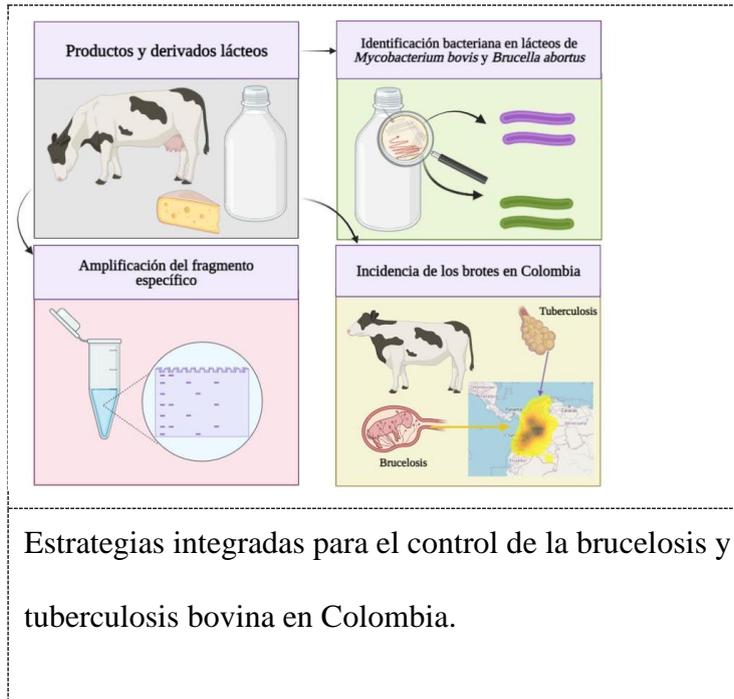


“Caracterización molecular de *Brucella abortus* y *Mycobacterium bovis* en sistemas de producción ganaderos”
"Molecular characterization of *Brucella abortus* and *Mycobacterium bovis* in livestock production systems"

Graphical Abstract (GA)



“Caracterización molecular de *Brucella abortus* y *Mycobacterium bovis* en sistemas de producción ganaderos”

"Molecular characterization of *Brucella abortus* and *Mycobacterium bovis* in livestock production systems"

*Wendy Nathaly Rueda Uscategui**

** Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

*Dirigido por: Nelson Enrique
Arenas Lic, MSc, Ph.D.*

Resumen

La brucelosis y la tuberculosis bovina (TBB) son enfermedades infecciosas que impactan significativamente la producción ganadera colombiana. La anterior situación persiste porque las estrategias de control son ineficaces con fallas en la detección temprana de casos y adecuada vigilancia de dichas enfermedades. El objetivo de este trabajo es presentar una estrategia integral para la detección temprana y mapeo de casos de brucelosis y TBB. Se estandarizó un protocolo de cultivo bacteriano, extracción de ADN genómico y amplificación de genes específicos de *Brucella abortus* y *Mycobacterium bovis* para su detección específica en muestras de leche cruda y queso artesanal. Se evaluaron 5 muestras de leche cruda y 5 muestras de queso. Se obtuvo ADN genómico a una concentración promedio de 64,3 ng/μL y pureza apropiada (relación A260/A280 promedio de 1,6). En 4 muestras de queso se amplificaron por PCR los genes ribosomales 16S y 1 muestra de queso fue positiva para *Mycobacterium bovis*. Se diseñó una herramienta web interactiva con los casos de brucelosis y TBB entre 2004-2020 reportados al Instituto Colombiano Agropecuario que presenta la distribución geográfica de focos en la escala de tiempo a nivel nacional. La identificación de *M. bovis* en derivados lácteos sugiere que el patógeno podría estar presente en derivados lácteos que se expenden a nivel local.

Palabras clave: Brucelosis, tuberculosis bovina, ganadería, enfermedades infecciosas, diagnóstico, zoonosis.

“Caracterización molecular de *Brucella abortus* y *Mycobacterium bovis* en sistemas de producción ganaderos”

"Molecular characterization of *Brucella abortus* and *Mycobacterium bovis* in livestock production systems"

Abstract

Brucellosis and bovine tuberculosis (TBB) are infectious diseases that significantly impact Colombian livestock production. The previous situation persists because control strategies are ineffective with failures in the early detection of cases and adequate surveillance of these diseases. The objective of this work is to present a comprehensive strategy for the early detection and mapping of brucellosis and TBB cases. A protocol for bacterial culture, genomic DNA extraction and amplification of specific *Brucella abortus* and *Mycobacterium bovis* genes was standardized for their specific detection in raw milk and artisan cheese samples. 5 raw milk samples and 5 cheese samples were evaluated. Genomic DNA was obtained at an average concentration of 64.3 ng/μL and appropriate purity (average A260/A280 ratio of 1.6). In 4 cheese samples the 16S ribosomal genes were amplified by PCR and 1 cheese sample was positive for *Mycobacterium bovis*. An interactive web tool was designed with the cases of brucellosis and TBB between 2004-2020 reported to the Instituto Colombiano Agropecuario that presents the geographical distribution of foci on the time scale at the national level. The identification of *M. bovis* in dairy products suggests that the pathogen could be present in dairy products that are sold locally.

Keywords: Brucellosis, bovine tuberculosis, livestock, infectious diseases, diagnosis, zoonoses.

1. Introducción

Las enfermedades infecciosas como la brucelosis y la tuberculosis bovina (TBB) representan uno de los problemas sanitarios más prevalentes en el sector ganadero y constituyen enfermedades que no han sido erradicadas de Colombia (Agudelo-Suárez, 2012; Arenas et al., 2017). Estas enfermedades son de control oficial por las autoridades de sanidad animal y por ende constituyen un gran obstáculo para la producción pecuaria del país. Incluso en términos de salud pública y salud ocupacional, debido a que representan una amenaza para los consumidores de productos lácteos derivados de animales enfermos y para el personal asociado al campo y asistencial respectivamente (Leal-Bohórquez et al., 2016; Bermúdez et al., 2017). Los animales infectados deben ser sacrificados, lo que genera importantes pérdidas económicas en el sector ganadero que podrían variar según la edad, el peso y la raza del animal infectado (Arenas & Moreno, 2016). La problemática se asocia con la detección temprana del agente causal para asegurar un control eficaz de cualquier brote. En la brucelosis, el diagnóstico no siempre es posible por métodos microbiológicos como el cultivo y debe confirmarse por métodos serológicos en campo para identificar la sospecha de la enfermedad a nivel clínico y se requieren métodos confirmatorios basados en inmunoensayos en leche (Rivera et al., 2003; Moreira-Zúñiga, 2016). También, se requieren pruebas de ELISA para obtener la confirmación, ya que en la etapa grave de la infección ocurre una alta respuesta de anticuerpos clásicos como el IgM e IgG durante el proceso infeccioso. Sin embargo, los anticuerpos IgM no se vuelven a aumentar significativamente ante una nueva recaída o reinfección de la enfermedad, pues se puede detectar la IgM disminuyendo durante 8 a 10 meses en los casos que progresan hacia la recuperación (Lucero et al., 2008). La preocupación sobre el uso de las pruebas de ELISA se deriva de la insuficiente madurez que existe para vincular los resultados con el proceso clínico en animales. Por otro lado, para la TBB se utiliza la prueba de tuberculina que se basa en la respuesta inmunológica a micobacterias, pero realmente la prueba

no determina si la infección es activa o si se considera un criterio de diagnóstico definitivo, pues en algunos casos no se detectan ciertos animales (anérgicos) con hipersensibilidad a *Mycobacterium bovis* por infecciones diseminadas o por infecciones recientes. Aunque la prueba alcanza una alta especificidad, su sensibilidad oscila entre el 70 – 75% restringiendo su aplicación en las áreas endémicas (Holveck et al., 2007; Coad et al., 2008; Schiller et al., 2010; Torres, 2010; Müller et al., 2013). Conjuntamente, se presentan resultados falsos positivos, debido a que el extracto proteico induce reacciones cruzadas con micobacterias no tuberculosas (MNT) y algunos de los protocolos utilizados requieren equipos y personal especializado, son laboriosos y usualmente demandan un tiempo prolongado. También, se utiliza la prueba de detección de interferón-gamma, una técnica *in vitro* que busca aumentar la sensibilidad y optimizar la detección de animales infectados (Álvarez et al., 2008; Bezos et al., 2011). En general, esta técnica ha evidenciado una mejor sensibilidad que la prueba de la tuberculina, no obstante, se observa una especificidad limitada.

