UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TEMA:

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Brucella spp* EN GANADERÍAS BOVINAS EN EL CANTÓN GUARANDA

Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de Médico Veterinario otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Medicina Veterinaria.

AUTOR

Willian Gabriel Conde Castillo

TUTOR

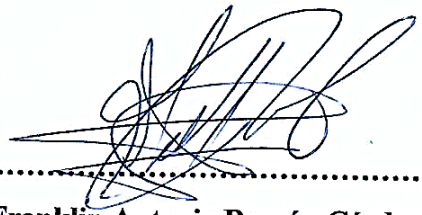
Dr. Franklin Antonio Róman Cárdenas M.Sc.

GUARANDA – ECUADOR

2024

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Brucella spp* EN GANADERÍAS BOVINAS EN EL CANTÓN GUARANDA.

REVISADO Y APROBADO POR:



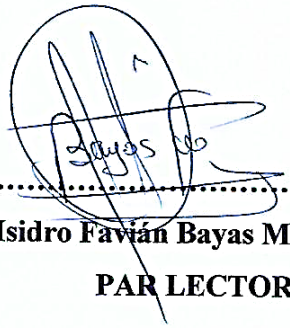
.....

Dr. Franklin Antonio Román Cárdenas M.Sc.
TUTOR



.....

Dr. Edison Riveliño Ramón Curay. M.Sc.
PAR LECTOR



.....

Dr. Isidro Favián Bayas Morejón PhD.
PAR LECTOR

CERTIFICACIÓN DE AUTORIA

Yo, Willian Gabriel Conde Castillo, con CI: 1150030946, declaró que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional; y, que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas y citadas con su respectivo autores.

La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional vigente.

.....

Willian Gabriel Conde Castillo

AUTOR

CI: 1150030946

.....

Dr. Franklin Antonio Román Cárdenas M.Sc.

TUTOR

CI: 1103065072

ESCRITURA N°20240201004P00988

DECLARACIÓN JURAMENTADA

OTORGA:
WILLIAN GABRIEL CONDE CASTILLO
CUANTÍA: INDETERMINADA
Di 2 COPIA

En el Cantón Guaranda, Provincia de Bolívar, República del Ecuador, hoy martes a los ocho días del mes de octubre del año dos mil veinticuatro, ante mí **DOCTORA MSC. GINA LUCIA CLAVIJO CARRIÓN, NOTARIA CUARTA DEL CANTÓN GUARANDA** comparece con plena capacidad, libertad y conocimiento, a la celebración de la presente escritura, el señor **WILLIAN GABRIEL CONDE CASTILLO**, de estado civil soltero, por sus propios y personales derechos. El compareciente declara ser de nacionalidad ecuatoriana, mayor de edad, de estados civil como se deja expresado, de ocupación estudiante, domiciliado en la parroquia Zumba, cantón Chinchipe, Provincia Zamora Chinchipe y de paso por este cantón Guaranda, provincia Bolívar, con celular número cero nueve cinco nueve ocho nueve seis ocho ocho seis; y, con correo electrónico wconde@mailes.ueb.edu.ec, hábil en derecho para contratar y contraer obligaciones, a quien de conocer doy fe, en virtud de haberme exhibido sus documentos de identificación, en base a lo cual obtengo la certificaciones de datos biométricos del Registro Civil, además a petición expresa del compareciente se adjunta sus documentos personales como son la cedula de ciudadanía y certificado de votación, que agrego a esta escritura como documentos habilitantes. Advertido el compareciente por mí la Notaria de los efectos y resultados de esta escritura, así como examinado que fue en forma aislada y separada de que comparece al otorgamiento de esta escritura sin coacción, amenazas, temor reverencial, ni promesa o seducción, advertida la compareciente de la obligación de decir la verdad y conocedor de la penas de perjurio declara: Yo, **WILLIAN GABRIEL CONDE CASTILLO**, de estado civil soltero, declaro bajo juramento que los criterios e ideas emitidos en el presente trabajo de investigación titulado: **"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Brucella spp* en GANADERÍAS BOVINAS EN EL CANTÓN GUARANDA"** El trabajo aquí escrito es de mi autoría y por lo tanto soy responsable de las ideas y contenidos expuestos en el mismo y autorizo a la Universidad Estatal de Bolívar a hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de lo que contiene la obra, con fines estrictamente académicos o de investigación expuestos en el mismo. En el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Médico Veterinario, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente. Es todo cuanto puedo declarar en honor a la verdad. Para su celebración y otorgamiento se observaron los preceptos de ley que el caso requiere; y, leída que le fue al compareciente íntegramente por mí la Notaria, aquel se afirma y ratifica en la aceptación de su total contenido y firma junto conmigo en unidad de acto, se incorpora al protocolo de esta Notaria, la presente declaración juramentada, de todo cuanto doy Fe. ---

SR. WILLIAN GABRIEL CONDE CASTILLO.
C.C. 1150030946

DOCTORA MSc. GINA CLAVIJO CARRIÓN
NOTARIA CUARTA DEL CANTÓN GUARANDA

NOTARIA CUARTA DEL CANTÓN GUARANDA

Tesiss_Brucella Willian Gabriel Conde Castillo

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%	2%	0%	1%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	1%
2	wahis2-devt.oie.int Fuente de Internet	1%

Excluir citas	Activo	Excluir coincidencias	< 1%
Excluir bibliografía	Activo		

.....

Dr. Franklin Román Cárdenas

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi padre, Eli Conde Correa, cuyo incondicional apoyo y sacrificio han sido fundamentales en cada etapa de este proceso. Gracias, papá, por estar siempre a mi lado, brindándome tu guía, fuerza y aliento; este logro es tan tuyo como mío.

A mi madre, Hilda Castillo, cuya sabiduría, amor y dedicación me han moldeado en la persona que soy hoy. Mamá, tus enseñanzas y ejemplo me han inspirado a alcanzar nuevas alturas y a nunca rendirme ante las adversidades.

A mis hermanos, Javier y Geovanny, por ser mis pilares y fuente constante de motivación. Su apoyo y hermandad han sido invaluables, y me han inspirado cada día a esforzarme por ser una mejor persona y profesional.

A mi pareja, Gabriela, por su amor, comprensión y paciencia. Tu compañía y apoyo han sido esenciales para superar los momentos difíciles y celebrar cada pequeño triunfo a lo largo de este camino.

A Dios, por ser mi fortaleza y guía, y por darme la valentía y perseverancia necesarias para superar los desafíos y alcanzar mis metas. Sin tu divina providencia, este logro no habría sido posible.

A cada uno de ustedes, mi gratitud eterna, pues han sido el sostén y la inspiración en este camino. Esta tesis es un testimonio de su amor y apoyo inquebrantable.

Willian Gabriel Conde Castillo

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento a todas las personas que me han apoyado en lo largo de este camino, de manera muy especial a:

Al Dr. Franklin Román, por su apoyo, consejos y su invaluable amistad, que han sido fundamentales para mi crecimiento académico y personal.

Al Dr. Favián Bayas, por permitirme utilizar los Laboratorios de Investigación y Vinculación, lo cual fue crucial para el desarrollo de este proyecto.

A todo el personal de los Laboratorios de Investigación y Vinculación por su paciencia y tiempo brindado.

A la Lic. Derly Silva, por su paciencia, amistad y motivación constante que me han impulsado a seguir adelante en los momentos difíciles.

Al Ing. Santiago Santos, por su tiempo, amistad y valiosos consejos que han enriquecido mi formación.

Al Dr. Oswaldo Amangandi y a la Ing. Cristina Velarde, por su valiosa amistad y apoyo en la realización del proyecto.

A la Lic. Mirian Aguay, por su paciencia y ayuda en todo momento en el ámbito administrativo.

Al Dr. Joscelito Solano, por su amistad y apoyo, que hicieron posible la realización del proyecto

Gracias a todos ustedes, por ser parte esencial de este logro sin su apoyo y amistad, este proyecto no habría sido posible.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO		Pág.
CAPÍTULO I		1
1.1	INTRODUCCIÓN	1
1.2	PROBLEMA	2
1.3	OBJETIVOS	3
1.4	HIPÓTESIS	4
CAPITULO II		5
2.	MARCO TEÓRICO	5
2.1	Brucelosis	5
2.1.1	Etiología	5
2.1.2	Taxonomía	6
2.1.3	Clasificación de *Brucella spp*	6
2.2	Propiedades microbiológicas	7
2.2.1	Estructura	7
2.2.2	Estructura genómica	8
2.2.3	Diversidad genómica filogenética	10
2.3	Resistencia y sensibilidad	11
2.4	Trasmisión	12
2.4.1	Factores que determinan la virulencia	12
2.5	Epidemiología	13
2.6	Susceptibilidad	14
2.6.1	Factores relacionados con el huésped	14
2.6.2	Factores ambientales y de manejo	15
2.7	Contagio	16
2.7.1	Presentación	17
2.8	Patogenicidad	17

2.9 Sintomatología y signología 18
2.10 Brucelosis en humanos 20
2.11 Métodos de diagnóstico 20
2.11.1 Aislamiento bacteriológico mediante técnicas de cultivo 20
2.11.2 Prueba de aglutinación lenta en tubo 22
2.11.3 Ensayo de polarización de fluorescencia 22
2.11.4 La prueba del anillo en leche 23
2.11.5 Prueba Rosa de Bengala. 24
2.11.6 La prueba de Fijación del Complemento 24
2.12 La técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 25
2.12.1 Procedimiento de técnica ELISA 26
2.12.2 Tipos de ELISA 27
2.13 Métodos moleculares para el genotipado de especies de *Brucella* 28
2.13.1 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 29
2.13.2 Tipificación por reacción en cadena de la polimerasa multiplex 29
2.14 Tratamiento y control 30
2.14.1 Vacunas 30
2.14.2 Prevención y medidas de bioseguridad 31
CAPITULO III 32
3. MARCO METODOLÓGICO 32
3.1 Ubicación y características la investigación 32
3.2 Metodología 33
3.2.1 Material experimental 33
3.2.2 Factores en estudio 33
3.2.3 Tipo de diseño experimental o estadístico 33
3.2.4 Tipo de análisis 34
3.2.5 Métodos de evaluación y datos a tomarse en cuenta 35

3.2.6 Manejo del experimento 35
CAPITULO IV 38
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 38
4.1 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS 38
4.1.1 Prevalencia serológica 46
4.1.2 Extracción de material genético 47
4.1.3 Prueba Molecular PCR 48
4.1.4 Prevalencia Molecular 49
4.1.5 Análisis Filogenético 51
4.2 COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS. 53
CAPÍTULO V 54
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 54
5.1 CONCLUSIONES 54
5.2 RECOMENDACIONES 55
BIBLIOGRAFÍA 56
ANEXOS 69

ÍNDICE DE TABLAS

N°	Detalle	Pág.
1	Clasificación taxonómica	6
2	Especies de *Brucella* y Biovariedades	7
3	Persistencia de *Brucella abortus* en diversos entornos naturales	12
4	Situación Geográfica del lugar de la investigación.	32
5	Medidas descriptivas de animales muestreados	39
6	Edad de los animales muestreados	40
7	Razas de los animales muestreados	42
8	Signología clínica de los animales muestreados relacionada a *Brucella spp*	43
9	Frecuencia de abortos e infertilidad según la parroquia	45
10	Resultados de la prueba ELISA indireto Vetlis *Brucella*	46
11	Resultados de la prueba iELISA por parroquias	46
12	Resultados de las extracciones ADN - NanoDrop	47
13	Prevalencia de *Brucella* determinada por PCR	49
14	Resultados de la prueba PCR por parroquias	50
15	Comparación de los resultados PCR con la prueba iELISA	50

ÍNDICE DE FIGURAS

N°	Detalle	Pág.
1	Conformación del lipopolisacárido de *Brucella.*	8
2	Filogenia de algunas alfaproteobacterias representativas.	9
3	Relación Filogenética de las especies de *Brucella* clásica y no clásica.	11
4	Placa de ELISA 96 pocillos.	26
5	Funcionamiento de los tipos ELISA	28
6	Puntos de muestreo	38
7	Numero de predios muestreados por parroquia	38
8	Porcentaje de edades en la investigación.	40
9	Sexo de los animales muestreados	41
10	Porcentaje de las razas de los animales muestreados	42
11	Porcentaje de signología clínica	44
12	Porcentaje de signología de los animales muestreados del cantón Guaranda	44
13	Electroforesis en gel de agarosa banda 223pb y bandas 498pb	48
14	Electroforesis en gel de agarosa bandas 223pb	49
15	Ubicación de los casos positivos en el cantón Guaranda	51
16	Árbol de máxima verosimilitud de *Brucellas* encontradas en el cantón Guaranda y cepas de referencia	52

ÍNDICE DE ANEXOS

N°	Detalle
1	Mapa de ubicación de la investigación
2	Croquis del ensayo
3	Resultados de pruebas de laboratorio
4	Secuencias de *Brucella spp* y alineamiento.
5	Base de datos
6	Ficha de recolección de datos
7	Fotografías
8	Glosario de términos técnicos

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se enfoca en la caracterización molecular de *Brucella* en las ganaderías del cantón Guaranda. La brucelosis es una enfermedad zoonótica que afecta a los animales y es causada por bacterias gramnegativas del género *Brucella*, provocando principalmente abortos e infertilidad, lo que conlleva pérdidas económicas significativas. Existe una carencia de información sobre la prevalencia de esta enfermedad en el cantón y sobre la identificación de las diferentes especies y biovares de *Brucella*. Se realizó un muestreo basado en el cálculo muestral finito del número total de hembras bovinas en edad reproductiva del cantón, con un margen de error del 7.3%, seleccionando una muestra por cada 146 hembras bovinas. Se utilizó la prueba iELISA para el diagnóstico serológico en 180 muestras de suero bovino y se confirmó mediante PCR, estableciendo su prevalencia. El secuenciamiento del material genético fue esencial para determinar la identidad de la bacteria en el cantón Guaranda. Los resultados mostraron una prevalencia del 2.8% mediante iELISA y del 3.8% mediante PCR, con una incidencia de 2 nuevos casos en un mismo predio. La parroquia más afectada fue San Lorenzo, con el 1.6% de los casos, mientras que las parroquias Gabriel Ignacio Veintimilla, Guanujo, Salinas y Simiatug presentaron una prevalencia del 0.5% cada una. La PCR y la secuenciación se realizaron en Macrogen, Inc., Seúl, Corea del Sur. Las secuencias obtenidas se limpiaron utilizando Chromas versión 2.6 y se ensamblaron con BioEdit versión 7.2, ingresándose posteriormente en BLAST para identificar la bacteria. Con MEGA versión 11.13, se construyó un árbol filogenético de las relaciones entre las diferentes biovariedades de *Brucella*. Este es el primer estudio en el que se identifica la bacteria mediante secuenciación en el cantón Guaranda.

