatizando en *Brucella abortus*. De la misma forma se profundizó sobre los mecanismos de patogenicidad, virulencia, supervivencia en el huésped, aspectos zoonóticos y los diversos síntomas que produce en el animal. También demuestra la situación actual de algunos países que la presentan y los que ya la han erradicado. Se hicieron descripciones detalladas de las dos vacunas utilizadas contra *Brucella abortus* (cepa 19 y RB51) teniendo en cuenta sus características, efectos que producen en el animal, modos adecuados de uso y las interferencias que se ocasionan con el uso inadecuado de estas vacunas en el diagnóstico de la brucelosis bovina. Por lo que se pudo concluir, de acuerdo al análisis de la revisión bibliográfica, que la vacuna RB51 además de proporcionar un efecto protector similar al que induce la cepa 19, por las características que presenta, no interfiere con los resultados de las pruebas diagnósticas de la enfermedad y no tiene efectos secundarios en el animal, inconveniente que se ha presentado con la vacuna cepa 19. En cuanto al diagnóstico de la enfermedad, de acuerdo a la revisión bibliográfica se evaluaron los métodos basados en la detección de anticuerpos en suero mediante pruebas de aglutinación rápida Rosa de Bengala, Fijación de Complemento, Elisa indirecta y Elisa competitiva, además, de los nuevos métodos moleculares de diagnóstico, determinando la utilidad de la ELISA indirecta como prueba tamiz de elevada sensibilidad con respecto a la

prueba Rosa de Bengala y la confirmación de positivos mediante ELISA competitiva con respecto a fijación de complemento, además de la utilidad de la prueba de ELISA competitiva como prueba confirmatoria diferencial de estatus de infección o vacunación de los animales reactivos positivos en la prueba indirecta. Sugiriendo que su aplicación acompañada del buen manejo y toma de muestras, proporcionará un método más exacto y estandarizado para el diagnóstico y para la ayuda de las campañas de erradicación y control de la enfermedad”. (Vega, 2006., p.4)

En Colombia, en un estudio sobre “Concordancia entre la prueba del anillo en leche y ELISA indirecto en el diagnóstico de brucelosis bovina. Los análisis de concordancia se usan para comparar métodos de diagnósticos cuando se aplican al mismo grupo de individuos (muestras pareadas). En el presente artículo se analiza el caso de dos métodos de laboratorio, cuyos resultados se expresaron en forma de variable cualitativa dicotómica (positivo/negativo). Para analizar el problema de la concordancia se utilizó el método visión dual de la concordancia, que se basa en un supuesto principal: dos métodos diagnósticos concuerdan cuando tienen la misma sensibilidad y especificidad. Como ejemplo se tomó el estudio realizado en Chile y se enfocó en las pruebas de laboratorio a 153 muestras de leche de bovino correspondientes a igual cantidad de rebaños de la zona central de Chile; Observando y analizando y clasificando estas muestras en tres estratos, definidos según el número de vacas en lactancia en el momento de obtener la muestra. Con base a estas pruebas de laboratorio se aplicó la metodología estándar para prueba del anillo en leche (PAL) y ELISA indirecto (ELISA-i). Para determinar la concordancia entre los dos métodos diagnósticos, se utilizaron los valores observados en los tres estratos (A, B y C); para cada uno se calculó la tasa de concordancia (λ). Los resultados de concordancia obtenidos

fueron altos en todos los estratos, por lo que se concluye que tanto PAL como ELISA-i se podrían usar para diagnosticar la brucelosis bovina”. (Moreira, 2017., p.2).

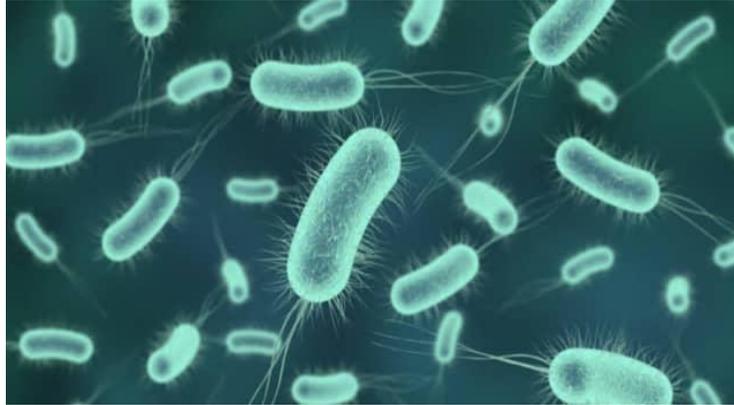
➤ **Particularidades de la Brucelosis bovina para determinar la prevalencia y las características de la enfermedad.**

En este objetivo se abordan ciertas particularidades de la investigación científica en medicina veterinaria, se relacionan algunos de los criterios que son necesarios para seleccionar y definir correctamente el tema de esta investigación y el problema partiendo del objetivo general.

Acorde con lo anterior, “la Brucella es una bacteria Gram negativa, facultativa, cocobacilo, intracelular, inmóvil, aerobio estricto, productor de ureasa y ácido sulfhídrico. Su desarrollo en el organismo hospedero es lento y como característica adicional no poseen capsulas ni forman esporas. Tienen un metabolismo oxidativo, ya que utilizan los nitratos como receptor de electrones, adicionalmente son catalasa y oxidasa positivos, no fermentan los azucares por lo tanto no modifican la leche, es así como su presencia en la leche no afecta el sabor y apariencia de esta y se requiere de pruebas para su identificación” (Gillespie S, Hawkey P., 2006., p.13)

Figura 1.

Bacteria de Brucelosis Bovina



Fuente: *Kateryna Kon/Shutterstock. By Dr. Shafer, Reviwwed by Susha Cheriyeath, M.Sc. Bacteria's de la Brucella, ejemplo 3D. Bacterias pleomórficas gramnegativas que causan brucelosis en ganado y seres humanos y son transmitidas al hombre por el contacto directo con el animal enfermo o por la leche contaminada.*

Figura 2

Cultivo de Brucella sp, en laboratorio.



Fuente: Morales & Morillo (2020). Evaluación de la técnica de ELISA indirecto OPS para *Brucella* sp. en muestras de leche y sangre de bovinos mediante análisis comparativo con tres métodos diagnósticos.