Otros aspectos que afectan la salud animal son el tiempo de detección de la enfermedad, la cronicidad del proceso infeccioso, la calidad de los sistemas de salud veterinaria, el acceso a los análisis o test diagnósticos y la relación costo-beneficio del diagnóstico temprano (De Kantor & Ritacco, 2006; Dafale et al., 2020). La carencia o disponibilidad de métodos más sensibles y específicos limitan el control de dichas enfermedades infecciosas, por lo tanto, es necesario desarrollar métodos precisos, de mayor especificidad y sensibilidad para diagnosticar la presencia de patógenos en cualquier etapa de la infección y así prevenir su diseminación en las producciones ganaderas.

La TBB es una zoonosis causada por bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium*. En bovinos, la TBB es originada por la especie *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), la cual es una micobacteria de la que se han descrito al menos 7 genotipos en 4 departamentos de Colombia, y en otros países en desarrollo (Jojoa-Jojoa et al., 2016; Leal-Bohórquez et al., 2016). Esta

enfermedad bacteriana está incluida en la lista de la Organización Internacional de Epizootias (OIE), siendo una enfermedad de reporte obligatorio (FAO, 2015). La TBB es una enfermedad infecto-contagiosa crónica, procedente de bacterias de morfología bacilar, donde la enfermedad progresa lentamente, tardando meses o incluso años en detectarse y favoreciendo así la diseminación del patógeno dentro del hospedero, que normalmente se caracteriza por la aparición de granulomas nodulares conocidos como tuberculomas (Zelanda et al., 2010; OIE - J. Crenn, 2011). Los signos clínicos de la TBB no son específicamente distintivos, ya que todos los tejidos del organismo pueden verse afectados, lo que desafía a los veterinarios y zootecnistas para hacer un diagnóstico definitivo basado únicamente en los signos clínicos. La TBB produce un deterioro progresivo de la salud productiva de los hatos infectados, y que concomitantemente tienen la capacidad de afectar la salud humana (de Waard, 2010). Es una de las enfermedades más trascendentales de la ganadería, su prevalencia restringe el desarrollo de la ganadería y sus productos asociados. Generalmente, la transmisión de TBB a los seres humanos se produce a través de la ingestión de leche cruda sin pasteurizar o quesos de leche cruda, o por la inhalación de aerosoles, una vía menos común. Además, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) la considera una zoonosis importante en América Latina, por lo que su control y prevención debe incluirse en los programas de salud y bienestar animal con alta prioridad. Debido a la falta de estudios o pruebas de detección en las áreas rurales de nuestro país, no se conoce el comportamiento de dicha zoonosis, por lo que es de suma importancia efectuar la detección temprana en bovinos. Un aspecto importante para destacar es el riesgo de contagio, dado que en las áreas rurales se acostumbra a consumir productos lácteos crudos y abastecer el mercado local.

La brucelosis es una zoonosis de distribución mundial y de principal interés en los países en desarrollo, causada por la bacteria gram-negativa *Brucella abortus*. Dicho agente etiológico es el más habitual en bovinos y es, por tanto, más frecuente en los últimos años, donde representa

un problema sanitario y económico con implicaciones en la salud pública y ocupacional en Colombia (Avila-Granados et al., 2019). La enfermedad se asocia con abortos en el ganado bovino durante el último trimestre de gestación, placenta retenida y produce terneros recién nacidos débiles e infertilidad animal (González T et al., 2007; Neta et al., 2010). Es una enfermedad infecto-contagiosa, con un impacto económico significativo en la producción, provocando una reducción en la producción de carne, revelando un impacto negativo de la enfermedad ante el programa de control y erradicación de la brucelosis en Colombia (Cárdenas et al., 2018). Aunque su vigilancia se limita a *B. abortus*, existen otras especies importantes de *Brucella* que causan infecciones en otros animales. Adicionalmente, la brucelosis representa una de las infecciones de laboratorio más fáciles de adquirir, y por ello se deben adoptar medidas estrictas de bioseguridad al manipular cultivos y muestras infectadas como los productos del aborto. Existen medidas eficaces de prevención de las enfermedades en el ganado mediante programas de vacunación con cepas atenuadas como C19 o RB51 (Moreno, 2014).

Las fallas en la identificación de los animales portadores de la bacteria responsable de esta zoonosis complican considerablemente las acciones de control, en particular las preventivas, ya que hasta la fecha no existe una perspectiva real de su prevalencia, ni de los posibles elementos vinculados a su propagación. Tampoco se han determinado los factores de riesgo ante nuevas infecciones por *B. abortus* en hatos certificados como libres de brucelosis (Cárdenas et al., 2019). Los animales aceptados como seropositivos en su mayoría tienen contacto estrecho con el hombre, lo que se ha sumado a las rutas de transmisión conocidas en otra dimensión como zoonosis emergente. Adicionalmente, la brucelosis no exhibe un cuadro clínico característico que permita el diagnóstico precoz del huésped, lo que favorece el curso y la cronicidad de la enfermedad, complicando alternativas terapéuticas y tratamientos definitivos inespecíficos.

Estudios previos estiman una alta prevalencia de brucelosis y TBB en el país, ya que existen dificultades respecto al control y la diseminación de dichas enfermedades, y la carencia de programas de tamizaje y pruebas diagnósticas adecuadas. En este contexto, la implementación de controles o herramientas web que determinen la prevalencia de la enfermedad en tiempo real beneficiaría a toda la ganadería convencional, siendo una estrategia clave para identificar geográficamente el origen de dicha propagación, logrando controlar las infecciones causadas por los patógenos y seguramente abriría la posibilidad de competir en el mercado internacional (Arenas et al., 2021).

La transmisión al ser humano ocurre por medio del contacto con membranas fetales infectadas, fetos abortados y secreciones uterinas que permiten la diseminación del patógeno (Valera et al., 2005), causando una enfermedad debilitante en humanos caracterizada por fiebre, fatiga, sudores con olor característico y malestar general, donde también pueden ocurrir complicaciones severas como artritis, endocarditis, insomnio, impotencia sexual y trastornos neurológicos (Rodríguez et al., 2014; Soares et al., 2015).

Cada año se diagnostican casos de brucelosis y TBB, y los registros indican que se producen aproximadamente medio millón de casos por enfermedad en todo el mundo (Acha & Szyfres, 2001; Müller et al., 2013). Aunque también se consideran enfermedades ocupacionales, en este ámbito se conoce muy poco, adicionalmente, se requieren programas educativos y de capacitación de alto impacto para abordar la enfermedad de manera integral, especialmente en grupos vulnerables como los pequeños, medianos productores y ganaderos tradicionales de las regiones de baja productividad. El diagnóstico y prevención temprana de la enfermedad debe ser el objetivo fundamental de las autoridades sanitarias y veterinarias con miras a su control y erradicación, y no un proceso sancionatorio para los ganaderos con animales enfermos (Reyes, 2010).

Nuestro país tiene una vocación altamente agropecuaria, por esta razón la producción ganadera

es de gran importancia, y dentro de esto se enmarca la producción láctea, cárnicos y sus derivados, productos muy importantes en la dieta alimentaria de la población. Este trabajo presenta resultados en dicho sector, porque se trata de enfermedades que impactan desfavorablemente la producción, y su presencia podría comprometer la seguridad sanitaria y también la seguridad alimentaria del país a mediano y largo plazo. La presente investigación busca optimizar la detección temprana de infecciones causadas por *B. abortus* y *M. bovis* asociadas a prácticas ganaderas en el país, implementando métodos moleculares para el diagnóstico de la brucelosis y la TBB que puedan ser utilizadas en campo. Adicionalmente, contribuir a la detección de focos de transmisión de estas enfermedades a través del uso de datos de georreferenciación para el control de las mismas. El conocimiento de dichas enfermedades permitiría focalizar esfuerzos diagnósticos con métodos moleculares altamente específicos y concentrar estrategias de control con pequeños y medianos productores ganaderos.

2. Materiales y Métodos

2.1 Descripción general del estudio

Se realizó un estudio descriptivo observacional acerca de la prevalencia de TBB y brucelosis en Colombia y un diagnóstico molecular. La población del estudio fueron los bovinos de los pequeños y medianos productores ganaderos de los municipios de Fusagasugá del departamento de Cundinamarca, Colombia. Se recolectaron asépticamente cinco muestras por duplicado de leche cruda del municipio de Fusagasugá ($n=5$) que es colectada en rutas programadas en el área rural y es distribuida en el casco urbano de la ciudad. El queso evaluado proviene del municipio de Cabrera donde es producido artesanalmente y comercializado en Fusagasugá.