Palabras Clave: *Brucella*, Caracterización molecular, iELISA, PCR, Zoonosis Secuenciación, Árbol filogenético.

SUMMARY

This research focuses on the molecular characterization of *Brucella* in livestock in the Guaranda canton. Brucellosis is a zoonotic disease affecting animals, caused by gram-negative bacteria of the genus *Brucella*, primarily leading to abortions and infertility, which result in significant economic losses. There is a lack of information on the prevalence of this disease in the canton and the identification of different *Brucella* species and biovars. A sampling was conducted based on a finite sample calculation of the total number of female cattle of reproductive age in the canton, with a 7.3% margin of error, selecting one sample for every 146 female cattle. The iELISA test was used for serological diagnosis in 180 bovine serum samples, confirmed by PCR to establish its prevalence. Genetic sequencing was essential to determine the identity of the bacteria in the Guaranda canton. Results showed a prevalence of 2.8% by iELISA and 3.8% by PCR, with an incidence of 2 new cases on the same farm. The most affected parish was San Lorenzo, with 1.6% of the cases, while the parishes Gabriel Ignacio Veintimilla, Guanujo, Salinas, and Simiatug each had a prevalence of 0.5%. PCR and sequencing were performed at Macrogen, Inc., Seoul, South Korea. The obtained sequences were cleaned using Chromas version 2.6 and assembled with BioEdit version 7.2, and then entered into BLAST for bacterial identification. A phylogenetic tree of the relationships among different *Brucella* biovars was constructed using MEGA version 11.13. This is the first study identifying the bacteria through sequencing in the Guaranda canton.

Keywords: *Brucella*, Molecular characterization, iELISA, PCR, Zoonosis, Sequencing, Phylogenetic tree.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

La ganadería en Guaranda no solo impulsa la economía local, sino que también contribuye al suministro de productos cárnicos y lácteos a nivel regional y nacional. Sin embargo, la presencia de enfermedades, como la brucelosis, puede afectar significativamente la productividad y sostenibilidad del sector ganadero.

La brucelosis es una patología de carácter infectocontagiosa del ganado con notables repercusiones económicas, se ha convertido en un desafío crucial para la ganadería. Causada por diversas bacterias del género *Brucella*, la enfermedad afecta a una amplia variedad de especies animales, el principal es el bovino, y en ocasiones al ser humano por leche no tratada o pasterizada incorrectamente, sus productos derivados o el contacto con secreciones vaginales del aparato reproductor del animal durante el manejo (OIE, 2022).

Esta investigación se enfoca en identificar molecularmente *Brucella* y determinar los diferentes biovariedades circulantes en las ganaderías del Cantón Guaranda. Con una población de 26327 vacas en edad reproductiva, el establecimiento de buenas prácticas en ganadería bovina en este cantón es un componente esencial para la seguridad alimentaria y la economía local (Agrocalidad , 2023). La etiología de la brucelosis, es causada por diferentes especies de *Brucella* como *abortus, melitensis, suis,* etc el rasgo característico es que suele manifestarse con abortos y problemas reproductivos en los animales, generando pérdidas económicas considerables para los productores de ganado (OIE, 2022).

La información recabada no solo contribuye a la comprensión de la zona de distribución de brucelosis, sino que también proporciona datos valiosos para estrategias de control y prevención, asegurando el bienestar del ganado, seguridad alimentaria y la salud pública.

1.2 PROBLEMA

Brucella spp. en ganaderías bovinas del Cantón Guaranda plantea desafíos de magnitud considerable, afectando tanto la salud animal como la pública, con consecuencias económicas significativas a nivel del hato al reducir la producción de leche y sus derivados limitando la comercialización de estos productos. Además, la disminución drástica en la tasa de natalidad, infertilidad y el riesgo asociado para la salud humana, dada la naturaleza zoonótica de la enfermedad, como los costes elevados en tratamientos hospitalización y reposo amplifican la complejidad del problema. La falta de un control y prevención efectivos obliga a la eliminación de los animales infectados, generando consecuencias adicionales en la sostenibilidad de las ganaderías.

La carencia de datos precisos sobre la determinación molecular de *Brucella* y la ausencia de un árbol filogenético limitan nuestra comprensión de la epidemiología de esta bacteria. Identificar la prevalencia de la enfermedad y emplear técnicas moleculares se vuelven esenciales para diseñar estrategias de manejo y control adaptadas a la zona.

El desconocimiento entre los ganaderos propicia la latencia de la infección y su propagación a nuevas áreas, exponiendo a riesgos los hatos y subrayando la necesidad urgente de concientización y medidas preventivas.

1.3 OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar molecularmente *Brucella* en ganaderías bovinas del cantón Guaranda

Objetivos Específicos

- Determinar la prevalencia serológica por medio de la prueba de iELISA.
- Establecer la prevalencia molecular de *Brucella spp.* mediante PCR.
- Secuenciar el material genético amplificado de *Brucella spp.*

1.4 HIPÓTESIS

H1: Existen la prevalencia biovares de *Brucella spp*. circulando en las ganaderías del cantón Guaranda.

H0: No existe la prevalencia biovares de *Brucella spp*. circulando en las ganaderías del cantón Guaranda.

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Brucelosis

En el ganado bovino afecta principalmente a las hembras, en especial a las vacas, mientras que los toros, aunque pueden contagiarse, no suelen ser portadores eficaces de la enfermedad (Anón, 2021). La brucelosis se encuentra en los testículos de los toros, causando inflamación testicular (orquitis) (Corbel et al., 2019). En las hembras, la bacteria se localiza en la ubre, el útero y los ganglios linfáticos cercanos al útero (Doosti & Moshkelani, 2020).

Las vacas infectadas manifiestan síntomas como abortos durante el último tercio de la gestación, retención de la placenta y el nacimiento de terneros débiles (Asfaw Geresu & Mamo Kassa, 2015). Por lo general, las vacas infectadas abortan solo en una ocasión, y los terneros nacidos después pueden ser tanto débiles como sanos y normales (Bocanegra & Leva, 2019).

Es relevante destacar que algunas vacas infectadas no muestran síntomas clínicos evidentes de la enfermedad y dan a luz terneros sin complicaciones. La eliminación masiva del organismo causante de la brucelosis ocurre en la placenta y en los fluidos relacionados con el parto y el aborto (Bocanegra & Leva, 2019).

2.1.1 Etiología

La brucelosis es causada por una bacteria del género *Brucella* incluye una colección de microorganismos intracelulares facultativos que pertenecen al subgrupo de proteobacterias α-2. (Oliveira & Giambartolomei, 2021). Debido a la semejanza en el ADN de las diversas variantes, se ha sugerido clasificarlas bajo una única especie, *B. melitensis.* No obstante, por razones prácticas y epidemiológicas, se mantiene la distinción de los seis tipos principales (Thrusfield, 2018).

Dentro de las especies reconocidas, se mencionan *Brucella abortus, B. melitensis y B. ovis.* Estos microorganismos se caracterizan por ser cocobacilos gramnegativos de tamaño pequeño, carecen de movilidad, son aerobios estrictos y no poseen cápsula. No exhiben capacidad de esporulación y tienen un metabolismo limitado (Romero et al., 2020). Son estrictamente intracelulares y no logran reproducirse fuera de sus hospedadores (Oliveira & Giambartolomei, 2021).

2.1.2 Taxonomía

Tabla 1

Clasificación taxonómica

Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Alphaproteobacteria
Orden:	Rhizobiales
Familia:	Brucellaceae
Género:	*Brucella*

Nota: Tomado de (NCBI, 2024).

2.1.3 Clasificación de *Brucella spp*

Se reconocen hasta 12 especies diferentes, algunas de las cuales presentan biovariedades con distintas características culturales, bioquímicas y ecológicas. En el contexto de los rumiantes, *Brucella melitensis, B. abortus y B. ovis* destacan como las especies más relevantes (Bocanegra & Leva, 2019).

Tabla 2

Especies de Brucella y Biovariedades

Especie	Biovares	Principales Hospedadores	Capacidad Zoonótica
Brucella abortus	Biovariedades 1, 2, 3, 4, 5,7 y 9	Ganado vacuno	Sí
Brucella melitensis	Biovariedades 1, 2, 3	Ovejas, cabras	Sí
Brucella suis	Biovariedades 1, 2, 3, 4	Cerdos	Sí
Brucella canis	Biovariedad 1	Perros	Sí
Brucella ovis	Biovariedades 1, 2	Ovejas	Sí
Brucella neotomae	Biovariedad 1	Roedores	Sí

Nota: Tomado de (Bocanegra & Leva, 2019).

2.2 Propiedades microbiológicas

Brucella son bacterias gramnegativas inmóviles, visibles al microscopio óptico como bastones cortos o cocobacterias con un diámetro de 0,5 a 0,7 µm y una longitud de 0,5 a 1,5 µm (Muñoz et al., 2019).

La temperatura óptima de crecimiento es 37°C y el pH preferido está entre 6,6 y 7,4. Es de naturaleza completamente aeróbica y utiliza un sistema de transporte de electrones basado en citocromo que utiliza oxígeno o nitrato como aceptor final de electrones (Thrusfield, 2018). Las bacterias son catalasas positivas y, aunque se consideran organismos exigentes debido a los requisitos de cultivo, pueden crecer en ambientes con bajos nutrientes (Asfaw Geresu y Mamo Kassa, 2015).

2.2.1 Estructura

- **Lipopolisacárido (LPS)**

La membrana externa de *Brucella* tiene un rasgo característico compartido con otras bacterias Gram-negativas (Cardoso et al., 2021). El LPS, también conocido como endotoxina, juega un papel importante en la virulencia de *Brucella* y la respuesta

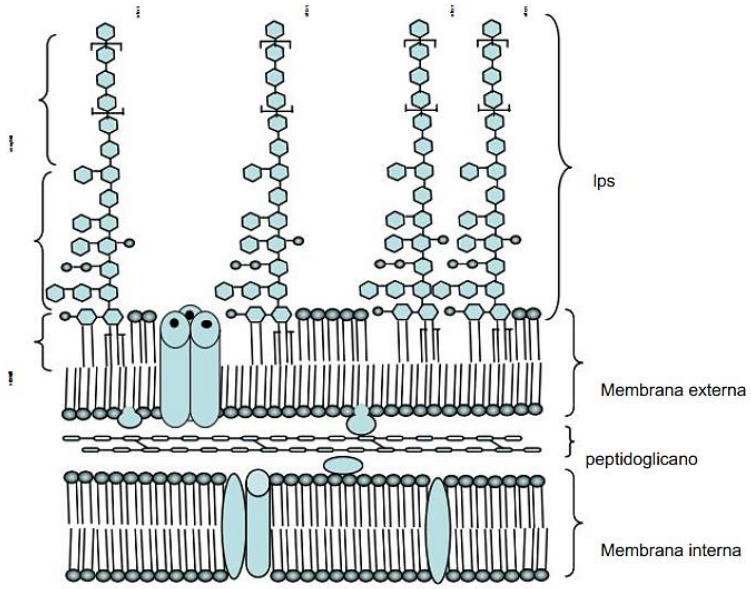
inmune del huésped (Figueiredo et al., 2015). Actúa como un elemento clave en la interacción entre la bacteria y las células del sistema inmunológico, desencadenando respuestas específicas (Oliveira & Giambartolomei, 2021).