“Las diferentes especies de *Brucella* obtenida en medio de cultivo se clasifican en rugosas y lisas. Este aspecto que adquieren las colonias es debido a la expresión del lipopolisacárido LPS en la superficie bacteriana, LPS-S en las lisas y LPS-R en las rugosas. De esta manera esa diferencia química hace que las cepas de *Brucella* en fase lisa sean las más virulentas y adicional

a esto su estructura es similar a la de las entero bacterias; las cepas de Brucella en fase lisa son B. abortus, B. melitensis, B. suis y B. neotomae”. (Romero, 2007., p5)

En este sentido, la brucelosis bovina es una enfermedad infecciosa causada por la Brucella abortus que es una Bacteria Gram negativa y aerobia estricta, de crecimiento lento que no posee cápsula ni forma esporas diferenciándose de muchas otras bacterias, está constituida por dos cromosomas circulares y carece de plásmidos”. (Vega, 2006., p.9)

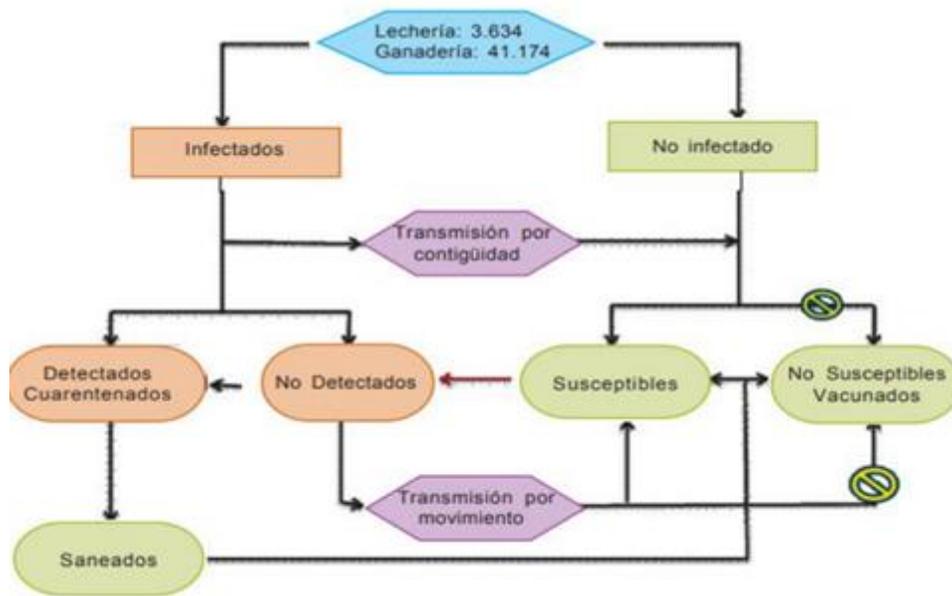
“La transmisión de la bacteria abortus ocurre principalmente por vía oral porque las vacas tienden a lamer los fetos y las descargas genitales que se producen durante el aborto, de tal manera que la exposición a la bacteria, también puede ocurrir en el útero o cuando los terneros nacidos de vacas sanas, son alimentados con calostro o leche de vacas infectadas; La contaminación de los corrales o pasturas ocurre cuando las vacas infectadas abortan o paren normalmente al término de la gestación. Aunque es ampliamente aceptado que B. abortus no es excretada por un tiempo considerable previo al aborto, la excreción en la descarga vaginal de vacas infectadas puede ocurrir tan al aborto, la excreción en la descarga vaginal de vacas infectadas puede ocurrir tan temprano como a los 39 días después de la exposición. Una masiva excreción de Brucella comienza después del aborto y puede continuar por 15 días. Aunque la descarga del tracto genital usualmente se libera de microorganismos después de 2-3 meses de la infección, algunas vacas pueden quedar como portadoras y excretar bacterias de manera intermitente y por muchos años”. (Castro, 2005., p.3)

La evolución subclínica y clínica de la Bacteria de Brucelosis Bovina es un proceso patológico de acontecimientos biológicos y de contaminación es una acción secuencial de causas

componentes y etiologías que se van desarrollando en la enfermedad, donde hay un desenlace, una curación a través del tratamiento adecuado, de no ser así se pasa a la cronicidad o la muerte, de tal manera.

Figura 3.

Bacteria de Brucelosis Bovina



Fuente. Gil & Piaggio, (2013). Modelo conceptual de difusión de la Brucelosis bovina entre rebaños

Es importante mencionar que, “la transmisión por contigüidad se da tanto vertical como horizontal, generalmente la misma suele ser por contaminación directa y, aunque existe la eventualidad de que la infección se propague por moscas, perros, ratas, garrapatas, botas infectadas, pienso y otros objetos inanimados, esta no es valiosa para las medidas preventivas”. (Radostits y col., 2002).

Igualmente, “la fuente de infección la componen los animales infectados que excretan una gran cantidad de bacterias contaminando así el suelo, los corrales, la paja de las camas, el agua de los arroyos, canales y pozos”. (Castro y col., 2005).

En los animales como lo bovinos se suele transmitir por contacto con la placenta, el feto, los líquidos fetales y las descargas vaginales de los animales infectados. Los animales se encuentran en estado infeccioso después de un aborto o parto a término. Podemos encontrar también *B. abortus* en la leche, la orina, el semen, las heces y el líquido de los higromas. La liberación de la bacteria en la leche puede ser intermitente, prolongada o permanente”. (Iowa State University, 2009)

Para el caso de “los toros no suelen transmitir la infección de forma mecánica de vacas infectadas a las no infectadas. Aquellos toros que se encuentren infectados pueden secretar semen que contiene la bacteria, pero no es probable que transmitan la infección. Aunque, el riesgo de contagio a partir del toro es mucho superior si se emplea el semen para inseminación artificial”. (Radostits y col., 2002)

Obviamente, que “la principal y más frecuente transmisión de la infección es por vía oral: dado el hábito del vacuno -hembra y macho- de lamer sobre fetos, terneros recién nacidos, placenta y cotiledones, excreciones uterinas y vulvares; así como la ingestión de forrajes, calostro, leche y agua contaminados con la bacteria”. (Olascoaga, 2008)

Aunque cabe mencionar que ocasionalmente, puede producirse la infección por las vías conjuntival, cutánea y a través de los pezones mamarios. “La transmisión por inhalación a erógena es factible cuando en establos, galpones y espacios cerrados, conviven animales

susceptibles con animales infectados que pueden liberar aerosoles con altas concentraciones de la bacteria”. (Olascoaga, 2008)

“Un pequeño porcentaje de vacas infectadas logran recuperarse completamente de la infección, debiéndose considerar como portadoras permanentes tanto si abortan como si no”. (Radostits y col., 2002)

En este entorno, “la enfermedad los rebaños son categorizados como infectados o libres de la enfermedad. A su vez, los rebaños infectados se clasifican en dos grupos los detectados y los no detectados. Estos últimos son establecimientos infectados sin programas de control y sin limitaciones para transmitir la enfermedad”. (Gil y Piaggio, 2013)