Por otro lado, se realizó un estudio observacional retrospectivo basado en casos de TBB y

brucelosis. Recopilamos los datos epidemiológicos de los boletines semanales, mensuales y anuales a nivel Colombia por parte del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) que están disponibles gratuitamente en línea (<https://www.ica.gov.co/boletines.aspx>).

2.2 Contexto y Población

Se realizó un muestreo de cinco rutas de distribución de leche cruda, fueron numeradas como rutas 1 a 5 según conveniencia cuya procedencia fue del municipio de Fusagasugá. Se incluyeron cinco muestras de queso de leche cruda ($n=5$) con denominación de origen del municipio de Cabrera, municipios en donde se presume que la ganadería se realiza sin buenas prácticas ganaderas y donde actualmente se comercializa leche cruda y productos lácteos no pasteurizados.

2.3 Criterios de Selección

Se definieron como criterios de inclusión: La actividad productiva a pequeña y mediana escala, extensión de predios, sospecha de casos de TBB y brucelosis bovina en animales y productores del área de estudio y que proveían leche a las rutas de recolección.

2.4 Métodos en Laboratorio

Se realizó una curva de crecimiento para la cepa vacunal RB51 de *Brucella abortus* para la obtención de ADN que fue empleado como control en la técnica de PCR. Se realizaron diluciones seriadas de la cepa de *Brucella* en caldo tripticasa-soya (TSB) para estandarizar condiciones de crecimiento y cuantificar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Las condiciones de cultivo de incubación fueron: agitación en una atmósfera CO₂ al 5% y 37°C durante las 48 horas post-inoculación. El ADN genómico se extrajo mediante el método fenol-cloroformo, precipitación con etanol para la amplificación de genes por PCR ARNr 16S,

AMOS-ERY para *Brucella abortus*, PCR-TBC para *Mycobacterium bovis* y PCR-MTB confirmatoria para *Mycobacterium tuberculosis*.

Se recolectaron muestras de leche cruda y queso artesanal para la detección de *Mycobacterium bovis* y *Brucella abortus*, las cuales se almacenaron a 4°C hasta su uso. Se transfirieron 2 mL de las muestras en cabina para protección de aerosoles y se centrifugó a 7000 x g durante 10 minutos. Posteriormente se realizó la lisis celular con un buffer de lisis que contiene Tris HCl, EDTA, Triton 2%, lisozima y un tratamiento con proteinasa K. Se transfirió el precipitado final a un tubo O-Ring y se procedió a la homogeneización mecánica por medio de las perlas de zirconio. Se transfirió el sobrenadante a un tubo O-Ring limpio y se adiciono un volumen igual (1X) de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Seguidamente se realizó la extracción orgánica del ADN con un volumen 1/10 de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol al 100% pre-enfriado, que se mezcló abundantemente y se almacenó a -20°C toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se adicionó como paso de precipitación 1 mL de etanol al 70% frío. Finalmente, se resuspendió en 50 µL de buffer TE (Tris HCl, EDTA) 1X como tratamiento con buffer para solubilizar el ADN. Se continuó con la PCR del gen ARN ribosomal 16S para bacterias en general, AMOS-ERY específica para *Brucella abortus*, PCR-TBC específica para *Mycobacterium bovis* y PCR-MTB confirmatoria para *Mycobacterium tuberculosis* (Torres-Higuera et al. 2018). Los productos se visualizaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

2.5 Diseño de la Plataforma

Se utilizó un sistema de gestión por medio de una base de datos para recuperar y gestionar los datos epidemiológicos, mediante el uso de modelos estadísticos en una plataforma web interactiva en ArcGIS junto con la herramienta Map-Viewer de Esri. Se recopilaron los datos epidemiológicos de los boletines semanales, mensuales y anuales del ICA, que están

disponibles gratuitamente en línea (<https://www.ica.gov.co/boletines.aspx>) de acuerdo al periodo de observación entre 2004 y 2020. La herramienta basada en Sistemas de Información Geográfica (SIG) permite buscar el número de casos por municipio o generar un informe mensual para inferir una potencial estacionalidad de la enfermedad. La información de la plataforma se muestra en español.

2.6 Análisis Estadísticos

Se realizó mediante un análisis de correspondencia múltiple (MCA) y una prueba de Chi-cuadrado utilizando los paquetes Factominer y Factoextra del software R (v3.6) (R Core Team (2020). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>). Las variables incluyeron enfermedad sea TBB o brucelosis, número de casos, ubicación por departamento y año. Las diferencias estadísticas se calcularon a un nivel de significación $p < 0,001$.

3. Resultados

3.1 Crecimiento de cepas y estandarización de cultivo

El diagnóstico es un componente clave en el control de la brucelosis y la TBB y por ello, en la fase de laboratorio se han estandarizado las condiciones de cultivo e identificación molecular de *Brucella abortus* y *Mycobacterium bovis*. La cepa de *B. abortus* RB51 corresponde a la cepa vacunal viva liofilizada y atenuada contra la brucelosis bovina, es genéticamente estable y menos virulenta que la cepa vacunal C19. Se empleó la cepa RB51 porque produce inmunidad protectora frente a posibles brotes de *B. abortus* en bovinos porque a diferencia de la cepa C19, no interfiere con el diagnóstico de infecciones con cepas de campo (Figura 1).

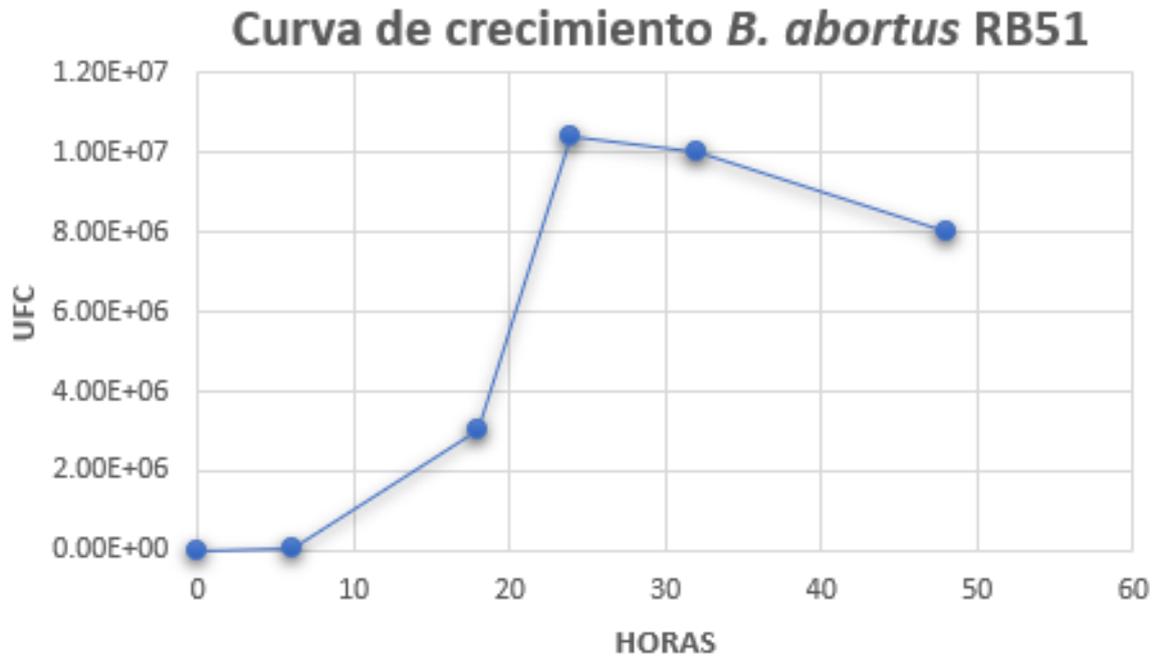


Figura 1. Curva de crecimiento para la cepa *Brucella abortus* RB51. Cantidad de UFC por tiempo de generación en 48 horas de incubación.

La curva de crecimiento para la especie *B. abortus* se realizó con el fin de conocer la generación de tiempo de duplicación de la bacteria y determinar la mayor cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para la estandarización del protocolo de extracción de ADN. Después de diluciones seriadas de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} UFC/mL en caldo soya triptica (TSB) entre las 6 horas hasta las 22 horas y diluciones seriadas de 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} UFC/mL entre las 24 hasta las 48 horas de incubación se obtuvieron los siguientes resultados. Inició la incubación con un tiempo 0 ($t=0$) con una concentración inicial de 0 UFC. A las 6 horas de incubación ($t=6$) la cantidad de bacterias se estimó en 30.000 UFC. A partir de las 18 horas ($t=18$) de incubación se observó el crecimiento bacteriano, en donde la cantidad de colonias llegó a 3.000.000 UFC. El conteo de las 24 horas ($t=24$) de incubación fue de 10.400.000 UFC, tiempo en donde la bacteria alcanza su máxima capacidad de crecimiento. A las 32 horas ($t=32$) de incubación las bacterias se encuentran en la fase estacionaria, en donde cesa el

crecimiento de la bacteria por agotamiento de nutrientes con 10.000.000 UFC. Finalmente, a las 48 horas de incubación ($t=48$) la cantidad de bacterias declina a 8.000.000 UFC. Para el caso de *M. bovis*, ya se tenían estandarizadas las condiciones de crecimiento con la cepa vacunal BCG de *Mycobacterium bovis* en el laboratorio del grupo de Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias (BBMM) de la Universidad Nacional de Colombia.