- **Membrana interna**

La membrana interna de *Brucella* exhibe una bicapa lipídica, una estructura común en las bacterias Gram negativas. Esta bicapa lipídica es importante para las funciones celulares básicas, ya que transporta sustancias seleccionadas a través de la membrana y regula el flujo de iones (Ndazigaruye et al., 2018).

Figura 1

Conformación del lipopolisacárido de Brucella.



Nota: Tomado de (Suárez & Esquivel et al., 2020).

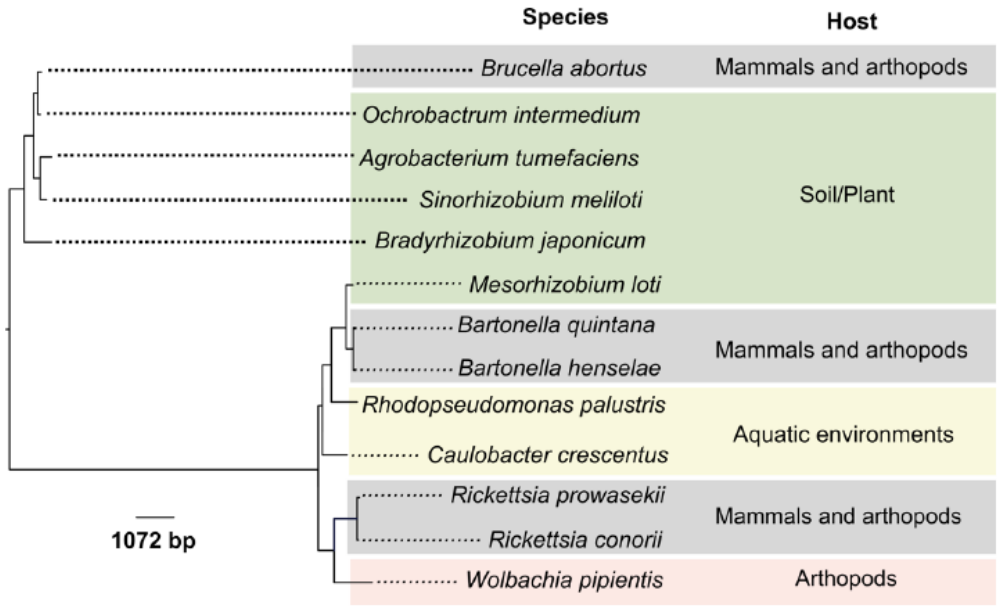
2.2.2 Estructura genómica

La brucelosis, tiene un genoma conservado de alrededor de 3.3 Mb (Megabases) dividido en dos cromosomas circulares (Suárez-Esquivel et al., 2020). Su genoma muestra estabilidad, con un alto contenido de guanosina y citosina, y carece de plásmidos, transferencia horizontal de ADN y eventos recientes de recombinación (Duvnjak et al., 2017).

Sin embargo, las distintas especies/cepas de *Brucella* comparten una alta homología genética (~97%), presentan diversas preferencias de hospedadores, virulencia y potencial zoonótico. Este hecho destaca la importancia de entender la relación entre la diversidad genómica y las preferencias de hospedadores (Banai & Corbel, 2022).

Figura 2

Filogenia de algunas alfaproteobacterias representativas.



Nota: Tomado de (Suárez Esquivel et al., 2020).

El macroevolucionismo del genoma de *Brucella* involucra la pérdida de genes. Su ancestro común, que evolucionó hace unos 500 millones de años, se adaptó primero a una vida intracelular en vertebrados de sangre fría y luego a mamíferos (Barquero-Calvo et al., 2017) Filogenéticamente, *Brucella* está estrechamente relacionada con *Ochrobactrum*, bacterias del suelo (Ancora et al., 2014). La interacción cercana con las células hospederas a lo largo de millones de años dio forma al genoma de *Brucella*, imponiendo cuellos de botella en el flujo génico y favoreciendo la reducción y simplificación génica (Garofolo et al., 2017).

La adquisición de características a través de la reorganización de elementos genéticos móviles contribuyó a la diversidad intraespecífica de *Brucella*, las islas genómicas y regiones anómalas compartidas contienen genes esenciales para la

virulencia y la vida intracelular (Muñoz et al., 2019). La comparación con *Ochrobactrum* revela que el genoma de *Brucella* es más pequeño y estable, sin plásmidos y sin evidencia de transferencia horizontal reciente de ADN (Barquero-Calvo et al., 2017).

2.2.3 Diversidad genómica filogenética

La aplicación de la secuenciación completa del genoma (WGS) ha permitido dividir el género *Brucella* en dos categorías filogenéticas distintas: las especies "clásicas", que comparten más del 99% de similitud de ADN con la referencia *B. melitensis* 16M, y las especies "no clásicas", que tienen aproximadamente un 97% de similitud de ADN (Banai & Corbel, 2022).

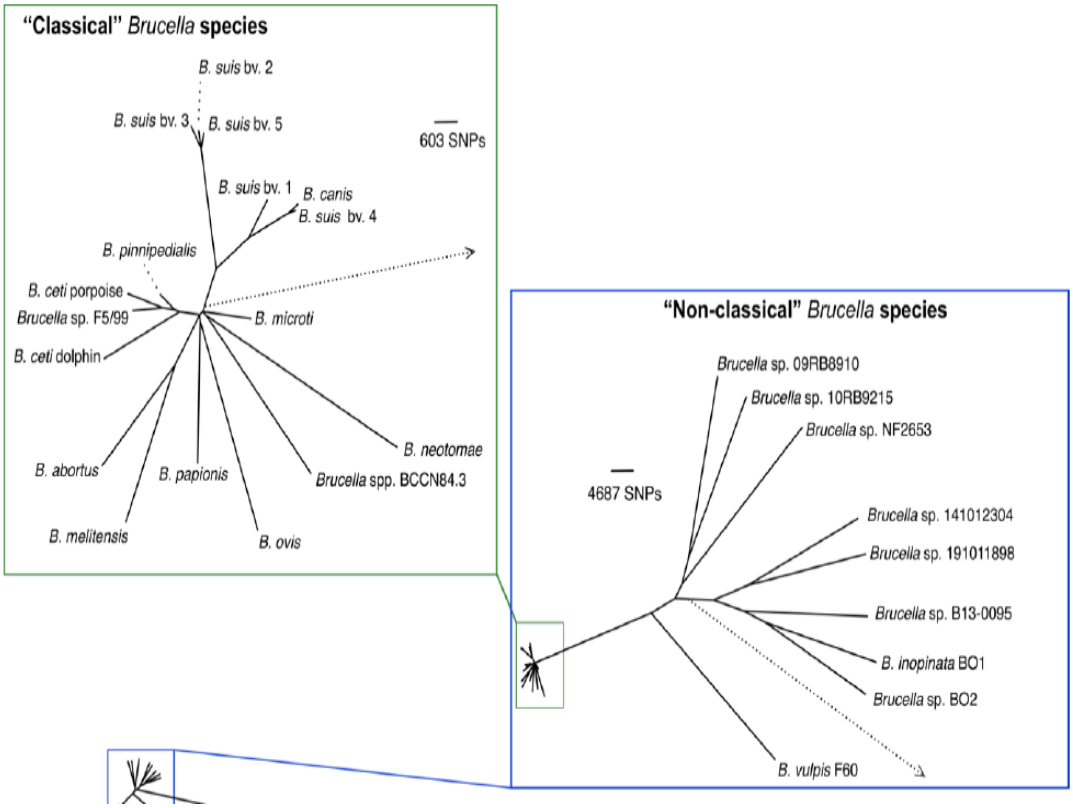
Mientras que las especies clásicas son homogéneas y limitadas a mamíferos, las no clásicas son más diversas, incluyendo cepas encontradas en vertebrados como anfibios, peces y camaleones (Williams et al., 2017). Las especies no clásicas se caracterizan por una mayor flexibilidad genética, movilidad, crecimiento rápido y resistencia a condiciones ambientales adversas (Moreno, 2014).

Aunque se dispone de cientos de genomas de *Brucella* mediante WGS, aún no son suficientes para comprender completamente las bases de la restricción de hospederos y la virulencia diferencial (Whatmore, 2019). Por ejemplo, entre las *Brucellas* clásicas, *B. canis* comparte una relación filogenética más cercana con *B. suis* biovar 4 que con *B. abortus* o *B. melitensis,* a pesar de diferencias significativas en las preferencias de hospederos y la virulencia (Bohlin et al., 2010).

La variación en el número de polimorfismos de nucleótido único (SNP) entre genomas de *Brucella* revela la importancia de una mayor comprensión de los determinantes genéticos de la especificidad del hospedero y la virulencia. Comparaciones con otras bacterias, como *Salmonella,* resaltan la complejidad de estas interacciones genómicas en relación con las preferencias de hospederos y la patogenicidad (Tsolis, 2017).

Figura 3

Relación Filogenética de las especies de Brucella clásica y no clásica.



Nota: Tomado de (Banai & Corbel, 2022).

2.3 Resistencia y sensibilidad

Las bacterias *Brucella* son capaces de sobrevivir en ambientes al aire libre, incluso sin formar esporas, este tipo de capacidad es especialmente notable en ambientes acuáticos y semiacuáticos, donde pueden persistir durante periodos prologados de tiempo (Figueiredo et al., 2015). Las *Brucella* también pueden resistir agentes químicos, pero esta capacidad depende de factores como la temperatura, la humedad y la presencia de materia orgánica (Ndazigaruye et al., 2018).

Tabla 3

Persistencia de Brucella abortus en diversos entornos naturales

Entorno	Temperatura/Condiciones Ambiente	Viabilidad
Agua desecho orgánico	37°C	Menos de 24 horas
Agua desecho orgánico	8°C	Más de 57 días
Suelo	humedad que es del 90%	48-73 días
Desecho orgánico	Verano	<24 horas
Desecho orgánico	Invierno	53 días
Orina	Verano	108 días
Orina	Invierno	174 días
Pastos	Variable	Entre 1 y 2 meses

Nota: Tomado de (Bocanegra & Leva, 2019).

2.4 Trasmisión

Esto ocurre cuando el ganado consume forrajes contaminados o entra en contacto con fetos de animales infectados que han abortado. (Foster et al., 2020). Fuera del cuerpo del animal, la placenta y los fetos abortados, la bacteria *Brucella* se inactiva fácilmente con la luz solar, las altas temperaturas y la desecación (Fretin et al., 2016). No obstante, controlar la bacteria *Brucella* dentro del organismo del animal resulta difícil. Actualmente, no existe una solución económica para tratar a un animal infectado con brucelosis (Dadar et al., 2019).

2.4.1 Factores que determinan la virulencia

Las diversas especies, biovariedades o cepas presentan distintos perfiles de virulencia la bacteria *Brucella* es capaz de infectar a otros organismos gracias a su lipopolisacárido “LPS”, que se encuentra en su membrana externa. Este LPS se compone de tres componentes principales:

- El lípido A (LA), de naturaleza glicolipídica, que forma parte integral de la membrana externa.

- Un núcleo oligosacarídico (OC) o corazón, unido al LA, que consta de una molécula de ácido 3-desoximanooctulosónico vinculada a manosa y glucosa.
- La cadena O (OPS), de naturaleza polisacarídica, que consiste en perosamina (Georgios et al., 2023).

En las cepas lisas, la molécula de glucosa del OC se une a una de quinovosamina (didesoxiglucosa), que sirve como enlace con la OPS. Por otro lado, en las cepas rugosas, la OPS está ausente (Glynn y Lynn, 2024). Esta distinción tiene relevancia en diagnóstico, ya que la OPS constituye el antígeno inmunodominante en la superficie de *Brucella*, generando anticuerpos específicos valiosos para las pruebas serológicas. En general, las especies de *Brucella* tienen una superficie lisa, pero *B. ovis* y *B. canis* exhiben una morfología rugosa (Ndazigaruye et al., 2018).

2.5 Epidemiología

La distribución de la brucelosis en las Américas, a tanto a especies domésticas como silvestres. En América del Sur, prácticamente todos los países informan casos, especialmente en animales domésticos, mientras que en Asia y Europa la enfermedad no ha sido reportada (OIE, 2016).

El enfoque central se centra en la Brucelosis causada por *Brucella abortus.* Entre 2006 y 2015, se registraron a nivel mundial 924,126 casos de brucelosis bovina. América encabeza la lista con el 61% (561,990 casos), seguida por Europa con el 21% (190,124 casos). El número de brotes aumentó a 145,499 en este período. Se observan casos en África y Asia, y en Europa, países como España, Reino Unido y Rusia destacan en los informes (OIE, 2016).

La brucelosis por *Brucella melitensis* también se examina, afectando diversas especies en África, Asia, América y Europa. Europa lidera con el 69% (614,266 casos) entre 2006 y 2015. La OIE registra 931,913 casos, con mayor incidencia en

ovejas y cabras. El año 2006 destaca con el 23% de los casos, mientras que 2013 presenta el menor porcentaje (4%) (OIE, 2016).

En cuanto a la brucelosis por *Brucella suis*, se informan casos en África, Asia, América y Europa, especialmente en cerdos. Europa destaca con 4,692 casos entre 2006 y 2007, representando el 87.1% de los casos. En las Américas, Bolivia, Cuba y Uruguay informan la presencia de la enfermedad (OIE, 2016).