Las características, están asociadas al animal infectado el cual contamina el ambiente con las secreciones vaginales pre parto, el feto o el aborto están altamente contaminados, la leche es una vía de salida de la bacteria, las secreciones pos parto pueden contaminar por 1 o 2 meses, es así que las vaquillas y vacas sanas se infectan principalmente por vía digestiva, al lamer secreciones de abortos, o comer pasto contaminado, por otra parte las terneras hijas de vacas infectadas pueden contraer la enfermedad vía tras placentaria, las vaquillas son más sensibles que las vacas y las hembras gestantes son más propensas a infectarse. El germen se disemina ubicándose en el feto en las hembras gestantes y en la glándula mamaria”. (De Figueiredo et cold, 2015., p.7)

“El bovino infectado contamina el ambiente con las secreciones vaginales pre parto, el feto o el aborto están altamente contaminados, la leche es una vía de salida de la bacteria, las terneras hijas de vacas infectadas pueden contraer la enfermedad vía tras placentaria, las vaquillas son

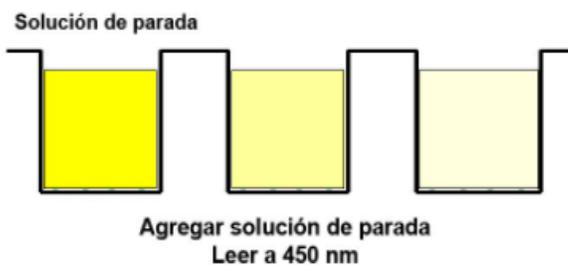
más sensibles que las vacas y las hembras gestantes son más propensas a infectarse; El germen se disemina ubicándose en el feto en las hembras gestantes y en la glándula mamaria. El único síntoma visible es el aborto espontáneo, que se produce en el último tercio de la preñez. Puede ser diagnosticada por pruebas serológicas que detectan la presencia de anticuerpos. Las hembras que adquieren el contagio pueden presentar cero reacciones en las 6 semanas a 6 meses después”. (De Figueiredo et cold, 2015., p.7).

➤ **Métodos de detección de Brucelosis Bovina: Prueba del Milk Ring Test (MRT) y la Prueba del Elisa Competitiva (Elisa-C)**

Las Pruebas del Milk Ring Test (MRT) y de Elisa Competitiva (Elisa-C), son unos de los métodos más adecuados para la detección de la Brucelosis Bovina a nivel Internacional y Nacional, las cuales han podido lograr un pronóstico temprano, son instrumentales a la hora de determinar la detección temprana realmente reducen la mortalidad en los bovinos y otros animales.

Figura 4

Prueba del Elisa Competitivo.



Fuente: Myela López M. Fernanda Rodríguez Alexander Romero (2016). ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Prueba Inmunoadsorbente Ligado a Enzimas

La prueba de ELISA – C, “se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, uno de los cuales debe ser de reactividad conocida. El color se genera por la interacción de un sustrato cromo génico y una enzima que ha sido acoplada al anticuerpo detector. Si debe

medirse el anticuerpo, se coloca el antígeno en la fase sólida, como una capa de captura. Después de la reacción del antígeno con el suero del paciente, la capa de detección puede ser un reactivo anti inmunoglobulina clase específica (IgM o IgG) para detectar respuesta de anticuerpos clase específicos. Los métodos de ELISA dependiendo de la actividad enzimática se dividen en dos tipos: Competitivos y No competitivos. En este método, el anticuerpo de la muestra va a competir con el conjugado por un número limitado de sitios de unión del antígeno”. (López et al., 2016., p.3)

De igual manera “la prueba de ELISA – C, tiene un grado de fiabilidad del 90,53%, debido a que esta prueba es semi cuantitativa y utiliza tecnología más específica al detectar anticuerpos contra el polisacárido de cadena O de la cadena LPS, es eficaz al momento de realizar las pruebas y porque detecta anticuerpos contra *Brucella* sp. con un 100% de confiabilidad, y un 99,9% en sensibilidad en la técnica FPA”. (López et al., 2016., p.3)

Por otra parte, “el Elisa no competitivo, consiste en enfrentar la muestra con el antígeno o anticuerpo que está en la fase sólida. Si una muestra es positiva se formará el complejo antígeno-anticuerpo y al agregar el conjugado reaccionará con el respectivo sustrato desarrollando color como los directos que detectan antígenos, los indirectos que detectan anticuerpos”. (López et al., 2016., p.4)

El método tiene un protocolo específico a seguir; “Tapizado del pocillo con el antígeno o anticuerpo; Adición de la muestra problema con la mezcla de antígenos o anticuerpos; Unión del antígeno o anticuerpo específico al anticuerpo o antígeno tapizado en el pocillo; Lavado del pocillo para eliminar el exceso de anticuerpo o antígeno no

unido; Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima Unión del anticuerpo secundario al antígeno o anticuerpo; Lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida Adición del sustrato; Unión del sustrato a la enzima; Desarrollo del color; Los pocillos de la micro placa se recubren con los antígenos. Al añadir las muestras el anticuerpo se une a los pocillos recubiertos”. (López et cold.,2016., p.4)

Figura 5

Prueba del Milk Ring Test (MRT)



Fuente: Acosta (2016). Servicio Nacional de sanidad agraria del Perú. Prueba de anillo en leche para la vigilancia epidemiológica de Brucelosis bovina

La prueba de Anillo en Leche (PAL) también es conocida como “Milk Ring Test” (MTR) fue diseñada por Fleishauer (1937) para evidenciar o detectar anticuerpos IgG e IgM atados a los glóbulos de grasa en la leche. En esta prueba se emplea un antígeno preparado a partir de cultivos puros.

“La Prueba de Anillo en Leche (PAL) también es conocida como “Milk Ring Test” (MTR) fue diseñada por Fleishauer (1937) para evidenciar o detectar anticuerpos IgG e IgM atados a los glóbulos de grasa en la leche. En esta prueba se emplea un antígeno preparado a

partir de cultivos puros de *B. abortus* S99 o S1119-3 a una concentración celular del 4% coloreada con un compuesto que se obtiene de la planta leguminosa (hematoxilina) y con un PH de 3,3 - 3,7". (Acosta, 2016, p.9)

“La aplicación de la prueba de Anillo en Leche tiene la ventaja sobre las demás pruebas serológicas de que las muestras no son tomadas de una manera Invasiva por lo que no se estresa al animal y se emplea frecuentemente en zonas libres y de control de la enfermedad, ayuda a descubrir hatos infectados y es usada ampliamente en vigilancia epidemiológica porque permite controlar periódicamente a la brucelosis en los establos, además contribuye a descubrir si la infección se ha reinstalado en la unidad de producción lechera. La Prueba PAL es útil en ganado bovino, resulta ineficaz en los pequeños rumiantes según la OIE”. (Acosta .2016, p.9)