3.2 Extracción de ADN genómico y amplificación de gen por PCR

Se estandarizó un protocolo para la extracción de ADN en leche cruda y queso de leche cruda, rápido, sencillo y de bajo costo; que incluye los siguientes pasos: lisis celular, homogeneización mecánica, extracción orgánica y tratamiento con buffer. Se evaluaron 5 muestras de leche cruda y 5 muestras de queso de leche cruda obtenidas de los municipios de Fusagasugá y Cabrera, respectivamente. La concentración de ADN extraído de cada una de las muestras se evaluó mediante una medición de absorbancias a una longitud de onda de 260 nm, y la pureza de las muestras se estableció gracias a la relación de absorbancias A260/280. Se evidenció una concentración buena (cantidad) y pureza (calidad) aceptable en leche y en queso de leche cruda (Tabla 1). El protocolo se realizó en 10 muestras en las que se obtuvo una concentración promedio de 64,32 ng/ μ l, en donde L1 y Q4 son las muestras de mayor concentración, pues se estima que una buena cantidad de ADN oscila entre los 90-100 ng/ μ L. En la segunda columna se encuentra la pureza determinada a partir de la relación de absorbancias A260/A280, con una pureza promedio de 1,60. Se observó que las muestras L3 y Q4 son las muestras de mayor calidad, ya que se encuentran dentro del valor indicativo de ADN con pureza aceptable, el cual oscila entre 1,6-1,8. No obstante, de acuerdo al anterior parámetro, todas las muestras fueron apropiadas para la prueba de PCR.

Tabla 1. Concentración de ADN y pureza con la relación de absorbancia A260/A280 obtenidas en el muestreo.

MUESTRAS	CONCENTRACIÓN (ng/μl)	PUREZA (A260/A280)
Leche 1	146,7	1,70
Leche 2	84,2	1,54
Leche 3	80,5	1,72
Leche 4	51,8	1,68
Leche 5	50,4	1,59
Queso 1	48,4	1,28
Queso 2	16,2	1,60
Queso 3	15,5	1,64
Queso 4	92,7	1,68
Queso 5	56,8	1,55

Se realizaron PCR específicas para identificar las especies bacterianas presentes en las muestras, amplificando una región específica del gen que transcribe para el ARN ribosomal de la subunidad 16S el cual sugiere la presencia de contaminación bacteriana, en donde 4 muestras de queso (Q2, Q3, Q4 y Q5) permitieron obtener la banda esperada de 1446 pb (Figura 2A).

Se continuó con una PCR múltiple utilizando cebadores AMOS-ERY específicos para *Brucella*, en donde se observó dos bandas de fragmentos de 364 pb y 498 pb los cuales sirven para diferenciar *B. abortus* de las demás especies de *Brucella*. En los 10 aislados, en la cepa vacunal RB51 y en el control negativo se encontró una amplificación de un fragmento de 178 pb dando como resultado un muestreo negativo para *B. abortus* (Figura 2B).

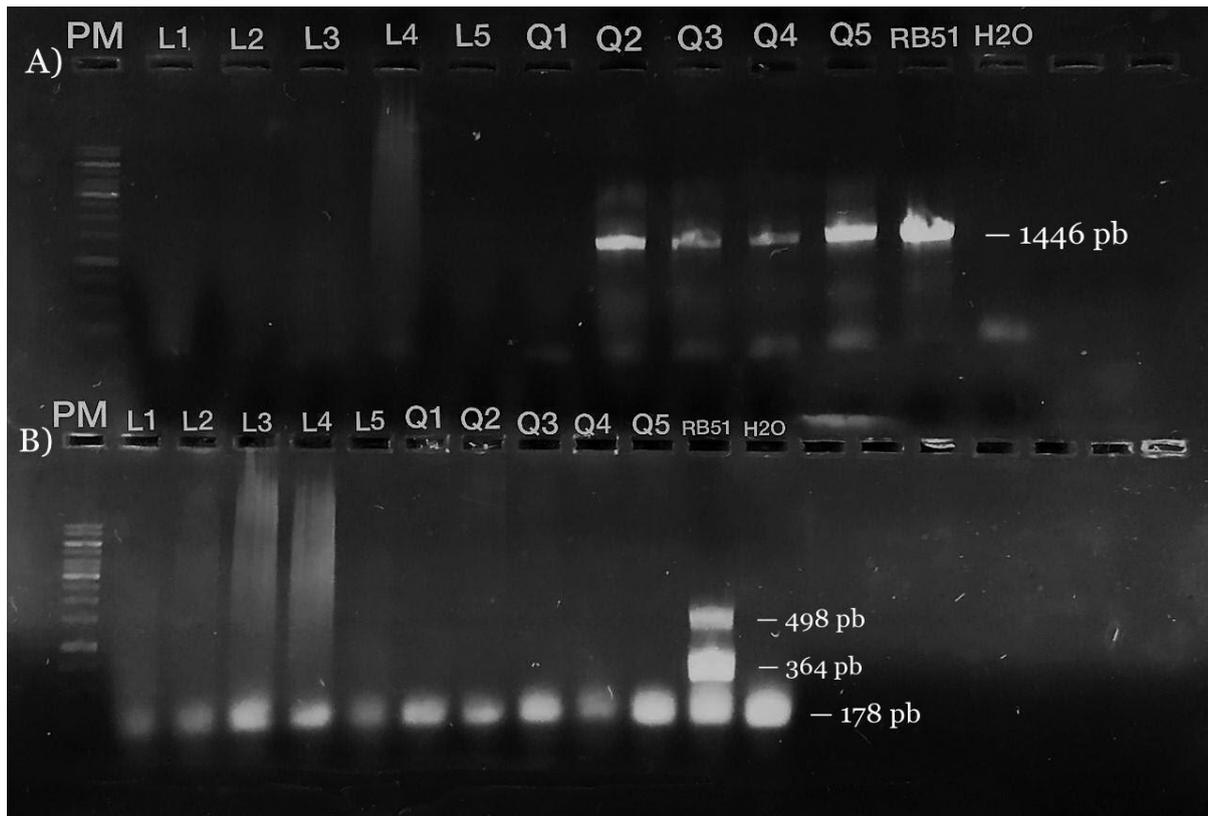


Figura 2. A: Método de PCR región específica de ARN ribosomal 16S para bacterias en general. B: Método de PCR AMOS-ERY *Brucella abortus*. (PM) Marcador de peso molecular expresado en pb. (L) Muestras de leche cruda. (Q) Muestras de queso de leche cruda. (RB51) Control positivo con la cepa vacunal. (H₂O) Control negativo.

La PCR específica para *M. bovis*, se emplea para la diferenciación de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*, en donde se utilizan los cebadores de amplificación selectiva para *M. bovis* 1566 up/14130 low. Se realizó una verificación de la especificidad de los primers en Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) con la secuencia 1566 up 5' GCGTGGCGTGAATACCTACTT 3' de 21 pb de extensión, con una (T_m: 60,1) y la secuencia 14130 low 5' CGGGTGTAGCTCGAGGATTTT 3' de 21 pb de extensión, (T_m: 60,7) indicando que el organismo blanco corresponde a *Mycobacterium bovis* (Figura 3).

Products on target templates

>CP064405.1 Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG strain BCG SL 222 Sofia chromosome, complete genome

	Product length = 666		
Forward primer	1	GCGTGGCGTGAATACCTACTT	21
Template	2192276	2192296
Reverse primer	1	CGGGTGTAGCTCGAGGATTTT	21
Template	2192941	2192921

>CP023708.2 Mycobacterium tuberculosis variant bovis strain 3/86Rv chromosome

	Product length = 666		
Forward primer	1	GCGTGGCGTGAATACCTACTT	21
Template	2204344	2204364
Reverse primer	1	CGGGTGTAGCTCGAGGATTTT	21
Template	2205009	2204989

>LR699570.1 Mycobacterium tuberculosis variant bovis strain Mb3601 genome assembly, chromosome: Mb3601

	Product length = 666		
Forward primer	1	GCGTGGCGTGAATACCTACTT	21
Template	2208341	2208361
Reverse primer	1	CGGGTGTAGCTCGAGGATTTT	21
Template	2209006	2208986

Figura 3. Verificación de la especificidad de los cebadores empleados en la PCR-TBC para *Mycobacterium bovis*, obtenido en BLAST.