Para Ecuador, se proporciona un análisis específico, detallando la incidencia de la brucelosis por *Brucella abortus* por provincia. Pichincha lidera en brotes (544), seguida de Carchi (180) y Manabí (104) entre 2006 y 2015. En términos de casos, Pichincha reporta el mayor número (2,207), seguida de Carchi (993), Cotopaxi (585) y Manabí (588) en el mismo periodo, totalizando 6,916 casos entre 2005 y 2015 en el país (Román Cárdenas et al., 2020).

2.6 Susceptibilidad

Las especies que pueden verse afectadas por esta infección comprenden tanto domésticos como salvajes. Los animales de sangre caliente, como los rumiantes, los suidos y los équidos, son especialmente susceptibles a la infección, los seres humanos también pueden contraer la enfermedad, pero es menos común (Bocanegra & Leva, 2019).

2.6.1 Factores relacionados con el huésped

Los reservorios de *Brucella* son los animales en los que la bacteria puede sobrevivir y multiplicarse de forma natural. Estos animales son la fuente principal de infección para otros animales y para los seres humanos (Gwida et al., 2010).

- **Reservorios principales:** Son los bovinos, los ovinos, los caprinos y los porcinos en estos animales. La infección puede ser aguda o crónica, y puede

causar abortos, infertilidad entre otras complicaciones graves (Haileselassie, 2022).

- **Reservorios secundarios**: son los animales que pueden contraer la infección, pero en los que la enfermedad suele ser autolimitante. Estos animales pueden desempeñar un papel importante en la transmisión de la enfermedad, pero no son tan importantes como los reservorios principales (Halling et al., 2020).
- **Reservorios accidentales:** son los animales que contraen la infección de forma accidental. Estos animales suelen ser susceptibles a la enfermedad, pero no suelen transmitirla a otros animales o a los seres humanos (Gwida et al., 2010).

2.6.2 Factores ambientales y de manejo

La brucelosis es una enfermedad que puede producirse en cualquier momento del año, pero es más común durante los períodos de parto. Se propaga a través del contacto entre animales, especialmente a través de prácticas ganaderas que ponen a los animales en contacto estrecho, como la intensificación de la producción, el intercambio de sementales y la adquisición de animales sin evaluación previa (Halling et al., 2020).

Para prevenir la propagación de la brucelosis, es importante tomar medidas para evitar estas prácticas ganaderas y realizar pruebas de brucelosis a los animales antes de introducirlos en una nueva explotación (Godfroid et al., 2010).

El entorno, las condiciones climáticas y la topografía afectan la flora y fauna, teniendo una influencia indirecta en la presencia de la enfermedad en una determinada área (Figueiredo et al., 2015).

2.7 Contagio

Tiene su origen en animales infectados que tienen la capacidad de excretar una cantidad significativa de bacterias. (Hilemlekot, 2021) La principal fuente de contagio se encuentra en el material del útero durante el periodo grávido, incluyendo el feto, la placenta y los anejos fetales, después de los eventos de parto o aborto, con una duración aproximada de tres semanas en bovinos y varios meses en caprinos (Ibrahim et al., 2010).

Además, se destaca la importancia del calostro, la leche (específicamente relevante en cabras, ya que funciona como un eliminador continuo, a diferencia de las vacas donde es intermitente) (Jegerfa, 2016).

El contagio puede manifestarse de tres maneras:

- **Vertical:** De la madre al feto, ya sea por medio de la placenta o mediante el parto por el canal pélvico (Kangethe et al., 2017).
- **Horizontal:** Directo: Mediante vías como la oral (a través de la ingestión de leche de madres infectadas, lamidos, o autolimpieza), venérea y cutánea (a través de heridas), principalmente (Kato et al., 2017).
- **Indirecto:** A través de vías como la oral (mediante la ingestión, contacto con pasto o agua), respiratoria (inhalación de polvo), iatrogénica (por el uso de equipos de inseminación artificial) o conjuntival (a través de polvo o vectores como las moscas) (Kebede et al., 2018).

En humanos, la transmisión suele ocurrir desde los animales (zoonosis pura), sin evidencia de contagio de persona a persona. Este tipo de transmisión generalmente se produce por el contacto con animales que tengan la enfermedad o el consumo de productos lácteos que no han sido sometidos a un proceso de pasteurización adecuado., contaminación ambiental de hortalizas o verduras fertilizadas con estiércol, inhalación, exposición en laboratorio o por inoculación accidental mediante vacunas (Lilenbaum et al., 2016).

La enfermedad afecta a diversas ocupaciones, incluyendo ganaderos, veterinarios, matarifes, inspectores de mataderos, personal de laboratorio y cazadores (Khan et al., 2014).La introducción de la enfermedad en una explotación suele ocurrir debido a la incorporación de animales infectados sin previa evaluación o a través de fauna silvestre que porta la infección (Bocanegra & Leva, 2019).

2.7.1 Presentación

La brucelosis manifiesta una incidencia notable de abortos durante el primer año. En el segundo año, se observa una reducción en la frecuencia de abortos, pero surgen problemas comunes relacionados con la infertilidad, dando lugar a crías débiles y prematuras, así como a retenciones de placenta (Lilenbaum et al., 2016). A partir del tercer año, los abortos son poco comunes, ocurriendo solo en hembras que experimentan su primer parto o en animales recién incorporados a la explotación. En cambio, se registran numerosos procesos crónicos, como artritis, bursitis y orquitis (Lucero et al., 2023).

2.8 Patogenicidad

- **Fase Aguda**

Después de la primoinfección, las *Brucellas* ingresan a las mucosas y son transportadas hacia los ganglios linfáticos, donde experimentan multiplicación. A partir de aquí, se propagan ya sea a través de la vía linfática en bovinos y ovinos, o por la vía sanguínea en caprinos y humanos (la presencia de *Brucellas* en la sangre provoca un estado febril, característico en estas especies) (Oliveira & Giambartolomei, 2021).

Posteriormente, las *Brucellas* se localizan y multiplican en tejidos del sistema fagocítico mononuclear, como el hígado, bazo, linfa, médula ósea y riñones (Maichomo et al., 2020). En el caso específico de la placenta, también se reproducen, ya que esta produce progesterona y eritritol, elementos que ejercen una fuerte atracción quimiotáctica para *Brucella*. Este fenómeno provoca un proceso

septicémico en el feto, conduciendo a su muerte y, como consecuencia, al aborto (Jiang et al., 2020).

- **Fase crónica**

Esta etapa está vinculada a un estado de resistencia específica del huésped, relacionado con el desarrollo de la inmunidad (Bocanegra & Leva, 2019). Esto puede dar lugar a la curación del individuo o, más comúnmente, a la persistencia de la infección a lo largo de toda la vida del animal (Jiang et al., 2020). Esta capacidad se debe a la habilidad de *Brucella* para permanecer en un estado de latencia en los ganglios linfáticos (macrófagos) y en áreas de bajo catabolismo, como articulaciones, vainas tendinosas y sinoviales (Bocanegra & Leva, 2019).

En situaciones que generan inmunosupresión, como el estrés o la gestación, la infección puede reactivarse, dando lugar a recidivas y la activación de la patología crónica (Mantur et al., 2020). Durante la gestación, el patógeno se multiplica en el espacio uterocorial, ocasionando abortos debido a una placentitis exudativa que evoluciona hacia áreas extensas de necrosis placentaria. Esto provoca una hipoxia y una nutrición deficiente para el feto, que puede morir en el último tercio de la gestación debido a sus crecientes demandas o llegar a término con una viabilidad muy limitada (Rivas-Solano, 2015).

La presencia de *Brucella* en bolsas sinoviales, tendones y articulaciones generalmente se asocia con manifestaciones clínicas crónicas (Mantur et al., 2016).

2.9 Sintomatología y signología

En el caso de bovinos, se observan indicios inespecíficos caracterizados por una septicemia inicial leve, manifestada a través de una leve febrícula, pérdida de apetito, apatía y ocasional erizamiento del pelaje (Bocanegra & Leva, 2019).

Si la infección ocurre durante la gestación (forma aguda), puede resultar en abortos en cualquier fase de la gestación, sin evidentes alteraciones en el feto ni retención de secundinas, el flujo vaginal puede tener características como serosidad, turbidez u ocre-amarillento. Las lesiones en la placenta y los fetos pueden ser poco específicas, pero pueden incluir necrosis en los cotiledones, edema en las zonas intercotiledonarias, y edema en los fetos con contenido serohemorrágico (Luo et al., 2019).

- **Abortos:** Esta enfermedad destaca como la principal causa de pérdida de crías, manifestándose comúnmente en la segunda mitad de la gestación, aunque no está limitada a un periodo específico. Las crías nacidas de vacas afectadas tienen mayor riesgo de ser débiles o prematuras, lo que aumenta la probabilidad de perecer en las primeras horas o días de vida (Bocanegra & Leva, 2019).
- **Retención placentaria:** Se refiere a la incapacidad de la vaca para expulsar la placenta después del parto, una condición desencadenada por la brucelosis. Además de complicaciones inmediatas, puede resultar en infecciones y problemas de fertilidad a largo plazo (Luo et al., 2019).
- **Mamitis**: Provocando inflamación en la glándula mamaria, conocida como mamitis, esta enfermedad puede resultar en la producción de leche de calidad inferior o la pérdida de producción láctea (Bocanegra & Leva, 2019).
- **Artritis y Bursitis:** La brucelosis puede causar inflamación en las articulaciones, bolsas sinoviales manifestada como artritis y bursitis, generando dolor y dificultades para caminar (Luo et al., 2019).
- **Orquitis y epididimitis:** Esta enfermedad puede desencadenar inflamación en el testículo (orquitis) y en el epidídimo, el conducto que transporta los espermatozoides desde el testículo (epididimitis). Estas inflamaciones, además de ser dolorosas, pueden conducir a problemas de fertilidad en el ganado afectado (Bocanegra & Leva, 2019).

2.10 Brucelosis en humanos

Los signos y síntomas de la brucelosis en humanos pueden variar, pero suelen incluir fiebre, sudoración profusa, cansancio, debilidad, pérdida de peso, alteraciones del estado de ánimo, y problemas en el aparato digestivo, el sistema músculo-esquelético y el sistema nervioso (Dahouk et al., 2015).

La fiebre se destaca como el signo clínico más común de la brucelosis, siendo generalmente alta y con un patrón ondulante, caracterizado por aumentos y disminuciones a lo largo de varios días. La sudoración profusa, que tiende a ocurrir durante la noche y puede ser tan abundante que llega a mojar la ropa de cama, constituye otro indicador característico (Zhang et al., 2023).

El cansancio y la debilidad también son síntomas frecuentes, afectando de manera contundente la capacidad de las personas con brucelosis para llevar a cabo actividades cotidianas. La pérdida de peso rápida, incluso manteniendo una dieta normal, es otro rasgo común de la enfermedad. En el ámbito digestivo, la brucelosis puede manifestarse con pérdida de apetito, náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea (Dahouk et al., 2015). En el sistema músculo-esquelético, la brucelosis puede generar dolor muscular y articular, mientras que, en el sistema nervioso, los afectados pueden experimentar cefalea, depresión y ansiedad (Zhang et al., 2023).

2.11 Métodos de diagnóstico

2.11.1 Aislamiento bacteriológico mediante técnicas de cultivo

El aislamiento del microorganismo es el método de diagnóstico estándar de oro para la brucelosis, ya que es específico y permite identificar la especie de *Brucella* aislada, lo cual es importante desde el punto de vista epidemiológico. Sin embargo, el cultivo de *Brucella spp.* es un procedimiento desafiante, ya que se trata de una bacteria que requiere medios ricos en nutrientes y un almacenamiento adecuado de las muestras clínicas (Jones et al., 2023).

Otro factor que dificulta el cultivo de *Brucella spp.* es la contaminación de las muestras clínicas. Para inhibir el crecimiento de contaminantes, se utilizan medios enriquecidos con antibióticos. Además, el procedimiento debe realizarse en laboratorios de bioseguridad de nivel 3, ya que *Brucella spp.* es un organismo zoonótico que puede causar infecciones graves en humanos (Chaves-Olarte et al., 2023).

Las muestras clínicas más adecuadas para el aislamiento de *Brucella spp*. en el ganado bovino son los fetos, las membranas fetales, los órganos fetales, la leche, las secreciones vaginales y el semen. En los mataderos, las muestras de elección son las mamarias, las ilíacas, los ganglios linfáticos faríngeos, las parótidas y cervicales, y el bazo (Ishihara et al., 2023).

Las colonias de *Brucella spp.* son elevadas, transparentes, convexas, con bordes intactos, superficie lisa y brillante. Tienen un color miel bajo luz transmitida. La temperatura ideal para el cultivo es de 37 °C, pero el organismo puede crecer a temperaturas entre 20 °C y 40 °C. Algunas especies de *Brucella* requieren CO2 para crecer. Las colonias típicas aparecen después de 2 a 30 días de incubación (Chaves-Olarte et al., 2023).