Cabe señalar que para adquirir Aba Test Leche “se debe realizar la Prueba de Anillo en leche, al igual que otros antígenos que permiten diagnosticar la brucelosis en bovinos, ovinos y caprinos y con esto optimizar su producción y prevenir enfermedades en la población”. (Castro et cold., 2005., p.15)

“En la etapa aguda se generan anticuerpos aglutinantes La IgM e IgA irán descendiendo progresivamente hasta negativarse antes de los 6 meses, mientras que la IgG podrá permanecer detectable durante 2 ó 3 años. Los anticuerpos de clase IgG permiten seguir el curso de la infección. Dado lo anterior se pueden generar falsos positivos, es por eso que es indispensable el adecuado manejo y diagnóstico con este tipo de pruebas”. (Castro et cold., 2005., p.15)

“La vacunación antibrucélica en el bovino ha sido una práctica de los ganaderos como alternativa de reducir el efecto antiabortivo y también una herramienta utilizada en el control epidemiológico, sin embargo es importante mencionar que “se prohíbe la vacunación contra brucelosis bovina de hembras mayores de 8 meses de edad con vacuna Cepa 19, además de hembras mayores de 8 meses de edad, la vacunación se realizará, previa autorización del ICA, exclusivamente con la cepa RB51, así mismo se prohíbe la vacunación de machos a cualquier edad con la Cepa19 o con la Cepa RB51”. (ICA, 2006)

Para lograr un diagnóstico inicial correcto se recomienda efectuar pruebas que evidencien la presencia de anticuerpos totales, tanto completos como incompletos. La prueba de Coombs puede ser reemplazada por los métodos de IFI y ELISA que cumplen con este requisito y permiten discriminar además los isotipos de inmunoglobulinas involucrados.

➤ **Plan de manejo adecuado de diagnóstico y control en la prevención de la enfermedad de Brucelosis bovina.**

Las utilidades integradas de planes de manejo adecuado de diagnóstico sirven para guiar, manejar, mantener, proteger y diseñar controles de prevención de patologías. De esta manera la prevención de la brucelosis Bovina se basa en planes de manejo en la administración de vacunas atenuadas vivas, donde se utilizan cepas bacterianas atenuadas y componentes propios de la Brucella”. (Estein, 2006., p.6)

La importancia de las vacunas como planes de manejo asegura la inducción de una respuesta inmunitaria completa contra un gran número de componentes y una sobre estimulación del sistema inmune gracias a la replicación de la bacteria. Las cepas que actualmente se emplean

en la mayoría de los países para el control de la brucelosis bovina y de pequeños rumiantes son: B. abortus S19 (B. abortus cepa 19) y B. melitensis Rev.1, respectivamente. Estas cepas son capaces de establecer una infección limitada imitando el proceso de infección natural por cepas silvestres y confiriendo de esta manera protección contra el aborto y la infección. Sin embargo, el empleo de estas vacunas puede ocasionar abortos en las hembras gestantes e infertilidad por infección genital.

Por otro lado, estas vacunas (también denominadas aglutinógenas) inducen anticuerpos que interfieren con las pruebas serológicas de rutina, impidiendo la diferenciación entre animales infectados y vacunados”. (Estein, 2006., p.4)

Teniendo en cuenta el accionar de las vacunas, se debe tener un control y prevención de la cepa 19 de Brucella abortus, como es la inmunización con la cual se puede observar anticuerpos específicos contra este antígeno del tipo IgG1, IgG2b e IgM, el defecto genético que permite la atenuación de esta cepa aún no ha sido definido, pero hace que pierda un mecanismo de virulencia esencial. “Es la vacuna de referencia con la que se compara el resto de las vacunas y una de las más utilizadas. Se utiliza como una vacuna viva las edades recomendadas de vacunación son entre 3 y 6 meses como una dosis única subcutánea de $5-8 \times 10^{10}$ microorganismos viables. Administrar al ganado adulto una dosis reducida de la vacuna puede inducir el desarrollo de títulos duraderos de anticuerpos, abortar y excretar la cepa vacunal por la leche. Alternativamente, se puede administrar a ganado de cualquier edad en dos dosis de $5-10 \times 10^9$ microorganismos viables por vía conjuntival; esto produce protección sin una respuesta duradera de anticuerpos y reduce los riesgos de aborto y de la excreción en la leche”. (Animal OMdS., 2012., p.670).

Para el manejo de esta vacuna S19 se “debe preparar a partir de inóculos derivados del USDA – United States Department of Agriculture y cada lote ha de probarse para pureza (ausencia de microorganismos extraños), viabilidad (bacterias vivas por dosis) y homogeneidad (determinación de la fase de disociación). La virulencia residual y la inmunogenicidad de lotes de inóculo para la producción de vacuna S19 deben comprobarse regularmente en ratones”. (Estein, 2006., p.4)

Igualmente, “Se considera que la vacunación de los terneros con una dosis completa de vacuna S19 confiere inmunidad duradera, y no se recomiendan dosis posteriores. Sin embargo, no existe evidencia probada de esto y en áreas endémicas puede ser aconsejable la revacunación”. (Estein, 2006., p.4)

En este sentido, un plan de manejo muy adecuado, “es examinar trimestralmente la leche entregada por cada uno de sus proveedores, y con ello se determina su condición frente a brucelosis. Este procedimiento ha permitido dar prioridad al saneamiento de las explotaciones lecheras desde el comienzo del programa. Otro aspecto en relación a predios lecheros es que prácticamente lo que está detectando la prueba del Anillo en Leche en la actualidad, luego de 10 años de aplicación, corresponde a predios que están en etapa de saneamiento, y la detección de nuevos predios infectados es bajísima, cual indica que el problema de brucelosis en lecherías está acotado, quedando poca infección en este estrato”. (SAG, 2019)

En concordancia con lo anterior, la 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), permite que se realicen continuamente sistemas de vigilancia por los dueños de los hatos involucrando al gobierno estatal, como es el caso de la aplicación de métodos de vacunación.

9.

10. 6. Metodología.

La metodología que se describe a continuación permitió desarrollar los objetivos de la presente investigación, a través de una revisión descriptiva de estudios y conceptos, esta monografía se fundamentó en el 100% de fuentes secundarias como: consultas a través de internet de artículos científicos indexados, estudios, investigaciones, folletos, enciclopedias, libros de primer nivel, registros y estadísticas referente al tema a relatar.