Se obtuvo una muestra de queso (Q1) positivo para dicha región que se evidencia con una banda de 635 pb (Figura 4A). La amplificación por PCR-MTB es una PCR confirmatoria que detecta especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, con la cual se identificó una banda de un fragmento de 394 pb en el control positivo por la cepa vacunal que no se encontró en las 10 muestras evaluadas (Figura 4B).

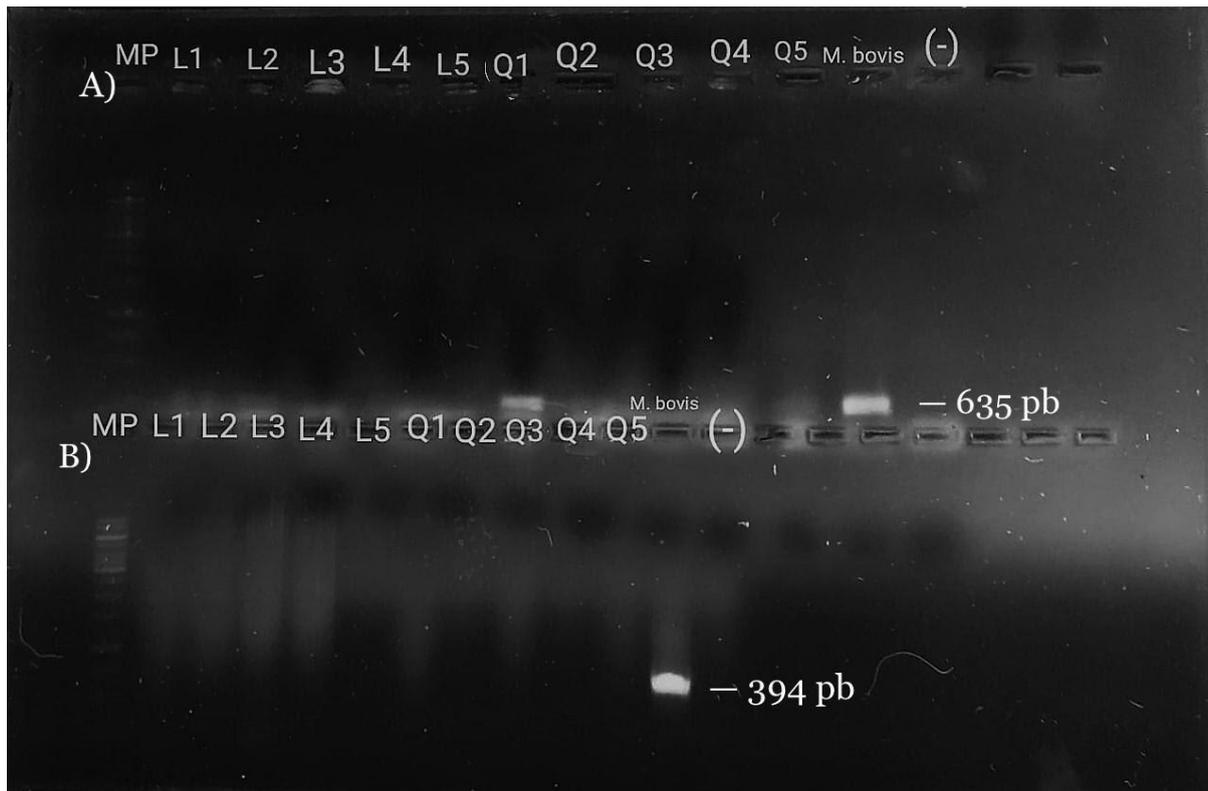


Figura 4. A: Método de PCR-TBC *Mycobacterium bovis*. B: Método de PCR-MTB complejo *Mycobacterium tuberculosis*. (MP) Marcador de peso molecular expresado en pb. (L) Muestras de leche cruda. (Q) Muestras de queso de leche cruda. (*M. bovis*) Control positivo con la cepa del Instituto Nacional de Salud BCG 080217. (H₂O) Control negativo.

3.3 Panel de visualización de casos de brucelosis y TBB

El ICA realiza reportes semanales, mensuales y anuales de los casos de brucelosis y TBB en Colombia. Con el propósito de entender la diseminación de dichas enfermedades, en este estudio se recopilieron los datos de sanidad animal en una plataforma web que determina la prevalencia de brucelosis y TBB en Colombia en tiempo real, la cual identifica geográficamente el municipio donde se presentó un brote en una línea de tiempo (Figura 5). Según los informes semanales de sanidad animal, se genera un acumulado de casos por mes y por departamento, siendo de mayor impacto los departamentos con un total de casos de las enfermedades Cundinamarca con 435 casos (25,9 %), Antioquia con 279 casos (16,5 %) y

Valle del Cauca con 241 casos (14,3 %). Los análisis en detalle del mapa evidenciaron que la mayor cantidad de casos identificados de brucelosis se originaron en el municipio de San Pedro de los Milagros (Antioquia) con 235 casos. Se evidenció el impacto de TBB en el municipio de Zipaquirá (Cundinamarca) con un total de 139 casos acumulados.

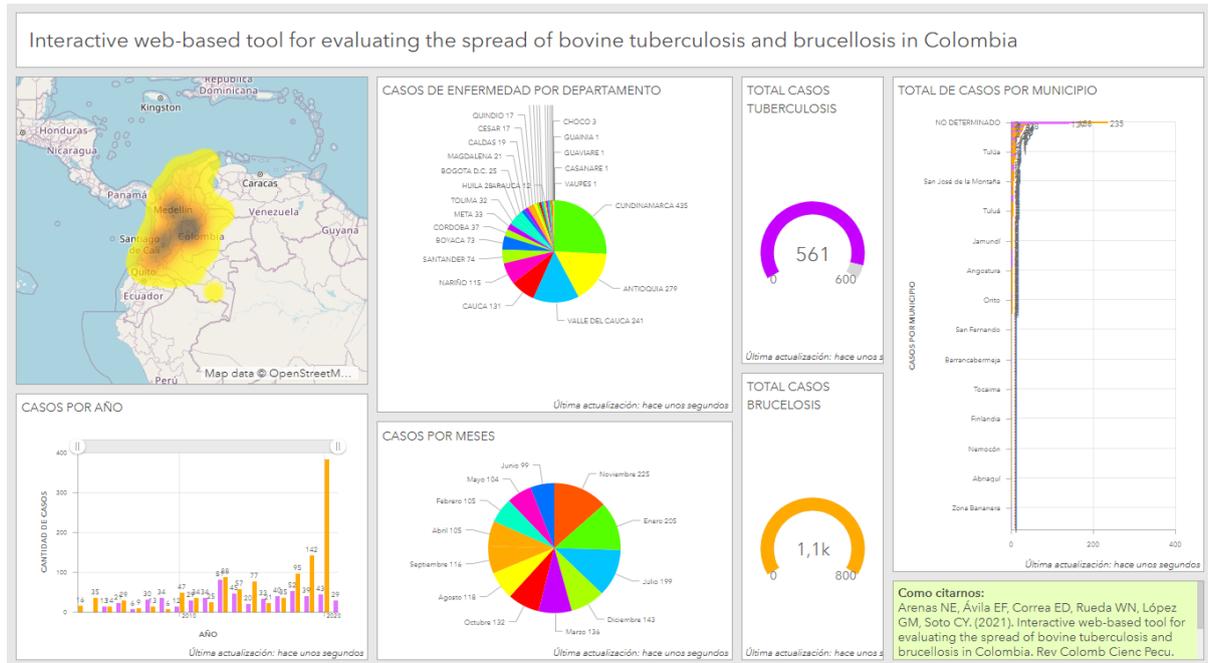


Figura 5. Visualización de la herramienta web para evaluar la propagación de brucelosis y TBB en Colombia. Panel derecho: número total de casos por municipio; Panel central-superior: número total de casos por departamento; Panel central-inferior: frecuencia de casos por mes; Panel superior izquierdo: mapa interactivo de los casos a nivel Colombia; y Panel inferior izquierdo: número total de casos por año, se observa en color violeta el total de casos para TBB y en color amarillo el total de casos para brucelosis.