En general, los medios sólidos como el agar dextrosa, el agar triptosa y el agar tripticasa de soja se recomiendan para el aislamiento primario de *Brucella*. Sin embargo, algunas especies, como *B. ovis* y *B. canis*, requieren la adición de suero bovino o equino estéril a los medios de cultivo. En el caso de sangre o leche, los medios bifásicos como el medio de Castañeda pueden mejorar la sensibilidad (Ishihara et al., 2023).

- **Datos a tomarse en cuenta**

El diagnóstico de la brucelosis es complejo y no existe una prueba única que sea capaz de identificar todos los casos de la enfermedad. Por esta razón, los programas de control y erradicación de la brucelosis se basan en el diagnóstico a nivel de hato.

El diagnóstico individual de la brucelosis se realiza mediante pruebas serológicas, que detectan la presencia de anticuerpos contra la bacteria *Brucella.* Sin embargo, estas pruebas pueden dar resultados falsos negativos, especialmente en las primeras etapas de la infección o en los casos crónicos. Para mejorar la sensibilidad del diagnóstico, es importante emplear varios criterios en conjunto (Bocanegra & Leva, 2019).

2.11.2 Prueba de aglutinación lenta en tubo

Es conocida como una técnica de Wright y Smith, identifica anticuerpos en las fases iniciales, pero enfrenta desafíos en la detección de la brucelosis crónica. Además, provoca aglutinaciones no específicas en animales no infectados (Abdoel et al., 2018). En el caso de los rumiantes, se diluye con solución salina al 5% para evitar el fenómeno de zona (debido a problemas en la proporción antígeno/anticuerpo) o la presencia de anticuerpos bloqueantes incompletos. Debido a estas limitaciones, su uso es menos frecuente. Se considera positivo cualquier título por encima de 1/80 (equivalente a > 80 UI) (Ishihara et al., 2023).

Los antígenos que se diluyen excesivamente muestran una alta sensibilidad y suelen producir resultados falsamente positivos, en cambio cuando antígeno con una concentración elevada tiene el efecto de falsos negativos (Celik et al., 2023).

2.11.3 Ensayo de polarización de fluorescencia

El ensayo de polarización de fluorescencia (FPA) es una prueba serológica que detecta la presencia de anticuerpos contra la bacteria *Brucella.* La prueba se basa en la rotación de una molécula marcada con fluorescencia cuando se une a un anticuerpo (Nielsen et al., 2014). La prueba FPA es una alternativa a las pruebas serológicas convencionales, como la prueba de aglutinación en tubo (RA) y la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). La FPA tiene una mayor sensibilidad y especificidad que estas pruebas, lo que la convierte en una opción más fiable para el diagnóstico de la brucelosis (Bocanegra & Leva, 2019).

En el caso de la brucelosis confirmada por cultivo, la sensibilidad de la FPA es del 96% y la especificidad es del 98%. La prueba también se ha utilizado para el diagnóstico de la brucelosis en animales, con una sensibilidad y especificidad similares a las observadas en humanos. La FPA se puede realizar en condiciones de campo, lo que la convierte en una opción viable para el diagnóstico de la brucelosis en zonas rurales o remotas (Nielsen et al., 2014).

2.11.4 La prueba del anillo en leche

Es una prueba que se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos contra la brucelosis en la leche de animales, especialmente bovinos (Lucero et al., 2023). La prueba se basa en la reacción de los anticuerpos presentes en la leche con un antígeno preparado a partir de cultivos puros de *Brucella abortus* (Bocanegra & Leva, 2019).

Se realiza mezclando la leche con un antígeno específico para la brucelosis. Si la leche contiene anticuerpos contra la brucelosis, estos se unirán al antígeno y formarán un complejo (Naik et al., 2017). Este complejo se depositará en la superficie de la leche, formando un anillo azul gracias a su colorante que generalmente suele ser hematoxilina, si la leche no contiene anticuerpos, no se formará el anillo es una prueba rápida y económica, pero su sensibilidad es limitada. Esto significa que puede dar resultados negativos falsos en animales infectados, para mejorar la sensibilidad de la prueba se recomienda mezclar la leche de varios animales antes de realizarla (Lucero et al., 2023).

El porcentaje de grasa en la leche también puede afectar los resultados de la prueba, las muestras con un alto contenido de grasa pueden dificultar la formación del anillo azul, lo que puede dar lugar a resultados falsos negativos es una herramienta útil para la detección de la brucelosis en rebaños bovinos (Naik et al., 2017). Sin embargo, es importante tener en cuenta sus limitaciones y realizarla de manera adecuada para obtener resultados confiables (Christopher et al., 2010).

2.11.5 Prueba Rosa de Bengala.

Es una prueba diagnóstica utilizada para detectar la presencia de anticuerpos contra la bacteria *Brucella abortus*, que causa la brucelosis. La prueba es sencilla de realizar y requiere poco equipo, lo que la hace ideal para su uso en laboratorios con recursos limitados (Banai et al., 2018). Se basa en la aglutinación de las partículas de bacteria teñidas con rosa de bengala por los anticuerpos presentes en el suero del paciente. Si se produce aglutinación, significa que el suero contiene anticuerpos contra *Brucella abortus* y, por lo tanto, el paciente puede estar infectado por la bacteria (Massis et al., 2015).

Tiene una sensibilidad general del 92,9%, lo que significa que es capaz de detectar la infección en la mayoría de los casos. Sin embargo, la especificidad de la prueba es relativamente baja, lo que significa que puede dar resultados falsos positivos. Esto es especialmente cierto en áreas endémicas de brucelosis, donde muchas personas pueden tener anticuerpos contra la bacteria sin estar realmente infectadas (Khan et al., 2017).

Para aumentar la especificidad de la prueba, se puede realizar en una serie de diluciones. Esto ayuda a reducir la probabilidad de que los anticuerpos presentes en el suero se unan a los antígenos de la bacteria de forma no específica (Banai et al., 2018). La RBT es una prueba importante para el diagnóstico de la brucelosis, pero debe utilizarse con precaución. En áreas endémicas, los resultados positivos deben confirmarse mediante otras pruebas de mayor especificidad. (Massis et al., 2015).

2.11.6 La prueba de Fijación del Complemento

Es una prueba inmunológica que se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos contra la brucelosis en el suero de animales se basa en la capacidad del complemento, un grupo de proteínas presentes en el plasma sanguíneo, para unirse a los complejos antígeno-anticuerpo (Nielsen et al., 2014).

Se realiza mezclando el suero del animal con un antígeno específico para la brucelosis. Si el suero contiene anticuerpos contra la brucelosis, estos se unirán al antígeno y formarán un complejo. Este complejo fijará el complemento, lo que impedirá que este lyse los glóbulos rojos del animal que se añaden posteriormente a la mezcla. Si el suero no contiene anticuerpos, el complemento no se fijará y los eritrocitos se lisarán, dando lugar a un color rojo (OIE, 2016).

Es altamente precisa, con una sensibilidad y especificidad que oscila entre el 77 y el 100%. Esto significa que la prueba es muy eficaz para detectar la presencia de anticuerpos contra la brucelosis, tanto en animales infectados como en animales vacunados. La prueba puede verse afectada por la presencia de suero hemolizado, sueros con actividad anticomplemento o fenómenos prozona (Nielsen et al., 2014).

2.12 La técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) ha ganado popularidad como método estándar para el diagnóstico serológico de la brucelosis. Este ensayo evalúa los anticuerpos IgG, IgA e IgM, permitiendo una mejor comprensión de la situación clínica. El diagnóstico de la brucelosis se fundamenta en la detección de anticuerpos contra el LPS liso (Mantur et al., 2021).

La detección de anticuerpos IgG muestra mayor sensibilidad que la detección de IgM para diagnosticar casos de brucelosis, aunque la especificidad es comparable. En comparación con métodos de aglutinación convencionales, el ELISA demuestra mayor sensibilidad en casos agudos y crónicos de brucelosis, ofreciendo una ventaja diagnóstica en zonas endémicas (Romero et al., 2020).

Para una detección y diagnóstico precisos de casos sospechosos, se sugiere la combinación de pruebas ELISA IgM e IgG, ya que esta combinación ha demostrado ser la técnica más efectiva. Para el seguimiento y monitoreo del pronóstico, se utilizan ELISA IgM y 2-mercaptoetanol (2-MET), que presentan resultados más prometedores (Naik et al., 2017).

El ELISA destaca como un método excelente para detectar anticuerpos contra *Brucella* en poblaciones extensas y diferenciar entre fases aguda y crónica de la enfermedad. Es la prueba preferida para casos complejos, locales o crónicos, especialmente cuando otras pruebas son negativas, pero existe una alta sospecha clínica. Puede identificar inmunoglobulinas específicas totales e individuales (IgG, IgA e IgM) en 4-6 horas, con alta sensibilidad y especificidad. Además, puede detectar subclases específicas de IgG de *Brucella* y otras inmunoglobulinas, como la IgE (McGiven et al., 2013).

2.12.1 Procedimiento de técnica ELISA

El tapizado es un proceso esencial que consiste en la adsorción o fijación de los anticuerpos o antígenos a una superficie sólida, conocida como fase sólida la fase sólida suele ser una placa de poliestireno, comúnmente de 96 pocillos con fondo plano (Peeridogaheh et al., 2013). Se realiza siguiendo los siguientes pasos:

Adsorción: El anticuerpo o antígeno se diluye en un buffer de tapizado y se añade a los pocillos de la placa el anticuerpo o antígeno se adhiere a la superficie de los pocillos mediante enlaces covalentes o no covalentes (Sathyanarayan , 2011).

Lavado: Los pocillos se lavan con un buffer de lavado para descartar los reactivos que no se hayan adherido a la fase sólida (Mantur et al., 2021).

Figura 4

Placa de ELISA 96 pocillos.



Nota: Tomado de (Peeridogaheh et al., 2013).

Después del tapizado, se procede a añadir la muestra problema. La muestra problema puede ser un antígeno vírico si la placa está tapizada con anticuerpos, o un suero si la tapización es con antígeno vírico (Sathyanarayan , 2011). La muestra problema se incuba a una temperatura adecuada para facilitar la unión antígeno-anticuerpo. Tras la incubación, se procede a un lavado meticuloso para eliminar los reactivos que no hayan quedado fijados a la fase sólida (Godfroid et al., 2010).

A continuación, se añade el conjugado, que consiste en anticuerpos unidos a una enzima el conjugado se incuba y se lava de la misma manera que la muestra problema (Sathyanarayan , 2011). El último paso consiste en añadir el sustrato de la enzima. La enzima cataliza una reacción que produce un producto visible, como un cambio de color o fluorescencia. La intensidad del producto visible es proporcional a la cantidad de enzima que se encuentra en el pocillo (Mantur et al., 2021).

Los controles positivos y negativos se utilizan para garantizar la fiabilidad del ensayo. El control positivo contiene una cantidad conocida del antígeno o anticuerpo que se está analizando. El control negativo no contiene el antígeno o anticuerpo que se está analizando (Sathyanarayan , 2011).

2.12.2 Tipos de ELISA

- **ELISA Indirecto:** en esta variante de ELISA, se inicia recubriendo el pocillo con antígeno, seguido de la adición de suero problema (la muestra) y el conjugado que es un anticuerpo marcado con la enzima, conocidos como anticuerpos secundarios (Ferreira et al., 2017). Cada paso implica incubación y lavado, si existen anticuerpos específicos, la introducción del sustrato de la enzima revelará la presencia de color (McGiven et al., 2013).

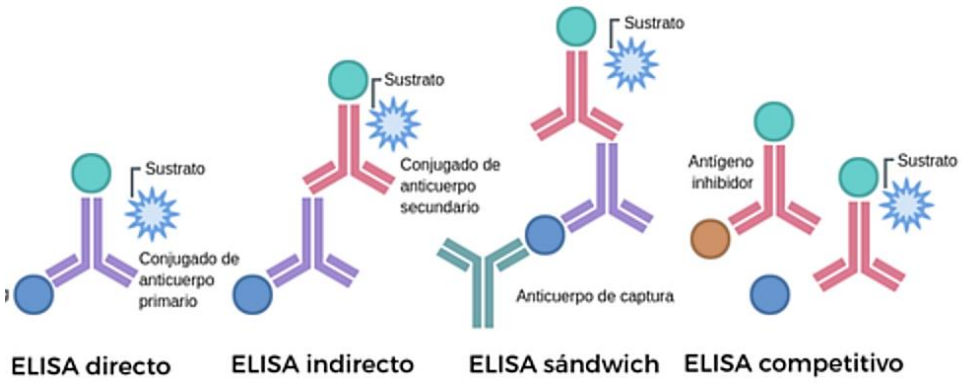
- **ELISA Competitivo:** en el ELISA competitivo, se adapta para identificar tanto anticuerpos como antígenos. Para cuantificar los anticuerpos, se mezcla el suero problema con una cantidad constante de (antígeno) y se coloca esta combinación en pocillos recubiertos con anticuerpos (Abdoel et al., 2018). La

presencia abundante de anticuerpos en la muestra restringe la cantidad de antígeno disponible para unirse a los anticuerpos en la placa. Posteriormente, se introduce un conjugado y sustrato (Mantur et al., 2021). Este último actúa como un antígeno de referencia que compite con el antígeno de muestra por la unión a los anticuerpos (Naik et al., 2017).