La matriz bibliográfica permitió, estudiar los principales autores que expresaron la importancia de los contextos científicos, como son: Recopilación de información, la cual permitió conocer y analizar el objetivo principal de esta monografía, a través de fuentes secundarias en consultas de internet, libros de primer nivel y artículos científicos indexados. Clasificación de la información; que sirvió para categorizar o estructurar datos en orden de importancia o relevancia. Generalmente la clasificación se realizó según la criticidad de los documentos o según su importancia de la información, y Análisis acerca de los tres temas clasificados y desarrollo de los objetivos, los cuales son imprescindibles, puesto que indicaron lo que se esperaba de este trabajo monográfico y definir la forma en que se alcanzará el resultado.

a. **6.1. Tipo de Estudio.**

Se realizó un estudio transversal descriptivo, para determinar la eficiencia de ELISA- C indirecto OPS en relación con el método diagnóstico Milk Ring Test (MRT) previamente establecidos para la detección de *Brucella* sp. Revisión bibliográfica. Monografía de compilación.

b. 6.2. Población de estudio

Se realizó estudios e investigaciones a nivel nacional e internacional, sobre la 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).

c.

d. 6.3. Muestra

El estado de arte concibió con la argumentación de los principales autores a nivel internacional y nacional, que expresaron la importancia de los estudios dirigidos hacia la 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).

e. 6.4. Fases metodológicas aplicadas

Fase I. Recopilación de información: La cual permitió conocer y analizar el objetivo principal de la monografía a través de fuentes secundarias como: Consultas de internet en buscadores conocidos, libros, de primer nivel, artículos científicos en revistas indexadas, estudios e investigaciones, folletos, enciclopedias y estadísticas referente al tema de Determinar las condiciones y tratamientos adecuados para una eficaz reproducción equina de mayor calidad.

Fase II. Clasificación de la Información: Donde se categorizó y estructuró los datos de orden de importancia como: 1. Identificar las particularidades de la Brucelosis bovina para determinar la prevalencia y las características de la enfermedad. 2. Analizar los métodos de detección como la prueba del Milk Ring Test (MRT) y la prueba de Elisa Competitiva (Elisa-C),

para conocer en diferentes estudios a nivel internacional y nacional que se ha avanzado con el análisis de Brucelosis bovina. 3. Establecer un plan de manejo adecuado de diagnóstico y control en la prevención de la enfermedad de Brucelosis bovina.

Fase III. Análisis de los tres temas clasificados en el desarrollo de los objetivos. Se desarrolló cada objetivo para determinar el alcance y el resultado de la información.

f. 6.5. Criterios Metodológicos.

(a) 6.5.1. Criterios de Inclusión

- Estudios e investigaciones de autores de primer nivel sobre la descripción de los parámetros hacia la 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).
- Artículos publicados en Latino América y Sur América y Colombia en revistas indexadas entre los años del 2000 al 2019.
- Idioma español, en bases de datos de acceso libre.

(b) 6.5.2. Criterios de exclusión

- Información incompleta en boletines, folletos sin sustentación de referencia bibliográfica.
- Páginas de blog y Wikipedia sin autores de primer nivel.
- Artículos que requieran pago por acceso.
- Estudios que no hicieron referencia al tema principal de estudio sobre hacia la 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).

La Brucelosis “corresponde a una patología infectocontagiosa conocida como aborto infeccioso que afecta a los bovinos en todo rango de edad”, (Martínez, 2013., p.6), aunque algunos estudios mencionan que “la brucelosis es una zoonosis, y que se transmite en forma natural de los animales vertebrados al hombre, atentando contra la salud de los ganaderos y del personal de campo, así como de los consumidores de leche de animales enfermos”. (Ruiz, 1995., p.11), mediante los métodos de detección como la prueba del Milk Ring Test (MRT) y la prueba de Elisa Competitiva (Elisa-C), “se puede dar un diagnóstico oportuno, la prueba de Elisa es capaz de medir anticuerpos clase IgG1, aunque éstos se encuentren en muy bajos niveles en el suero y no sean perceptibles por otras pruebas.” (Vásquez et cold, 1999., p.5), referente a la prueba Milk Ring Test (MRT) o La prueba de Anillo en Leche (PAL) también conocida como “Milk Ring Test” (MTR) detecta anticuerpos IgG e IgM atados a los glóbulos de grasa en la leche, en esta prueba se emplea un antígeno preparado a partir de cultivos puros de B”. (Acosta,2016, p.9)

“En cuanto a sintomatología la brucelosis bovina se manifiesta con fiebre, dolor en las articulaciones y fatiga, por lo general, esta infección puede tratarse con antibióticos, sin embargo, a menudo se asemeja a otras afecciones tales como la gripe” (López, 1991., p.19), en Guatemala; se determinó la presencia de anticuerpos contra *Brucella abortus* en leche de vaca utilizada en procesadoras, analizadas mediante la prueba de anillo en leche (PAL). En 4 (36%) de las 11 procesadoras estudiadas se encontraron anticuerpos contra B. abortus. De las 57 muestras (15.79%), 9 resultaron positivas a la presencia de anticuerpos contra B. abortus, los anticuerpos postvacunales no influyeron en el resultado de la prueba ya que el 100% de

los hatos muestreados no son vacunados contra la brucelosis bovina”. (Barrios, 2016., p.6), en Ecuador se determinó la prevalencia de Brucelosis bovina mediante análisis de laboratorio Elisa – C, en vacas productoras, mostrando los factores de riesgo, y se elaboró un plan sanitario para el control y erradicación de la enfermedad” (Neppas, 2013., p.9), en este entorno también se pudo evidenciar en Uruguay en un estudio “Evaluación de Elisa indirecta y polarización de Fluorescencia como alternativa de Screening en caso de infección por *B. abortus* las hembras adultas en gestación desarrollan una placentitis que por lo general conduce al aborto entre el quinto y el noveno mes de gestación”.. (Rosas, 2011., p.10).

En estudios realizados en Venezuela, se evaluó la capacidad operativa de las pruebas diagnósticas: anillo de la leche (PAL), inmuno ensayo enzimático indirecto (ELISA-i), rosa de bengala (RB) y ELISA competitivo (ELISA-c), utilizadas tras 5 años (2003-2007) de vigilancia epidemiológica para brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en el municipio Machiques de Perijá, partiendo de la revalorización de un conjunto de muestras de leche y suero probados positivos y negativos, se mantuvo excelente capacidad diagnóstica”. (Sánchez, 2009., p.1), en Colombia, en un estudio realizado, analiza el caso de dos métodos de laboratorio, cuyos resultados se expresaron en forma de variable cualitativa dicotómica (positivo/negativo), Se aplicó la metodología estándar para prueba del anillo en leche (PAL) y ELISA indirecto (ELISA-i) los resultados de concordancia obtenidos fueron altos en todos los estratos, por lo que se concluye que tanto PAL como ELISA-i se podrían usar para diagnosticar la brucelosis bovina”. (Moreira, 2017., p.33)

“Se debe realizar la Prueba de Anillo en leche, al igual que otros antígenos que permiten diagnosticar la brucelosis en bovinos, ovinos y caprinos y con esto optimizar su producción y prevenir enfermedades en la población”. (Castro et col., 2005., p.15).