El análisis estadístico evidenció que en el año 2020 se reportó la mayor cantidad de brotes de brucelosis, con un total de 383 casos activos, mientras que el año 2012 fue el que tuvo un pico de contagio de TBB, pues se identificaron 91 casos activos. Estos resultados nos brindan consistencia con los datos en la plataforma que proporciona información precisa y actualizada sobre la cantidad de brotes y ubicación exacta del brote de dichas enfermedades. Se espera que

los análisis permitan a las entidades encargadas del control y vigilancia puedan formular acciones para la erradicación de estas enfermedades.

4. Discusión

El presente estudio pretende contribuir al control de brucelosis y TBB a través de nuevas estrategias diagnósticas e incorporarlas en los programas de control basadas en un panel de monitoreo y un método de diagnóstico molecular a partir de muestras de leche cruda y queso elaborado artesanalmente.

Estas zoonosis son un problema actual y, al no tener un control adecuado de las mismas se transforman en un problema de salud pública, lo que a menudo demuestra el desinterés o la poca inversión de las autoridades de sanidad animal por generar espacios de divulgación o capacitaciones de alto impacto para pequeños, medianos productores y ganaderos tradicionales. Las acciones educativas podrían ser valiosas como primer paso y hace parte de la implementación de buenas prácticas ganaderas e implementación de medidas preventivas (Avila-Granados et al., 2019). La detección temprana evita que se generen pérdidas económicas mayores para el productor ganadero.

Lo primero fue estandarizar un método molecular para el diagnóstico de brucelosis y TBB en muestras de productos lácteos y leche cruda. El protocolo de extracción de ADN se considera uno de los pasos críticos en la detección de cualquier microorganismo detectable en la leche, ya que parte del éxito de la amplificación está ligado a la pureza y cantidad del ADN obtenido. Así en las muestras de derivados lácteos se encuentran con frecuencia inhibidores de la PCR como lípidos, proteasas y calcio que podrían alterar la eficiencia de la reacción (Bessetti 2007; Schrader et al., 2012).

Las técnicas de biología molecular han evolucionado tanto que en la actualidad se han desarrollado métodos basados en el ADN (Arenas & Salazar, 2019). Se ha demostrado que los

métodos de PCR basados en ADN son altamente específicos, reproducibles y sensibles, caracterizados por un alto poder discriminatorio, procesamiento rápido y bajo costo, por lo que se han dispuesto para estudiar la composición microbiana de los alimentos (Quigley et al., 2012).

Las enfermedades transmitidas por los productos lácteos son un problema de salud pública por el riesgo de contagio que representan durante su cadena productiva, incluidos los productos de origen animal y los alimentos listos para consumir (Verraes et al., 2015). La leche y sus derivados lácteos son productos de alto consumo en la sociedad y por su contenido nutricional se pueden contaminar fácilmente; por lo tanto, un método molecular es una opción para detectar patógenos en los alimentos, en este caso en leche cruda y en queso elaborado artesanalmente a partir de leche cruda. Se estandarizó una prueba diagnóstica a partir de leche cruda y en queso de leche cruda con buena sensibilidad, y especificidad que pueden complementar los métodos convencionales. Así, podemos proponer que la detección de patógenos por PCR es viable y mejora el pronóstico de una enfermedad si se hace de modo temprano, aun cuando los animales no presentan síntomas clínicos (Avila-Granados et al., 2019).

El protocolo propuesto para la extracción de ADN total en leche cruda y queso de leche cruda fue diseñado por medio de un método casero que permite obtener una buena concentración y pureza (calidad) de ADN satisfactorio. La cantidad de ADN genómico se estimó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, logrando un ADN con una concentración entre 15,5 ng/μL y 146,7 ng/μL, cantidades aceptables en comparación con métodos de extracción que requieren pasos adicionales con columnas, extracciones móviles con perlas magnéticas, resinas o cromatografías para mejorar la concentración de las muestras y eliminar impurezas. La calidad de las muestras se determinó gracias a la relación de absorbancia A₂₆₀/A₂₈₀, reportada en la literatura por ser muy estable, la pureza de ADN oscila entre 1,2-1,7, en leche

cruda se encuentran dentro del rango de pureza aceptable (1,6 - 1,8), siendo la cantidad mínima reportada 1,54, mientras que la pureza del queso de leche cruda se encuentra en el rango de contaminación por presencia de compuestos aromáticos ($>1,6$). La eficiencia esperada del método de lisis no fue igual en el queso artesanal en comparación con la leche cruda, debido a la presencia de componentes adicionales del queso como los lípidos, proteínas, etc. En la electroforesis del ADN extraído se observa la banda de ADN íntegro. Una superioridad de este procedimiento es que permite la identificación de microorganismos que no se pueden estudiar con técnicas convencionales o que no pueden ser cultivados en sustratos artificiales.

Los cebadores 1566 up/14130 low utilizados en la PCR-TBC, permiten diferenciar *M. bovis* por medio de una amplificación específica del fragmento de tamaño esperado en la vacuna y en la leche. Asimismo, se hizo una evaluación con diferentes secuencias relacionadas con el género *Mycobacterium* y un análisis de la especificidad de los primers por BLAST y no se presentaron amplificaciones inespecíficas, confirmando la especificidad de los primers para *M. bovis*.

Este trabajo apoya el programa de vigilancia y control de la brucelosis y TBB en el país, y aporta nueva evidencia del comportamiento epidemiológico de las dos enfermedades. El mismo aporta una prueba molecular rápida y fiable a la hora de enfrentarnos ante la brucelosis y TBB, también permite proyectar la posibilidad a futuro de una producción limpia del sector agropecuario de Colombia que permita alcanzar mercados internacionales. Se recomiendan investigaciones futuras para generar nuevos programas de tamizaje de alto impacto que fortalezcan las estrategias de vacunación en regiones endémicas. Así, el presente proyecto presenta un panel interactivo para la comunidad científica que contiene información epidemiológica a nivel Colombia de las zonas endémicas por brucelosis y TBB (Arenas et al. 2021). Los datos permiten obtener una visión panorámica entorno a la frecuencia del brote en el municipio, de igual manera como se ha establecido en el departamento, anualmente cuántos

casos son reportados, qué meses tienen mayor prevalencia de las enfermedades y la frecuencia de cada una de las enfermedades, caracterizadas en color morado para TBB y en color naranja para brucelosis. En los reportes semanales del ICA es difícil vincular los datos de salud, población afectada y cómo la estacionalidad afecta el surgimiento de brotes para llegar a establecer e implementar estrategias efectivas de control para la vigilancia de la brucelosis y la TBB (Dafale et al., 2020). El ICA ha concentrado acciones para la erradicación de la TBB en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Córdoba, Cundinamarca, Quindío y Santander como áreas críticas y que es consistente con lo que se observa en los focos detectados en el panel hacia el área Andina (ICA, 2017). El programa de vigilancia busca promover acciones de control como identificación y saneamiento de predios con casos positivos, control de movilización de animales, indemnización e incentivo económico al ganadero, certificación de Predios libres y vigilancia epidemiológica. No obstante, existe cierta inconformidad en los ganaderos respecto al incentivo otorgado y desconfianza cuando se presentan animales positivos, e incluso, algunos ganaderos niegan que su animal sea positivo para alguna enfermedad. Esto podría favorecer el deterioro de la salud animal y afectar la capacidad productora de su propio hato cuando hay transmisión, truncando la capacidad productiva de leche y la producción de carne de calidad al mercado local que abastece (Owusu-Kwarteng et al., 2020).

El panel constituye una valiosa herramienta que puede contribuir al esfuerzo del control de los brotes en los hatos ganaderos, es una prioridad para la investigación de diversos temas de salud pública y se utiliza para establecer acciones a corto, mediano y largo plazo durante emergencias por brotes asociados a diversos factores como el cambio climático (Cárdenas et al., 2019). El uso de tecnologías de información en la investigación científica proporciona a las autoridades de salud pública y al público en general una herramienta fácil de usar y generalmente manejable para monitorear los brotes a medida que se desarrollan. La aplicación web es una

estrategia fundamental que se está expandiendo rápidamente en la mayoría de las enfermedades que representan una amenaza en salud pública. Durante la pandemia por SARS COV-2, se diseñó una herramienta para ilustrar la ubicación y el número de casos confirmados de COVID19, muertes y recuperaciones de todos los países afectados (Dong et al., 2020). Entonces nuestro panel interactivo se convierte en una estrategia importante que permite identificar el origen, la capacidad de propagación de *B. abortus* y *M. bovis* a escala temporal-espacial y hacer un seguimiento cronológico de los casos nuevos (incidencia). Es importante resaltar que los ganaderos movilizan constantemente animales, algunos realizan inseminación con procedimientos empíricos que pueden influenciar la propagación de estas enfermedades en el ganado bovino (Leal-Bohórquez et al., 2016). Por lo anterior, se requieren estrategias de control modernas y que no están actualmente establecidas en el país que indirectamente contribuyan a evidenciar el impacto de la vacunación en áreas endémicas (Fayisa, 2020). Así, nuestro panel interactivo tiene una fortaleza, pues sirve como herramienta para apoyar la vigilancia que tienen los programas de control, generando un impacto en las políticas de salud animal y permite ubicar los puntos críticos nacionales de propagación.