- **ELISA Sandwich: e**n este tipo de ELISA, los pocillos se recubren con una sustancia que tiene afinidad por los anticuerpos, luego se agrega la muestra, que contiene el antígeno que se desea detectar. El antígeno se une a la sustancia, quedando fijado al pocillo a continuación se agrega un conjugado, que es un compuesto que contiene un anticuerpo y una enzima, el anticuerpo del conjugado se une al antígeno y la enzima cataliza una reacción que produce un cambio de color. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra (McGiven et al., 2013).

Figura 5

Funcionamiento de los tipos ELISA



Nota: Tomado de (Peeridogaheh et al., 2013).

2.13 Métodos moleculares para el genotipado de especies de *Brucella*

Las técnicas moleculares son herramientas valiosas para el diagnóstico y la investigación epidemiológica de la brucelosis. Permiten identificar especies y biotipos de *Brucella spp.*, y diferenciar cepas virulentas de cepas vacunales (Álvarez et al., 2023). Las técnicas moleculares pueden utilizarse para detectar directamente la bacteria en muestras clínicas, sin necesidad de aislarla previamente.

Además, pueden complementar los resultados obtenidos a partir de pruebas fenotípicas (Çiftci et al., 2017).

2.13.1 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es el método molecular más utilizado para el diagnóstico de la brucelosis, se basa en la amplificación de secuencias genómicas específicas de *Brucella spp* (Abdoel et al., 2018). La técnica de PCR se elige en función del tipo de muestra biológica y del objetivo del estudio. La mayoría de los métodos de diagnóstico molecular para la brucelosis tienen una sensibilidad del 50% al 100% y una especificidad del 60% al 98% (Doosti & Moshkelani, 2020). La sensibilidad y la especificidad de la técnica pueden verse afectadas por factores como el protocolo de extracción de ADN, el tipo de muestra clínica y los límites de detección del protocolo (López-Goñi et al., 2011).

Los métodos moleculares ofrecen varias ventajas sobre los métodos tradicionales de diagnóstico de la brucelosis. Son más rápidos, más sensibles y más específicos. Además, no requieren condiciones de bioseguridad de nivel 3 (BSL-3) (Doosti & Moshkelani, 2020).

2.13.2 Tipificación por reacción en cadena de la polimerasa multiplex

La tipificación por reacción en cadena de la polimerasa multiplex (PCR) es una técnica molecular que se utiliza para identificar y diferenciar las especies y biovariedades de *Brucella* (Álvarez et al., 2023).

La primera PCR multiplex para la tipificación de *Brucella,* denominada ensayo AMOS PCR, se basaba en la amplificación de secuencias específicas del elemento genético IS711, presente en el cromosoma de la bacteria (Banai & Corbel, 2022). Este ensayo permitía identificar tres biovares de *B. abortus,* los tres biovares de *B. melitensis,* todos los biovares de *B. ovis* y el biovar 1 de *B. suis* (Głowacka et al., 2018).

Posteriormente, se desarrollaron otras PCR multiplex para mejorar la sensibilidad y especificidad de la técnica. Por ejemplo, un ensayo abreviado basado en tres cebadores adicionales permitía diferenciar las cepas vacunales de *B. abortus* de las cepas de campo (Suárez-Esquivel et al., 2020). Además, el hallazgo de una eliminación junto a una de las copias IS711 en *B. abortus* biovares 5, 6, 9 y algunas cepas de campo de biovares 3 de *B. abortus* permitió diseñar un nuevo cebador específico que aumentó el poder de discriminación de la técnica (Głowacka et al., 2018).

Finalmente, se ha desarrollado una nueva PCR multiplex que utiliza los cebadores AMOS, lugares específicos adicionales del elemento de inserción IS711, e inserciones y eliminaciones únicas (Suárez-Esquivel et al., 2020). Este ensayo permite diferenciar entre todas las especies de *Brucella* actualmente reconocidas y también permite una diferenciación precisa de ciertos biovares de *B. abortus y B. suis* (Çiftci et al., 2017).

2.14 Tratamiento y control

El tratamiento de la brucelosis generalmente no produce resultados efectivos. La combinación de oxitetraciclina de acción prolongada y estreptomicina ha demostrado reducir la eliminación de la bacteria en la mayoría de las vacas, y en algunos casos, podría erradicar la infección (Głowacka et al., 2018). Sin embargo, actualmente, las vacas infectadas raramente reciben tratamiento debido a la aplicación de programas de erradicación en muchos países. En estos programas, los animales infectados son sacrificados, y los miembros expuestos de la explotación se someten a cuarentena hasta el sacrificio o hasta que se certifique nuevamente la ausencia de brucelosis en la explotación (Figueiredo et al., 2015).

2.14.1 Vacunas

En el pasado, la vacuna con la cepa 19 se utilizó como parte de los programas de erradicación, no obstante, surgieron problemas al no poder distinguir entre el ganado vacunado y el infectado por la cepa de campo para abordar los desafíos

ecológicos asociados con la vacuna de la cepa 19, se desarrolló una nueva vacuna contra *B. abortus* con la cepa RB51 (Dahouk et al., 2015)

La cepa RB51, a diferencia de la cepa 19, tiene la ventaja de que los animales vacunados con ella no desarrollan anticuerpos contra la cadena de polisacáridos. Sin embargo, se debe tener precaución al vacunar novillas gestantes, ya que puede causar aborto y presentar riesgos zoonóticos si se requiere asistencia obstétrica. Por lo tanto, la vacuna solo se administra a novillas jóvenes antes de la gestación (Mantovani et al., 2020).

2.14.2 Prevención y medidas de bioseguridad

Prácticas de bioseguridad en la explotación incluyen infraestructuras ganaderas adecuadas, como construcciones ganaderas adecuadas, vados sanitarios, ventanas herméticas o la subdivisión de la explotación. Además, se lleva a cabo el control de vehículos, la gestión de vectores, así como la supervisión de visitantes, abarcando aspectos como la ropa, el calzado, las duchas y la formación (Poester et al., 2016).

Regulación de los movimientos de animales, como el control de reposición con períodos de cuarentena y perfiles serológicos, así como la participación en ferias. Además, se mantiene la higiene y la salud con condiciones adecuadas, incluyendo la importancia del agua y la alimentación, prácticas de desparasitación y vacunación apropiadas.(Pappas & Papadimitriou, 2019).

En caso de que *Brucella* se recomienda notificar a Agrocalidad ya esté presente en la explotación, es esencial evitar la propagación del patógeno mediante medidas de profilaxis ofensiva, como la implementación de procedimientos de desinfección, también se organiza la explotación mediante sistemas de lotes por edad y todo dentro/todo fuera, y se previenen condiciones de estrés. Además, se zonifica la explotación, el personal y los utensilios, y se lleva a cabo el tratamiento adecuado de estiércoles, purines y material sanitario (Godfroid et al., 2015).

CAPITULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1 Ubicación y características la investigación

- **Localización de la investigación**

El presente estudio se desarrolló en todo el cantón Guaranda y la parte de procesamiento de muestras en el laboratorio de Investigación y Vinculación de la Universidad Estatal de Bolívar, ubicado en la Provincia de Bolívar, Ecuador.

- **Situación Geográfica y edafoclimática**

Tabla 4

Situación Geográfica del lugar de la investigación.

Parámetros Geográficos donde se realizará la investigación	
Altitud	2668 msnm
Latitud	1°34´0´´S
Longitud	79°1’0’’W
Humedad Relativa promedio anual	75%
Precipitación promedio anual	632mm/año
Temperatura Máxima	18 °C
Temperatura promedio	13 °C
Temperatura Mínima	8 °C

Nota: Estación meteorológica Laguacoto II, (2023).

- **Zona de vida**

De acuerdo a la tipificación de regiones ecológicas propuesta por Leslie Holdridge, el lugar de investigación se halla dentro de la clasificación de Bosque Montano Húmedo de Altura Baja.

3.2 Metodología

3.2.1 Material experimental

- 180 muestras de sangre de animales sospechosos a *Brucella spp.*

3.2.2 Factores en estudio

Factor A:

Prevalencia de *Brucella spp.*

Factor B:

Vacas en edad reproductiva.

3.2.3 Tipo de diseño experimental o estadístico

En el tipo de diseño, se aplicó un modelo estadístico descriptivo para examinar en detalle los resultados obtenidos.

- Cálculo para la toma de muestras

$$\boldsymbol{n = \frac{N * Za^2 * p * q}{e^2(N-1) + Za^2 * p * q}}$$

El cantón Guaranda tiene una población de 26327 bovinos hembras en edad reproductiva.

Donde:

n = Tamaño de la muestra requerido.
N = Tamaño de la población.
Z = Valor crítico de la distribución normal estándar para el nivel de confianza deseado que suele ser el 95% que es (1.96)
p = Proporción estimada de éxito 50% igual 0.05

q = Proporción estimada al fallo 50% igual 0.05

e = Margen de error permitido en la estimación que suele hasta el 9%

Por lo tanto:

$$n = \frac{26327 * (1.96)^2 * 0.5 * 0.5}{0.073^2(26327 - 1) + 1.96^2 * 0.5 * 0.5}$$

$$n = \frac{7901390875000}{13163 * 1825^2 + 300125000}$$

n = 180

Se usó un margen de error del 7.3% para ajustar al kit iELISA DE 180 determinaciones.

Fracción muestral (n/N) = 180/26327

La fracción muestral se determinó dividiendo el tamaño de la muestra entre el número total de la población. Esto implica que, en el marco de este estudio, se seleccionó una hembra bovina para el análisis por cada 146 hembras bovinas presentes en la población.

La fracción muestral es alrededor del 0.6834%, de la población total.

3.2.4 Tipo de análisis

Se utilizó un análisis descriptivo en la cual los datos obtenidos se tabularon en Microsoft Exel, estos datos se representaron a través de tablas y gráficos estadísticos que permitieron establecer la prevalencia de la enfermedad, pues, fueron elaborados con el fin de proporcionar una visualización clara y efectiva. Además, se optó por la expresión de los datos en términos porcentuales, lo que facilitó una comprensión más accesible y completa de los resultados.

3.2.5 Métodos de evaluación y datos a tomarse en cuenta

- **Edad:** variable independiente la cual se operacionalizó por medio de la anamnesis realizada al propietario.
- **Sexo:** variable independiente la cual permitió estimar el género de los animales se operacionalizó mediante la observación del animal.
- **Raza:** variable independiente se operacionalizó mediante la observación de las características físicas del animal, como el color del pelaje, la forma de la cabeza o el tamaño del cuerpo y mediante anamnesis al propietario.
- **Signología:** variable dependiente ya que depende de la infección, se operacionalizó por medio observaciones clínicas y anamnesis al propietario.
- **Prevalencia serológica:** variable dependiente basada en la proporción de animales que tienen anticuerpos contra *Brucella* en la sangre, se midió mediante la prueba de iELISA.
- **Prevalencia molecular:** variable dependiente basada en la proporción de animales con *Brucella* en la sangre, confirmados mediante la prueba de iELISA, se midió mediante la prueba molecular de PCR.
- **Filogenia:** variable dependiente que se refiere a las relaciones filogenéticas entre las distintas especies y biovariedades con respecto al tipo de bacteria *Brucella spp.* presente en los animales, se evaluará mediante la secuenciación del ADN y herramientas bioinformáticas.

3.2.6 Manejo del experimento

Procedimiento

Toma de muestras: Primero, se seleccionaron los animales utilizando la ficha de recolección de datos (Anexo 6). Se registraron los signos clínicos presentes, así como información sobre la raza, edad y sexo. Posteriormente, se procedió a obtener muestras de sangre. Para ello, se desinfectó la zona de la piel y, mediante punción en la vena coccígea, se recolectaron las muestras utilizando una aguja de doble dirección estéril y un tubo vacutainer de tapa amarilla de 5 mL. Se etiqueto con un

código de la finca de procedencia, parroquia y sector se guardó en un cooler con gel refrigerante hasta su procesamiento.

Obtención de Suero: Las muestras de sangre se centrifugaron durante 5 minutos en una centrífuga para obtener el suero. Luego, este se guardó en tubos Eppendorf y se conservó a -20°C.

ELISA indirecto: Una vez obtenidas todas las muestras se procedió a realizar la prueba de iELISA VETLIS CHEMTEST para detectar anticuerpos *anti-Brucella.* El fundamento de la prueba fue la fijación de antígenos en una placa, seguida de la incubación con el suero bovino, con los anticuerpos que se unen a los antígenos. Tras un lavado, se añaden anticuerpos secundarios marcados con una enzima. La reacción con sustrato produce un cambio de color proporcional a la cantidad de anticuerpos, permitiendo la detección temprana de la infección al comparar la absorbancia con valores de referencia del kit que se miden en lector de microplacas de ELISA, determinando así la presencia y cantidad de anticuerpos en el suero bovino y su interpretación mediante el Excel con la fórmula proporcionada por el fabricante.