“La importancia de las vacunas como planes de manejo aseguran la inducción de una respuesta inmunitaria completa contra un gran número de componentes y una sobre estimulación del sistema inmune gracias a la replicación de la bacteria, estas vacunas (también denominadas aglutinógenas) inducen anticuerpos que interfieren con las pruebas serológicas de rutina, impidiendo la diferenciación entre animales infectados y vacunados”. (Estein, 2006., p.4), se recomienda Un plan de manejo, “es examinar trimestralmente la leche entregada por cada uno de sus proveedores, y con ello se determina su condición frente a brucelosis” (SAG, 2019).

Según la bibliografía seleccionada para esta investigación se da cumplimiento con los objetivos y la pregunta problema planteados en la presente monografía se establecen las siguientes conclusiones:

Los métodos de detención como las prueba de Milk Ring Test (MRT) y la prueba de ELISA – C, Si son eficientes para la detección de la Brucella abortus, porque de acuerdo a los estudios indexados, sobre estos métodos de detención son muy eficientes, no hay un porcentaje como tal que los relacione con el resto de otros test, “estos métodos tienen un grado de fiabilidad del 90,53%, debido a que estas pruebas utilizan tecnología más específica al detectar anticuerpos contra el polisacárido de cadena O de la cadena LPS; Además los métodos permiten detectar anticuerpos muy tempranos de Brucella abortus; Los estudios muestran que estas pruebas son de una sensibilidad muy alta”. (López et cold., 2016., p.3)

Referente a las particularidades de la Brucelosis bovina para determinar la prevalencia y las características de la enfermedad se puede concluir que: La evolución subclínica y clínica de la Bacteria de Brucelosis Bovina es un proceso patológico de acontecimientos biológicos y de contaminación es una acción secuencial de causas componentes y etiologías que se van desarrollando en la enfermedad, donde hay un desenlace, una curación a través del tratamiento adecuado, de no ser así se pasa a la cronicidad o la muerte.

Referente a los métodos de detección como la prueba del Milk Ring Test (MRT) y la prueba de Elisa Competitiva (Elisa-C), se puede concluir que; según los diferentes

estudios indexados “La aplicación de la prueba de Anillo en Leche tiene la ventaja sobre las demás pruebas serológicas de que las muestras no son tomadas de una manera Invasiva por lo que no se estresa al animal y se emplea frecuentemente en zonas libres y de control de la enfermedad, ayuda a descubrir hatos infectados y es usada ampliamente en vigilancia epidemiológica porque permite controlar periódicamente a la brucelosis en los establos, además contribuye a descubrir si la infección se ha reinstalado en la unidad de producción lechera. La Prueba PAL es útil en ganado bovino, resulta ineficaz en los pequeños rumiantes según la OIE”. (Acosta., 2016, p.9).

De igual manera se concluye que: “la prueba de ELISA – C, tiene un grado de fiabilidad del 90,53%, debido a que esta prueba es semi cuantitativa y utiliza tecnología más específica al detectar anticuerpos contra el polisacárido de cadena O de la cadena LPS, es eficaz al momento de realizar las pruebas y porque detecta anticuerpos contra *Brucella sp*, con un 100% de confiabilidad, y un 99,9% en sensibilidad en la técnica FPA”. (López et cold, 2016., p.3)

Referente al plan de manejo adecuado de diagnóstico y control en la prevención de la enfermedad de Brucelosis bovina se puede concluir que: Las vacunas como planes de manejo aseguran la inducción de una respuesta inmunitaria completa contra un gran número de componentes y una sobre estimulación del sistema inmune gracias a la replicación de la bacteria *Bacillo abortus*; “Se considera que la vacunación de los terneros con una dosis completa de vacuna S19 confiere inmunidad duradera, y no se recomiendan dosis posteriores. Sin embargo, no existe evidencia probada de esto y en áreas endémicas puede ser aconsejable la revacunación”. (Estein, 2006., p.4)

Los estudios referenciados en esta investigación determinaron resultados de concordancia alta entre los métodos de detección Milk Ring Test (MRT) o también llamado Prueba del Anillo en Leche (PAL) y el método de Elisa-C, en lo referente “detectan anticuerpos IgG e IgM (que son inmunoglobulinas o anticuerpos en el suero sanguíneo), atados a los glóbulos de grasa en la leche y a un preparado de cultivos puros de abortus, que forman un anillo en la parte superior de la columna de leche y en las lecturas positivas lo que permite observar aglutinación en el fondo del tubo y ocasionalmente copos de aglutinación dispersos en la columna de leche, obteniendo de esta manera mejores resultados en la vigilancia de la enfermedad”. (Acosta, et cold, 2016., p.12).

13.

9. Recomendaciones

14.

De acuerdo a los estudios, artículos indexados y a los objetivos trazados en el presente trabajo de grado en la línea de monografía, se establecen las siguientes recomendaciones:

1. La Brucella Abortus RB 51, es un producto Biológico (vacuna), que contiene una dosis reconstituida farmacéuticamente como es el Liofilizado (ultra congelación) de 10 x 10⁹ UFC para Bovinos. “La Brucella Abortus RB 51 ha demostrado ser una vacuna efectiva y probablemente más efectiva que la cepa 19 bajo condiciones de campo, se debe usar solo en las hembras bovinas específicamente en Becerras de 3 a 8 meses de edad (primo vacunadas); De esta manera les ayuda en la prevención de infecciones y abortos causados por Brucella abortus; No se debe vacunar en hembras preñadas y No vacunar en machos bovinos, es solo para el uso de hembras bovinas de 3 a 8 meses de edad, su formulación es exclusivo de los médicos veterinarios. Se debe utilizar una vez la vacuna sea rehidratada en los siguientes 60 minutos y almacenar entre 2 y 8 °C, algo muy importante es No permitir su congelación, para facilitar su correcta aplicación, la RB-51 es sensible y su dosis es de 2 ml rehidratándola añadiéndole solamente el diluyente específico para RB-51, proporcionando con este una vacuna liofilizada la cual debe estar en constante agitación durante su uso para asegurar la correcta homogeneización de los antígenos y posteriormente inyectarla por vía subcutánea. Referente a la revacunación, las hembras bovinas, no preñadas, deben vacunarse con previa autorización del funcionario a cargo de

la salud animal y se debe almacenar refrigerado entre 2 y 8°C, tiene una vida útil de 36 meses. Hay que tener precauciones con la vacuna RB-51, por su sensibilidad a las tetraciclinas, rifampicina y a la penicilina, puede causar reacciones anafilácticas, por lo cual se debe aplicar adrenalina o equivalente”. (MSD Salud Animal Colombia S.A.S, 2012)

2. En el campo de la medicina veterinaria, es importante tener en cuenta los métodos de detección como la prueba del Milk Ring Test (MRT) y la prueba de Elisa Competitiva (Elisa-C) para los hatos ganaderos para tener una prevención y control en caso de presentarse esta patología en los bovinos.
3. Se sugiere realizar exámenes diagnósticos para conocer el estado sanitario de los animales, así como también el aislamiento de los animales positivos, para evitar el riesgo de infectar a los sanos; por el ello se recomienda ingresar al predio solo animal previamente examinados y con resultados negativos a brucelosis.
4. Es importante notificar al ICA, los casos de aborto o sospecha de brucelosis, para tomar las medidas al respecto.
5. Se recomienda establecer un plan de bioseguridad basado en acciones de limpieza y desinfección y control de plagas, para este efecto, todas las plantas lecheras deben examinar trimestralmente la leche entregada por cada uno de sus proveedores, y con ello se determina su condición frente a brucelosis.