5. Conclusiones

En este trabajo se presenta una plataforma web actualizada con los datos de brucelosis y TBB reportados por el ICA e implementados para reforzar las estrategias de vigilancia epidemiológica de estas enfermedades que amenazan la producción ganadera en Colombia. La herramienta web permitirá evaluar la propagación de brucelosis y TBB en Colombia de forma eficiente y representa una estrategia para acercar a la comunidad científica con las entidades de control. El sistema de georreferenciación brinda información de manera organizada, clara y puntual de los brotes activos que representan los sitios de alta frecuencia de transmisión de casos en espacio y tiempo.

Se estandarizó un protocolo rápido y sencillo para la extracción de ADN que puede ser empleado para identificar contaminación microbiológica en derivados y productos lácteos crudos con un costo relativamente bajo y la obtención de ADN a una concentración y pureza aceptables.

Se evaluaron las condiciones de PCR considerando especificidad, sensibilidad y obtención de productos de amplificación que permiten la detección de contaminación bacteriana en productos y derivados lácteos crudos.

La oportuna detección de patógenos zoonóticos que son transmitidos por los alimentos es primordial para controlar con exactitud la reaparición de brotes en áreas endémicas en Colombia. Aunque no se identificaron casos de TBB y brucelosis, ambas enfermedades continúan siendo enfermedades de interés, ya que representan una fuente de infección y propagación para los ganaderos, pequeños y medianos productores y consumidores de productos lácteos crudos.

6. Recomendaciones

La disminución del riesgo de infección por patógenos se basa en un control microbiológico estricto y la implementación de pruebas confiables, rápidas y aplicadas en el campo de la industria alimenticia y la salud pública. Se recomienda modernizar los métodos de campo de diagnóstico en tiempo real para la brucelosis y TBB.

Se hace necesario ampliar este estudio, empleando una mayor cantidad de muestras, integrar animales de diferentes regiones, las cuales cuentan con diferentes prevalencias de brucelosis y TBB, y si se puede lograr una prueba de alto impacto con evaluación de anticuerpos en sangre.

La detección de patógenos con fines diagnósticos se basa en la ejecución simultánea de la amplificación de un fragmento concreto y su reconocimiento mediante PCR.

Se recomienda la aplicación e implementación de las técnicas isotérmicas para un amplio

número de especies, donde se logre la detección e identificación directa de los patógenos a partir de muestras puras.

7. Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios porque me ha permitido dar este paso tan importante en mi vida, por guiarme e ir conmigo. Gracias a mis padres porque me enseñaron a quitarme los miedos y me inculcaron que con perseverancia y constancia tendrían a su chiqui como toda una profesional, a mis hermanos Cindy y Bradley por ser mi apoyo y darme ánimos para no rendirme. Infinitas gracias a mi novio Jhonatan Forero por ser mi apoyo incondicional, por enseñarme a tener esperanza y no dejarme caer, a luchar hasta el final dando lo mejor de mí para obtener todo lo que sueño, en este caso mi título profesional.

Al Doctor Carlos Zubieta gracias por el apoyo, la confianza, me llevo algo muy especial y un gran aprendizaje para mi vida, y es impulsar a aquellas personas que tienen ganas y la pasión por salir adelante.

En segundo lugar, agradezco al asesor de este trabajo, el Doctor Nelson Arenas por brindarme la confianza de ser la primera estudiante bajo su asesoría, por su calidad de ser humano, por ser apoyo, guía y por tener siempre las palabras adecuadas para subir el ánimo y sacar adelante este proyecto, gracias por los emojis, por ser la persona que siempre estuvo pendiente de mi proceso y me enseñó a diario a tener criterio profesional y confianza en mis capacidades.

Finalmente, gracias al grupo de investigación en Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias (BBMM) de la Universidad Nacional de Colombia por permitirme llevar a cabo esta investigación en su laboratorio y tener a mi disposición lo que requiriera para el cumplimiento del mismo. Gracias a mi compañera de trabajo Laura Gómez por ser mi apoyo y por compartir sueños e ilusiones en tan corto tiempo. Igualmente, gracias a la Universidad Antonio Nariño por apoyar mi proceso de formación. Gracias a mis amigos y compañeros de

pregrado que me brindaron apoyo cuando lo necesite y saben que siempre podrán contar conmigo.

8. Financiación

El presente proyecto fue realizado con recursos del proyecto titulado: “Diagnóstico en campo de tuberculosis bovina en la región de Sumapaz. Fase 2: evaluación y validación de un método rápido basado en amplificación isotérmica” (Código 51040) aprobado en la Segunda Convocatoria de proyectos de investigación conjuntos entre la Universidad de Cundinamarca y la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, 2020.

9. Productos de investigación

Durante la ejecución del presente proyecto se realizaron los siguientes productos de investigación:

- Interactive web-based tool for evaluating the spread of bovine tuberculosis and brucellosis in Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*; 34(3): 224–230 (Artículo).
- V Congreso Colombiano de Biología Computacional y Bioinformática. “Predicción de la interacción de la cefalexina con una posible Serina- β -lactamasa de *Bacillus cereus*” (Presentación)
- International congress of Asian-African society of Mycobacteriology. “An interactive panel for monitoring the spread of bovine tuberculosis and brucellosis in Colombia en la revista *International Journal of Mycobacteriology*” (Presentación).
- X Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis (SLAMTB). “Identification of *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* by molecular methods in milk samples from the Sumapaz region, Cundinamarca,

Colombia” (Presentación).

- XII Encuentro Investigación en Enfermedades Infecciosas. “Herramienta geoespacial de vigilancia epidemiológica para el control de la tuberculosis bovina y brucelosis en Colombia” (Presentación)
- Simposio Internacional de búsqueda de Nuevas Alternativas Antimicrobianas. “Análisis comparativo de genomas de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* causantes de infecciones nosocomiales en la era post COVID-19” (Presentación).
- III Simposio Bogotano de Ciencias Moleculares Computacionales. “Identificación de resistencia antimicrobiana en cepas de *Klebsiella pneumoniae* mediante herramientas computacionales en la era post COVID-19” (Presentación).

10. Referencias

Acha, P., & Szyfres, B. (2001). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales Tercera edición. Bacteriosis y Micosis, 1(580), 1–420.
<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/Acha-Zoonosis-Spa.pdf>

Agudelo-Suárez, A. N. (2012). Aproximación a la complejidad de las zoonosis en Colombia. Revista de Salud Pública, 14(2), 325–339. <https://doi.org/10.1590/s0124-00642012000200013>

Álvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Sáez, J. L., Gordejo, F. J. R., Briones, V., Moreno, M. Á., Mateos, A., Domínguez, L., & Aranaz, A. (2008). Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. Veterinary Microbiology, 128(1–2), 72–80.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.08.034>

Arenas, N. E., Abril, D. A., Valencia, P., Khandige, S., Soto, C. Y., & Moreno-Melo, V. (2017). Screening food-borne and zoonotic pathogens associated with livestock practices in the Sumapaz region, Cundinamarca, Colombia. *Tropical Animal Health and Production*, 49(4), 739–745. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1251-6>

Arenas, N. E., & Salazar L. M. (2019). Steps and Tools for PCR-Based Technique Design. In *Biotechnology and Bioengineering*, Eduardo Jacob -Lopes and Leila Queiroz Zepka, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.83671. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/65252>

Arenas, N. E., Ávila, E. F., Correa, E. D., Rueda, W. N., López, G. M., & Soto, C. Y. (2021). Interactive web-based tool for evaluating the spread of bovine tuberculosis and brucellosis in Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 34(3), 224–230. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v34n3a04>

Arenas, N., & Moreno, V. (2016). Estudio económico de la infección por *Brucella abortus* en ganado bovino en la región del Sumapaz, Cundinamarca. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 63(3), 218–228. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v63n3.62751>

Avila-Granados, L. M., Garcia-Gonzalez, D. G., Zambrano-Varon, J. L., & Arenas-Gamboa, A. M. (2019). Brucellosis in colombia: Current status and challenges in the control of an endemic disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00321>

Bermúdez, Ch.E.; Arenas, N.F.; Moreno Melo, V. (2017). Caracterización socio-económica y

ambiental en pequeños y medianos predios ganaderos en la región del Sumapaz. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 20(1): 199-208. <https://doi.org/10.31910/rudca.v20.n1.2017.76>

Bessetti, J. (2007). An introduction to PCR inhibitors. *Journal of Microbiol Methods*, 28, 159-67.