Extracción de material genético: En esta fase, se extrajo ADN de muestras de sangre de los animales positivos, mediante el mini kit PureLink™ Genomic DNA con el objetivo de lisar la pared celular de la bacteria y liberar su ADN, se cuantificó su cantidad ng/uL y pureza A280/A260 por medio de un espectrofotómetro Nanodrop (DNA bacteriano).

Amplificación mediante PCR: Las muestras fueron enviadas a Macrogen, Inc., en Seúl, Corea del Sur, donde se realizaron las PCR. Para el experimento, se sintetizaron los primers universales B4: 5'- TGGCTCGGTTGCCAATATCAA -3' y B5: 5'- CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG -3', que amplifican bandas de 223 pb y se unen a la región interna del gen BSCP31, presente en todas las especies de *Brucella.*

Además, se usaron los primers universales IS711: Forward: 5'-TCGCTCGTCTGAACTCGC-3' y Reverse: 5'-AATCCGGCCGTTTGCAGG-3', que amplifican bandas de 498 pb y se unen a una región específica de la secuencia de inserción IS711, presente en todo el género *Brucella*. Estos primers son ampliamente utilizados para el diagnóstico debido a su alta especificidad y sensibilidad, en comparación de los primers B4 y B5.

La PCR con los primers IS711 se realizó bajo el protocolo y condiciones establecido por Macrogen, (PCR estándar + Purificación).

La PCR con los primers B4 y B5 se realizó bajo las siguientes condiciones enviadas a Macrogen: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, anillamiento a 60°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 1 minuto. El proceso finalizó con una extensión adicional a 72°C durante 10 minutos (PCR personalizada + Purificación).

Secuenciación: Se secuenció los productos PCR en Macrogen, Inc.

Análisis filogenético: Después de la secuenciación, se recibieron los resultados y se inició el proceso de limpieza de secuencias visualizando y editando el electroferograma mediante el software Chromas versión 2.6 donde se eliminó los extremos de cada primer que no forman parte del gen objetivo. Con el software BioEdit versión 7.2 se ensamblo las secuencias previamente editadas en una sola secuencia consenso luego se compararon con aquellas presentes en la base de datos BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), de los Estados Unidos, buscando homologías de nucleótidos. Este análisis permitió identificar el género de la bacteria, establecer alineamientos y realizar un análisis filogenético en el programa MEGA versión 11.13 que revela las relaciones entre las diferentes biovariedades de *Brucella spp.*

CAPITULO IV

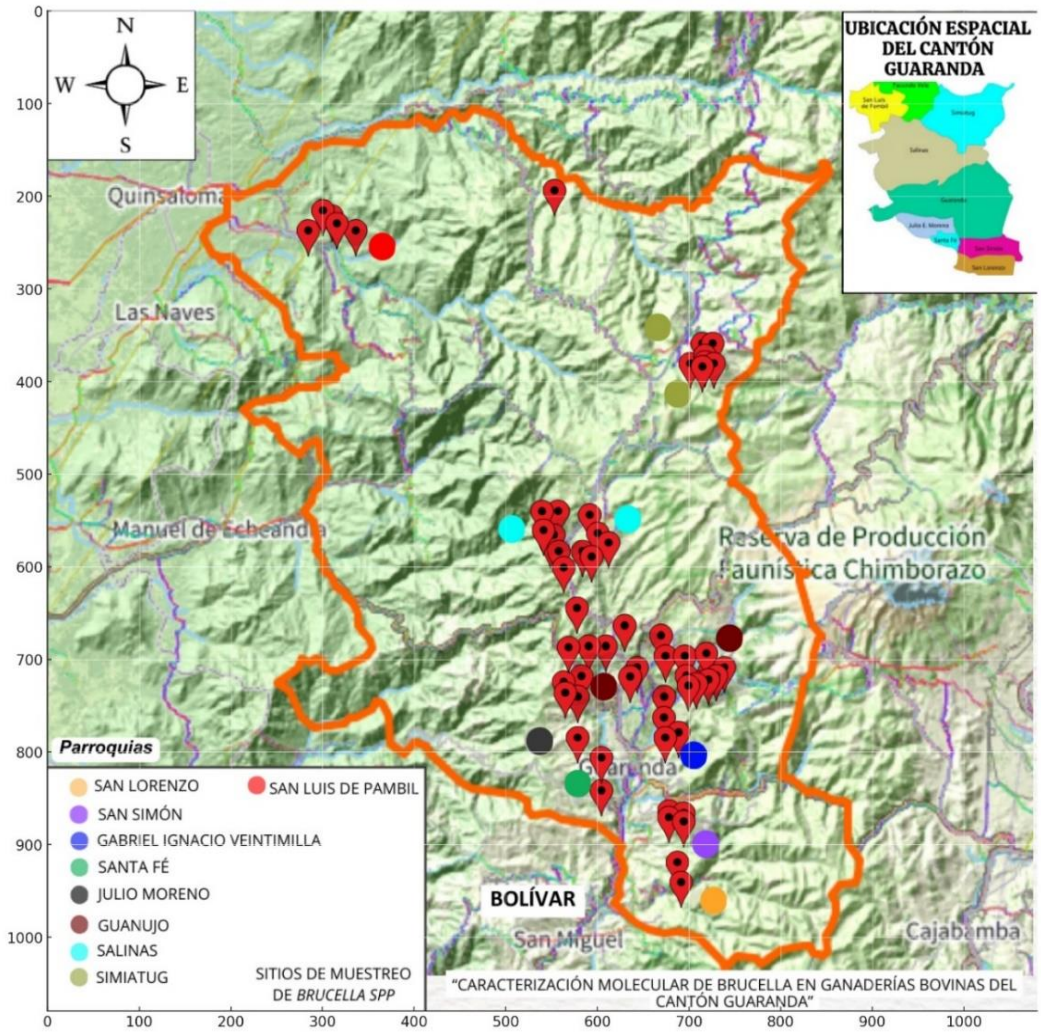
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la presente investigación se tomó muestras de las diferentes parroquias de todo el cantón Guaranda en base al cálculo establecido (Anexo 2).

Figura 6

Puntos de muestreo



Como se puede observar, todos los predios muestreados están georreferenciados dentro del mapa del Cantón (Anexo 5).

Figura 7

Numero de predios muestreados por parroquia

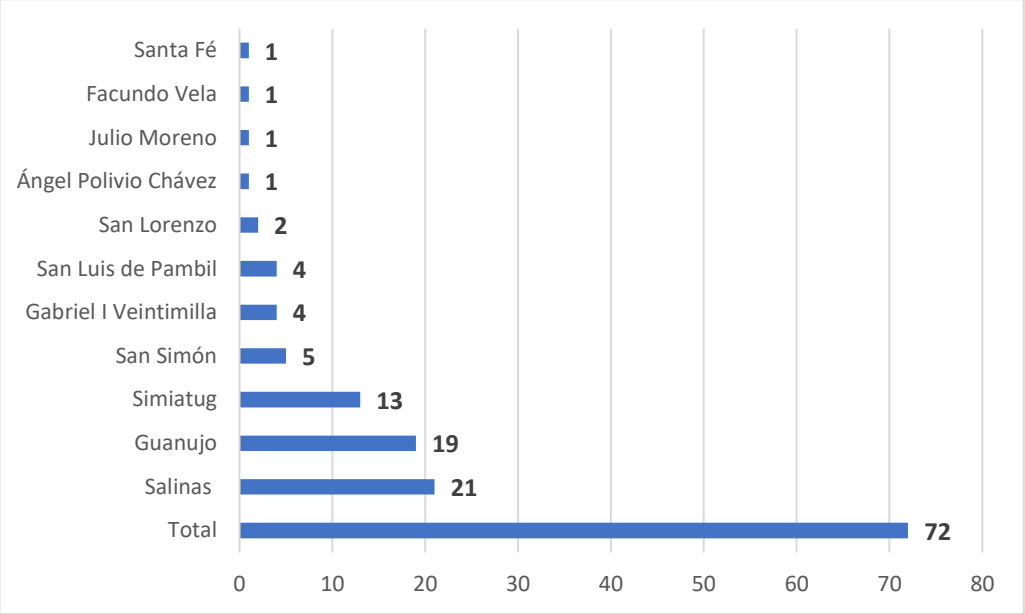


Tabla 5

Medidas descriptivas de animales muestreados

Análisis Descriptivo	
Promedio	3
Mediana	2
Moda	1
Mínimo	1
Máximo	10
Suma	180
Predios	72
Nivel de confianza	95%

El promedio de animales muestreados es 3, con una mediana de 2, lo que indica que el valor central de los datos es 2. La moda es 1, siendo el número más frecuente en la muestra. Se muestrearon mínimo 1 y máximo 10 animales. El nivel de confianza es del 95%.

La variabilidad del muestreo y georreferenciación destaca la importancia de un enfoque epidemiológico. Estos hallazgos son clave para diseñar estrategias

efectivas de control de la brucelosis, en estudios similares como Novoa et al., (2024) se usaron diferentes metodologías de muestreo en distintos contextos geográficos lo cual permitió describir a detalle las zonas más afectadas.

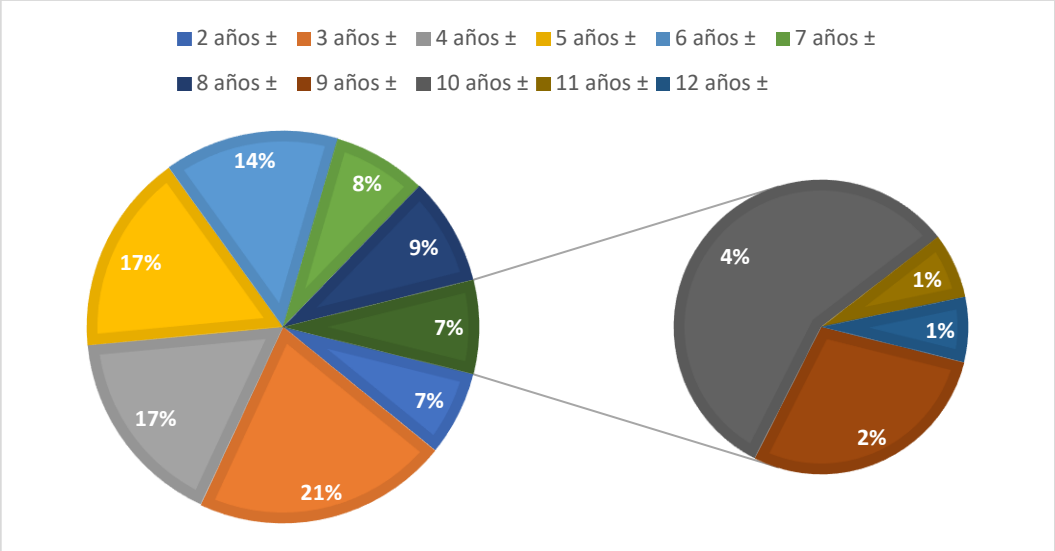
Tabla 6

Edad de los animales muestreados

Años (± meses)	Frecuencia	Porcentaje %
2 años ±	12	7
3 años ±	38	21
4 años ±	30	17
5 años ±	30	17
6 años ±	26	14
7 años ±	14	8
8 años ±	16	9
9 años ±	4	2
10 años ±	8	4
11 años ±	1	1
12 años ±	1	1
Total	180	100%

Figura 8

Porcentaje de edades en la investigación.

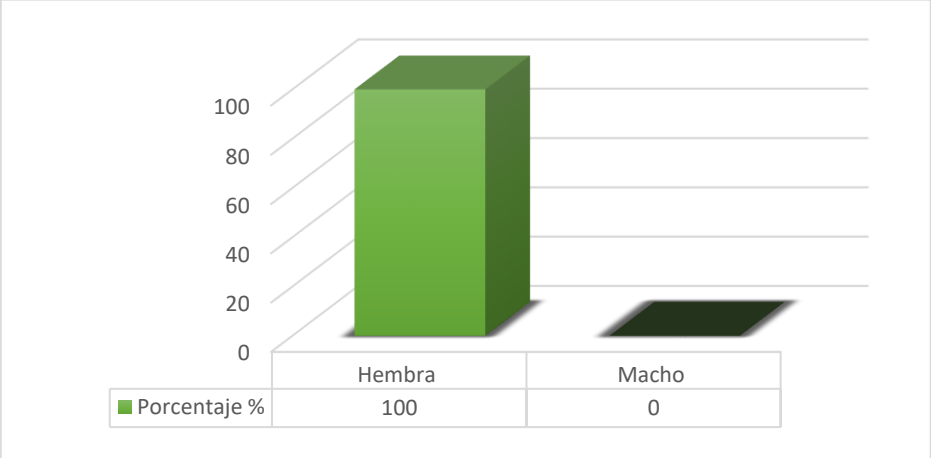


La distribución de edades de los bovinos muestreados muestra una concentración significativa en los grupos más jóvenes, con el 55% de la muestra comprendida entre los 3 y 5 años (38, 30 y 30 animales respectivamente). Los bovinos de 2, 6, 7 y 8 años también tienen una representación notable, sumando un 38% adicional. En contraste, los bovinos de mayor edad, entre 9 y 12 años, están subrepresentadas, constituyendo solo el 8% del total de la muestra. Esta distribución indica una predominancia de animales jóvenes.