6. Se sugiere a la Universidad Antonio Nariño UAN, facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, programa Medicina Veterinaria, continuar investigando en temas *de Brucellosis bovina* para profundizar este conocimiento y tener elementos de base para un diagnóstico y control en esta patología presentada en los bovinos.

7. Implementar los métodos diagnósticos Milk Ring Test (MRT) y Elisa-C, porque tienen la ventaja sobre las pruebas serológicas (tomadas de una manera invasiva), que estresan al animal con la consecuente pérdida de producción de leche u otro efecto indeseable como producto del manejo del momento de la toma de la muestra.

- Acosta, A et cold, (2016). *Prueba del anillo en leche para la vigilancia epidemiológica de Brucelosis Bovina*. Perú.
- Aparicio, Abraham et cold (2005). *Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con Brucelosis y revacunado con dosis reducida de Brucella abortus cepa 19*. México.
- Acha, p.; szyfres, B. (1992) *Zoonosis y enfermedades trasmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud (OPS)*. 2aEd., Publicación Científica N° 503. pp. 14-20 Venezuela.
- Animal. OMdS. (2012). *Código sanitario para animales terrestres 2008*. Brucellosis Bovina. In: OIE, editor. *Animales Terrestres*. p. 637.
- Baud D, & Greub G. (2011). *Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes. Clínica Microbiology and Infection*. 2011;17(9):1312-22.
- Barrios, (2016). *Determinación de la presencia de anticuerpos contra Brucella abortus en leche de vaca utilizada en procesadoras, del municipio de Asunción Mita, Jutiapa*. USAC. Repositorio del Sistema Bibliotecario. Universidad de San Carlos. Guatemala.
- Boukary, A., Saegerman, C., Abatih, E., Fretin, D., Bada, R., De Deken, R., Thys, E. (2013). *Seroprevalence and potential risk factors for Brucella Spp. infection in traditional cattle, sheep and goats reared in urban, periurban and rural areas of Niger*. *PLoS ONE*, 8(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083175>
- Castro, H. Raquel González, M Prat (2005). *Estudios sobre Brucelosis bovina: una revisión práctica*. Buenos aires.

- Castro, H.; González, S.; Pratt, M. (2005). *Brucelosis: una revisión práctica*. Acta Bioquim Clin Latinoam. 39(2):203-216.
- Cardenas, L & Melo, O Casal, J (2017). *Evolución de los bovinos enfermos por brucelosis en Colombia*.
- Castro H, González, S. (2005). Prat M. *Brucelosis: Una revisión práctica*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana [Internet]. [203-16 pp.].
- De Figueiredo P, Ficht TA, Adams LG, Rice-Ficht A, Rossetti CA. (2015). *Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of Brucella-host interactions*. American Journal of Pathology. 85(6):1505-17.
- Estein S. (2006). *Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica)*. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET.
- Fondo Nacional del Ganado -FNG, (2014). *Salud animal › Sanidad animal › Programa de Prevención, Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina*
- Gillespie S, Hawkey P. (2006). *Principles and practice of clinical bacteriology*.: John Wiley & Sons.
- Gil, A.D., Piaggio, J.M., (2013) *Brucelosis Bovina: Evaluación de las pruebas diagnósticas para muestras compuestas de leche y modelos epidemiológicos de difusión de la enfermedad*. INIA Serie FPTA N°. p 36, 69
- Garcell, H., García, E., Pueyo, P., Martín, I., Arias, A., & Alfonso, R. (2016). Outbreaks of *brucellosis related to the consumption of unpasteurized camel milk*. *Journal of Infection and Public Health*, 9(4), 523–527. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.12.006>.

- Martínez, P. (2013). *Brucelosis animal y humana: situación epidemiológica en Chile, 2001-2010*. *Revista chilena de infectología*, 30(6), 653-659. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0716-10182013000600013&script=sci_arttext&tlng=e.
- Moreira, Zúñiga (2017). *Concordancia entre la prueba del anillo en leche y ELISA indirecto en el diagnóstico de brucelosis bovina*. Colombia. p. (33):93-101.
- Morales & Morillo (2020). *Evaluación de la técnica de ELISA indirecto OPS para Brucella sp. en muestras de leche y sangre de bovinos y caprinos mediante análisis comparativo con tres métodos diagnósticos*. Quito
- MSD Salud Animal Colombia S.A.S. (2012). Profesional Biological La Brucella Abortus RB -51 Company. ficha técnica bovinos. Estados Unidos
- Neppas, M (2013). *Prevalencia de Brucelosis Bovina mediante la prueba de anillo en leche (Ring tés) y Rosa Bengala en la Asociación Agropecuaria el Ordeño de la Chimba-Cayambe*. Ecuador
- Nicola, A & Franco, C (2019). *Brucelosis. Manual de diagnóstico serológico B. abortus*, Senasa
FAO
- López, Máyela, M. Fernanda Rodríguez Alexander Romero (2016). *Elisa Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Prueba Inmunoabsorbente Ligado A Enzimas*.
- Lucero, N.E.; Escobar, G.I.; Ayala, S.M.; Hasan, D. 2008. *Manual de Procedimientos: Técnicas para el Diagnóstico de Brucelosis Humana*. Whoglobal Salm Surv. p.78.
- L.M.S. Paulin, W.A. Andrade-Pacheco, V. Castro, I.S.P. Federsoni, (2009). *Evaluación entre cuatro técnicas serológicas para el diagnóstico de infecciones causadas por Brucella abortus en bovinos*. Brasil