<https://www.promega.com/~media/files/resources/profiles%20in%20dna/1001/an%20introduction%20to%20pcr%20inhibitors.pdf>

Bezoz, J., Álvarez, J., Juan, L. de, Romero, B., Rodríguez, S., Castellanos, E., Saéz-Llorente, J. L., Mateos, A., Domínguez, L., & Aranaz, A. (2011). Factors influencing the performance of an interferon- γ assay for the diagnosis of tuberculosis in goats. *Veterinary Journal*, 190(1), 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.09.026>

Cárdenas, L., Melo, O., & Casal, J. (2018). Evolution of bovine brucellosis in Colombia over a 7-year period (2006–2012). *Tropical Animal Health and Production*, 50(1), 19–27. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1395-4>

Cárdenas, L., Peña, M., Melo, O., & Casal, J. (2019). Risk factors for new bovine brucellosis infections in Colombian herds. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1825-9>

Coad, M., Downs, S. H., Durr, P. A., Clifton-Hadley, R. S., Hewinson, R. G., Vordermeier, H. M., & Whelan, A. O. (2008). Blood-based assays to detect *Mycobacterium bovis*-infected cattle missed by tuberculin skin testing. *Veterinary Record*, 162(12), 382–384. <https://doi.org/10.1136/vr.162.12.382>

Dafale, N. A., Srivastava, S., & Purohit, H. J. (2020). Zoonosis: An Emerging Link to Antibiotic Resistance Under “One Health Approach.” *Indian Journal of Microbiology*, 60(2), 139–152. <https://doi.org/10.1007/s12088-020-00860-z>

De Kantor, I. N., & Ritacco, V. (2006). An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Veterinary Microbiology*, 112(2-4 SPEC. ISS.), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.033>

de Waard, J. H. (2010). ¿Ordeñando micobacterias del ganado? Impacto económico y en salud de tuberculosis bovina y paratuberculosis en Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 15(2), 2037–2040. <https://doi.org/10.21897/rmvz.998>

Dong, E., Du, H., & Gardner, L. (2020). An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(5), 533–534. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30120-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30120-1)

FAO. (2015). Organización mundial de sanidad animal (OIE) quinto plan estratégico: 2011-2015. 2011–2015.

Fayisa, W. O. (2020). Review on The Importance of Geographic Information System (Gis) In Epidemiology: In Prevention and Control of Animal Disease. *International Journal of Veterinary Science and Research*, 6(1), 047-051. <https://dx.doi.org/10.17352/ijvsr.000053>

González T, M., Ríos R, R., & Mattar V, S. (2007). Prevalencia de bacterias asociadas a la

infertilidad infecciosa en bovinos de Montería, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 12(2), 1028–1035. <https://doi.org/10.21897/rmvz.423>

Holveck, J. C., Ehrenberg, J. P., Ault, S. K., Rojas, R., Vasquez, J., Cerqueira, M. T., Ippolito-Shepherd, J., Genovese, M. A., & Periago, M. R. (2007). Prevention, control, and elimination of neglected diseases in the Americas: Pathways to integrated, inter-programmatic, inter-sectoral action for health and development. *BMC Public Health*, 7, 1–21. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-7-6>

ICA, (2017). Programa Nacional Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina. Bogotá, Colombia.

<https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/enfermedades-animales/tuberculosis-bovina-1/campana-de-erradicacion.aspx> (Accedido 13/10/2021).

Jojoa-Jojoa, J., Maira Wintaco, M., Francisco Osorio, R., Puerto-Castro, G., & Guerrero-Guerrero, M. (2016). First approach to molecular epidemiology of bovine tuberculosis in Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 21(1), 5222–5236. <https://doi.org/10.21897/rmvz.32>

Leal-Bohórquez, A. F., Castro-Osorio, C. M., Wintaco-Martínez, L. M., Puerto-Castro, G. M., & Villalobos, R. (2016). Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in workers of bovine tuberculosis sanitation farms in Antioquia, Boyacá and Cundinamarca. *Revista de Salud Pública*, 18(5), 727–737. <https://doi.org/10.15446/rsap.v18n5.51187>

Lucero, N. E., Ayala, S. M., Escobar, G. J., & Jacob, N. R. (2008). *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiology and Infection*, 136(4), 496–

503. <https://doi.org/10.1017/S0950268807008795>

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

<https://doi.org/10.19052/mv.4057>

Moreno, E. (2014). Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in Microbiology*, 5(MAY), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00213>

Müller, B., Dürr, S., Alonso, S., Hattendorf, J., Laisse, C. J. M., Parsons, S. D. C., Helden, P. D. Van, & Zinsstag, J. (2013). Induced Tuberculosis in Humans. *Emerg Infect Dis*, 19(6), 899–908.

Neta, A. V. C., Mol, J. P. S., Xavier, M. N., Paixão, T. A., Lage, A. P., & Santos, R. L. (2010). Pathogenesis of bovine brucellosis. *Veterinary Journal*, 184(2), 146–155.

<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.04.010>

OIE - J. Crenn, A. T. (2011). Tuberculosis bovina Fichas de información general sobre enfermedades animales ¿Qué es la tuberculosis bovina? La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad crónica de los animales provocada por una. 1, 6.

Owusu-Kwarteng, J., Akabanda, F., Agyei, D., & Jespersen, L. (2020). Microbial safety of milk production and fermented dairy products in Africa. *Microorganisms*, 8(5), 752.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8050752>

Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Paul Ross, R., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2012). A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 113(1), 96–105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05294.x>

Reyes Julián, et. al 2010. (2010). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=295023458005>. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23, 35–46.

Rivera A, D. Y., Rueda, O. E., Calderon, C. R., Mariño J, O. C., Gall, D., & Nielsen, K. (2003). Evaluación comparativa del método inmunoenzimático indirecto en leche para la detección de bovinos infectados con *Brucella abortus*, en hatos del departamento de Cundinamarca, Colombia. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 22(3), 1065–1075. <https://doi.org/10.20506/rst.22.3.1454>

Rodríguez, Y., Torres, S. N., Mora, J. F. J., & Charry, J. C. V. (2014). Brucellosis recurrente. *Pediatría*, 47(1–2), 32–35. [https://doi.org/10.1016/s0120-4912\(15\)30129-4](https://doi.org/10.1016/s0120-4912(15)30129-4)

Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H. M., Palmer, M. V., Harris, B. N., Orloski, K. A., Buddle, B. M., Thacker, T. C., Lyashchenko, K. P., & Waters, W. R. (2010). Bovine tuberculosis: A review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57(4), 205–220. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01148.x>

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors—occurrence,

properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014-1026.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>

Soares, C. de P. O. C., Teles, J. A. A., dos Santos, A. F., Silva, S. O. F., Cruz, M. V. R. A., & da Silva-Júnior, F. F. (2015). Prevalence of *Brucella* spp in humans. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 23(5), 919–926. <https://doi.org/10.1590/0104-1169.0350.2632>

Torres, P. M. (2010). Pruebas diagnósticas de campo. 9. http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/BOVINOS_BUBALINOS/PROD_PRIMARIA/SANIDAD/ENF_Y ESTRAT/TUBERCULOSIS/file1012-9.pdf

Torres-Higuera, L. D. Jimenez-Velasquez, S. Rodriguez-Bautista, J. Patiño-Burbano, R. 2018. Identification of *Brucella abortus* Biovar 4 of bovine origin in Colombia. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(3), 221-228. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.002>

Valera, Y. R., Sánchez, W. R., Sánchez, G. A., Pérez, F., Pérez, Y. R., Igarza, A., & Universidad, P. (2005). Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, VI(9), 1–9.

Verraes, C., Vlaemynck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., ... & Herman, L. (2015). A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal*, 50, 32-44. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.05.011>

Zelanda, N., Riding, N., & Manitoba, M. De. (2010). Tuberculosis bovina Tuberculosis bovina.

1-7. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/bovine_tuberculosis-es.pdf

Documento realizado por: Alicia Romero
Modificado por: Diana Martínez Pachón
Actualizado por: Alejandra Baena
2021-II