- Sánchez, A, & cols (2009). *Monitoreo Epidemiológico para Brucella Abortus en fincas doble propósito del municipio Machiques de Perijá, Venezuela parte ii: validez y seguridad de las pruebas anillo de la leche y Rosa de Bengala*. Venezuela.
- Servicio Agrícola y ganadero, SAG, (2019). *Brucelosis Bovina BB. Control y erradicación de enfermedades*. Colombia
- Ortiz E, Silva E, (2007). Izquierdo M. *Normalización y evaluación del inmuno ensayo ABICAP-BRU para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina*. REDVET. VIII (4),
- Olascoaga Casas, R. (2008) *Brucelosis bovina*. *Veterinaria (Montevideo)*, 43 (170):11-23.
- Paulin, L., Andrade, W., Castro, V., & Federsoni, I. (2009). Evaluación entre cuatro técnicas serológicas para el diagnóstico de infecciones causadas por *Brucella abortus* en bovinos. *Archivos de Instituto Biológico*, 76(1), 9–15.
- Ruiz, L. Brucelosis (1995). *Enfermedades Zoonóticas en Venezuela*. *Boletín Unidad de Epidemiología, Barquisimeto*. Venezuela. 8-20 pp.
- Rosas, D (2011). *Evaluación de Elisa indirecta y polarización de Fluorescencia como alternativa de "Screening" para Brucelosis Bovina*. Uruguay- Montevideo.
- Romero R. (2007). *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*.
- Román, F., & Luna, J. (2017). *Revisión actualizada de la epidemiología de Brucelosis (Brucella abortus, Brucella mellitensis, Brucella suis, Brucella Canis, en el Ecuador y el mundo*. Centro de Biotecnología. p. 6, 82–93.
- Radostits, O., Gay, C., Blood D., Hinchliff K. (2002) *Enfermedades causadas por bacterias*. *Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades de ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. 9a ed. Madrid, McGraw-Hill, p 923-1053.

Resolución, N ro.OOO550 (2006). *Por la cual se establecen medidas sanitarias para el Control de la Brucelosis en las especies bovina, bufalina, caprina y ovina en la República de Colombia*

Reyes J, Sánchez M, Lotero MA, Restrepo M, Palacio L. (2010). *Seroprevalencia incidencia de Brucella sp. en vacunadores del Programa para el Control de Brucelosis Bovina, en el departamento de Antioquia-Colombia. Rev. Colomb Cienc Pecu. p. 23:25-46.*

Universidad del Estado de Iowa. (2009). *El Centro de Seguridad Alimentaria y Salud Pública. Brucelosis Bovina: Brucella abortus, 6 p.*

Uzal A, Carrasco E, Nielsen K, Echaide S, Cabrera F. (1996). *An indirect ELISA using a monoclonal anti IgG1 enzyme conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Veterinary Microbiology. 1996; 52(1):175-80.*

Vega, Doris (2006). *Brucella abortus: Antecedentes y avances en aspectos de patogénesis, diagnóstico y control. Pontificia universidad javeriana - facultad de ciencias carrera de microbiología agrícola y veterinaria. Colombia*

Matriz de Referencias Bibliográfica por orden cronológico (10 Años)

AÑO	AUTOR	TITULO ESTUDIO	PROCEDENCIA DE ESTUDIO	
			Internacional	Nacional
2020	Morales & Morillo	<i>Evaluación de la técnica de ELISA indirecto OPS para Brucella sp. en muestras de leche y sangre de bovinos y caprinos mediante análisis comparativo con tres métodos diagnósticos. Quito – Ecuador.</i>	X	
2019	Servicio Agrícola y ganadero, SAG	<i>Brucelosis Bovina BB. Control y erradicación de enfermedades. Colombia</i>	X	
2018	Cárdenas Z	<i>La Brucelosis bovina y sus factores de riesgo. Evaluación a nivel mundial y en Colombia. Recuperado: zlcc1de1.pdf (tdx.cat)</i>	X	
2017	Moreira Z	<i>1. Concordancia entre la prueba del anillo en leche y ELISA indirecto en el diagnóstico de brucelosis bovina. Bogotá. https://doi.org/10.19052/mv.4057</i>		X
2017	Cardenas, L & Melo	<i>Evolución de los bovinos enfermos por brucelosis en Colombia.</i>		X

2016	Acosta A.	20. <i>Prueba del anillo en leche para la vigilancia epidemiológica de Brucelosis Bovina. Colombia.</i>		X
2016	Barrios L	21. <i>Determinación de la presencia de anticuerpos contra Brucella abortus en leche de vaca utilizada en procesadoras, del municipio de Asunción Mita, Jutiapa. USAC. Repositorio del Sistema Bibliotecario. Universidad de San Carlos. Guatemala.</i>	X	
2016	Garcell H cols	<i>Outbreaks of brucellosis related to the consumption of unpasteurized camel milk. Journal of Infection and Public Health.</i>	X	
2016	López, Máyela,	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Prueba Inmunoadsorbente Ligado A Enzimas.</i>	X	
2015	De Figueiredo	<i>Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of Brucella-host interactions. American Journal of Pathology.</i>	X	
2013	Neppas, M	<i>Prevalencia de Brucelosis Bovina mediante la prueba de anillo en leche (Ring tes) y Rosa Bengala en la Asociación Agropecuaria el Ordeño de la Chimba-Cayambe. 2012. Quito – Ecuador. Recuperado en UPS-YT00155.pdf</i>	X	
2013	Boukary, A	<i>Seroprevalence and potential risk factors for Brucella Spp. infection in traditional cattle, sheep and goats reared in urban, periurban and rural areas of Niger. PLoS ONE,</i>	X	
2013	Martínez, P	<i>Brucelosis animal y humana: situación epidemiológica en Chile, 2001-2010. Revistachilena de infectología.</i>	X	

201 2	Animal OMdS	<i>Código sanitario para animales terrestres 2008. Brucelosis Bovina. In: OIE, editor. Animales</i>		X
201 1	Rosas, D	<i>Evaluación de Elisa indirecta y polarización de Fluorescencia como alternativa de "Screening" para Brucelosis Bovina. Uruguay – Montevideo. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. Recuperado de: FV-29315.pdf</i>	X	
200 6	Vega, D	<i>Brucella abortus: antecedentes y avances en aspectos de patogénesis, diagnóstico y control. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Bogotá. tesis238.pdf (javeriana.edu.co)</i>		X
200 9	Sánchez A y cols	<i>Monitoreo Epidemiológico para Brucella Abortus en fincas doble propósito del municipio Machiques de Perijá, Venezuela. Parte ii: validez y seguridad de las pruebas anillo de la leche y Rosa de Bengala. Recuperado de: Redalyc. Monitoreo epidemiológico para Brucella abortus en fincas doble propósito del municipio Machiques de Perijá, Venezuela. Parte ii: validez y seguridad de las pruebas anillo de la leche y Rosa de Bengala.</i>	X	
200 5	Aparicio P	<i>Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud (OPS). México.</i>	X	
200 2	Radostits, O., Gay,	<i>Enfermedades causadas por bacterias. Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades de ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9</i>		