Wang et al., (2024) en su investigación sobre productividad bovina, afirman que esto se debe a que los animales con mayor edad bajan su producción y son descartados, ya que representan pérdidas económicas en la producción de leche y carne.

Figura 9

Sexo de los animales muestreados



De acuerdo los resultados obtenidos, se obtuvo una muestra compuesta únicamente por hembras, con un total de 180 vacas en edad reproductiva, ya que eran las más vulnerables a presentar la infección lo que representa el 100% del grupo estudiado. No se registraron machos en las muestras analizadas.

En un estudio similar realizado por Rodrigues et al. (2021), quien destaca la mayor susceptibilidad de las hembras a la infección por *Brucella spp.* La ausencia de machos se justifica por su menor probabilidad de presentar signología. Estos

hallazgos enfatizan la importancia de enfocarse en hembras reproductivas para el control de la brucelosis y respaldan las estrategias de muestreo dirigidas.

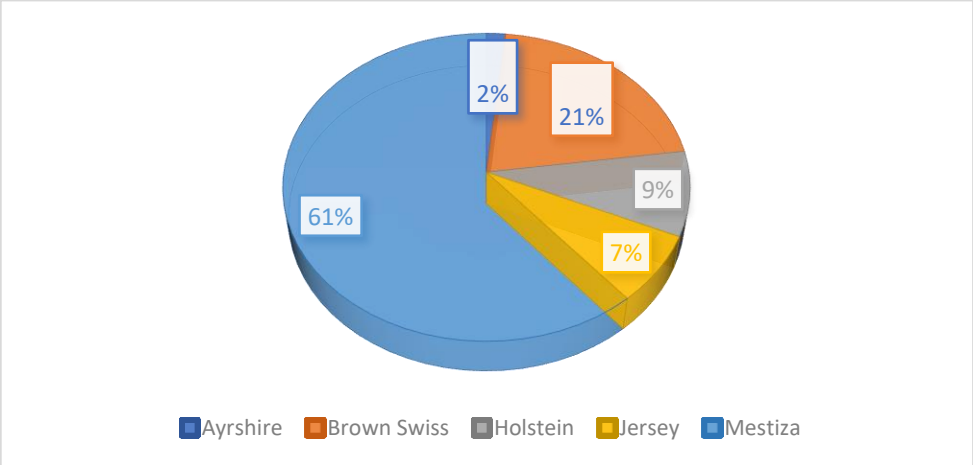
Tabla 7

Razas de los animales muestreados

Razas	**Frecuencia**	**Porcentaje%**
Ayrshire	3	2
Brown Swiss	38	21
Holstein	16	9
Jersey	13	7
Mestiza	110	61
Total	180	100%

Figura 10

Porcentaje de las razas de los animales muestreados



Los resultados revelan muestra la distribución de diferentes razas de ganado, donde la raza Mestiza representa el 61% del total, seguida por Brown Swiss con un 21%, Holstein con un 9%, Jersey con un 7%, y Ayrshire con un 2%. Esto indica que la raza Mestiza es la predominante, mientras que Ayrshire es la menos representada en el muestreo del cantón.

De acuerdo con Gutiérrez et al. (2019), la raza Mestiza predomina en varias regiones debido a su adaptabilidad, lo que coincide con nuestros resultados. Martínez et al. (2020) también encontraron que la Brown Swiss es común en sistemas semi-intensivos, reflejando su 21% en nuestro estudio.

La Holstein, según Pérez et al. (2018), es menos frecuente en áreas de manejo no intensivo, coincidiendo con el 9%. La raza Jersey, aunque produce menos leche que la Holstein, ofrece mayor calidad, como señalaron Ramírez y López (2017), justificando el 7%. La escasa presencia de Ayrshire (2%) es consistente con Hernández et al. (2016), que indicaron su baja adaptación en ambientes donde el manejo no es el adecuado. Estos datos respaldan la distribución de razas observada en este estudio.

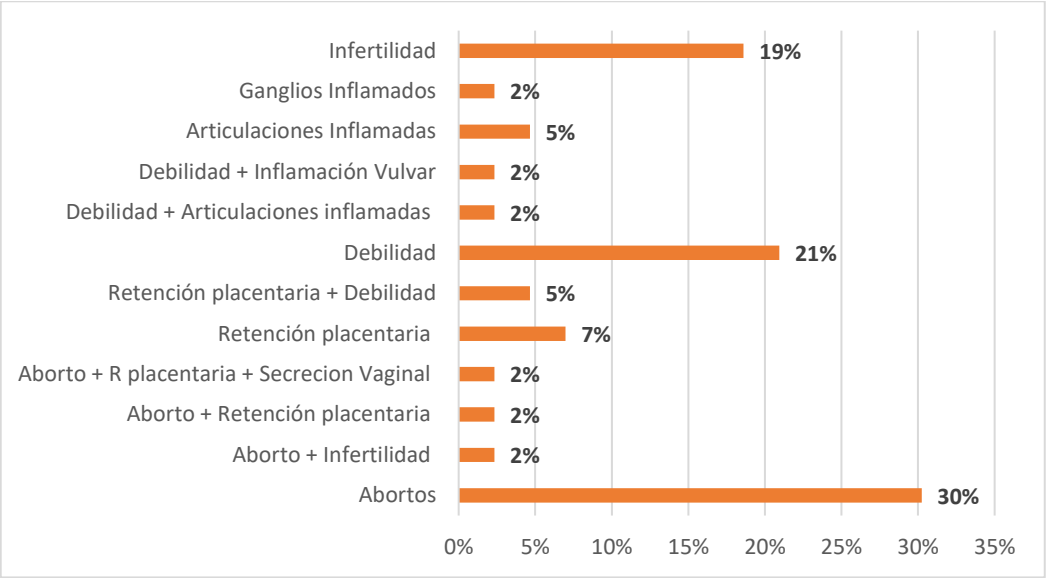
Tabla 8

Signología clínica de los animales muestreados relacionada a Brucella spp.

Signos Clínicos	**Frecuencia**	**Porcentaje %**
Abortos	13	30
Aborto + Infertilidad	1	2
Aborto + Retención placentaria	1	2
Aborto + R placentaria + Secreción Vaginal	1	2
Retención placentaria	3	7
Retención placentaria + Debilidad	2	5
Debilidad	9	21
Debilidad + Articulaciones inflamadas	1	2
Debilidad + Inflamación Vulvar	1	2
Articulaciones Inflamadas	2	5
Ganglios Inflamados	1	2
Infertilidad	8	19
Total	43	100%

Figura 11

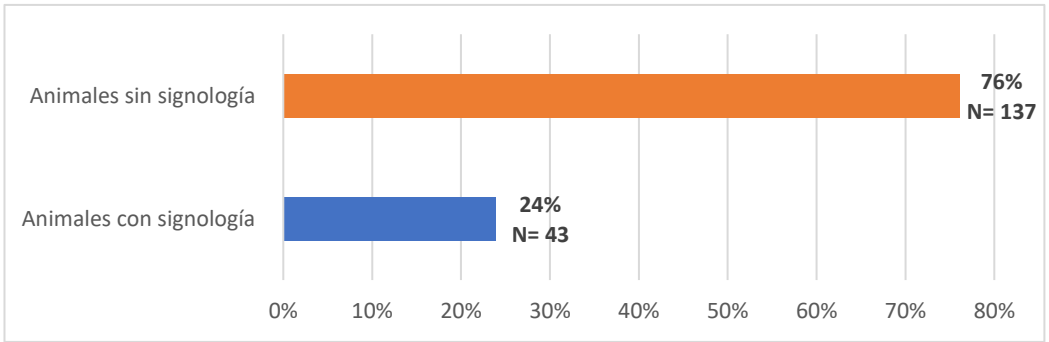
Porcentaje de signología clínica



En base a los resultados obtenidos (n=43) muestran que los abortos son el signo más frecuente (30%), seguidos por la debilidad (21%) e infertilidad (19%). Las combinaciones notables incluyen aborto e infertilidad (2%), aborto y retención placentaria (2%), y aborto, retención placentaria y secreción vaginal (2%). La retención placentaria sola es 7%, y combinada con debilidad, 5%. Otros signos como articulaciones inflamadas (5%), ganglios inflamados (2%), y debilidad con otros síntomas (2% cada uno) también se observan.

Figura 12

Porcentaje de signología de los animales muestreados del cantón Guaranda



Como se puede observar la distribución de animales con y sin signología clínica, el 76% (n=137) no presenta signología, mientras que el 24% restante (N=43) sí presenta signología relacionada a *Brucella spp.* Esto indica que hay porcentaje alto de animales que exhibe alguna patología o condición en cuestión.

La distribución de animales con y sin signología clínica muestra que el 24% presenta signos relacionados con *Brucella spp.* lo que es consistente con los hallazgos de Flores et al. (2018), quienes reportaron una prevalencia similar en zonas endémicas. Ramírez y Torres (2017) señalaron que muchos animales infectados pueden ser asintomáticos, lo que explica el 76% sin signología en este estudio.

Tabla 9

Frecuencia de abortos e infertilidad según la parroquia

Parroquias	**Abortos**	**%**	**Infertilidad**	**%**
Guanujo	2	5%	3	7%
Gabriel I Veintimilla	1	2%	-	-
Salinas	6	14%	5	12%
Ángel Polibio Chávez	-	-	-	-
San Lorenzo	4	9%	-	-
Simiatug	2	5%	-	-
San simón	1	2%	1	2%
San Luis de Pambil	-	-	-	-
Julio moreno	-	-	-	-
Facundo Vela	-	-	-	-
Santa Fé	-	-	-	-
Total	16	37%	10	21%

Los datos muestran que de los 43 animales con signología en las diferentes parroquias el 58% es de abortos e infertilidad, se registraron 16 casos de abortos (37%) y 10 casos de infertilidad (21%) en bovinos. La parroquia Salinas reportó la mayor prevalencia con 6 casos de abortos (14%) y 5 de infertilidad (12%), seguida de San Lorenzo con 4 casos de abortos (9%) y Guanujo con 2 casos de abortos (5%)

y 3 de infertilidad (7%). Parroquias como Ángel Polibio Chávez, San Luis de Pambil, Julio Moreno, Facundo Vela y Santa Fé no reportaron casos. Estos datos indican una notable incidencia de problemas reproductivos en bovinos en ciertas parroquias, destacándose especialmente Salinas y Guanujo.

4.1.1 Prevalencia serológica

Tabla 10

Resultados de la prueba ELISA indireto Vetlis Brucella

Prueba iELISA	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
Positiva	5	2.8%	2.8%
Negativo	175	97.2%	97.2%
Total	180	100%	100%

Tabla 11

Resultados de la prueba iELISA por parroquias

	iELISA			
Parroquia	**Negativo**	**Positivo**	**%Positivo**	**Total**
Ángel Polibio Chávez	1	-	-	1
Facundo Vela	2	-	-	2
Gabriel I Veintimilla	12	1	0.56%	13
Guanujo	63	1	0.56%	64
Julio Moreno	1	-	-	1
Salinas	43	1	0.56%	44
San Lorenzo	5	1	0.56%	6
San Luis de Pambil	14	-	-	14
San Simón	9	-	-	9
Santa Fé	2	-	-	2
Simiatug	23	1	0.56%	24
Total	175	5	2.8%	180

De las 180 muestras de suero de hembras bovinas del cantón Guaranda, analizadas mediante la prueba iELISA, solo 5 resultaron positivas, lo que indica una

prevalencia del 2.8% de *Brucella spp*. Las parroquias Gabriel Ignacio Veintimilla, Guanujo, Salinas y Simiatug tuvieron una prevalencia del (0.56%) presentando un solo caso en cada una.

En comparación con los resultados obtenidos por Ojeda, (2018) donde se han reportado porcentajes más altos, con 7.4% en otra región, aunque se sugiere que podría haber más infectados dentro de los mismos predios de animales que no han sido muestreados.

4.1.2 Extracción de material genético

Para realizar la prueba molecular, se extrajo ADN (bacteriano) en sangre de los animales positivos a iELISA: 1M, 4M, 5M, 6M y 7M. También se incluyeron dos muestras adicionales (2M y 3M) provenientes de la parroquia San Lorenzo, que no fueron muestreados previamente, pero estuvieron en contacto con una vaca positiva dentro del mismo predio.

Tabla 12

Resultados de las extracciones ADN - NanoDrop

Muestra - Código	Volumen	Ng/uL	A260/A280
1M – (7SL)	98uL	14.6	1.69
2M – (8SL)	98uL	32.6	1.79
3M – (9SL)	98uL	19.5	1.90
4M – (5Stg)	98uL	50.1	1.81
5M – (46SS)	98uL	38.5	1.76
6M – (3SIV)	98uL	31	1.76
7M – (33Gjo)	98uL	54.2	1.81

Nota: Las extracciones de ADN se realizaron en los laboratorios de Investigación y Vinculación de la Universidad Estatal de Bolívar, en el área de Biología Molecular.

Los datos revelan variabilidad en las concentraciones de ácidos nucleicos entre las muestras, que oscilan entre 14.6 ng/uL y 54.2 ng/uL, indicando diferentes niveles

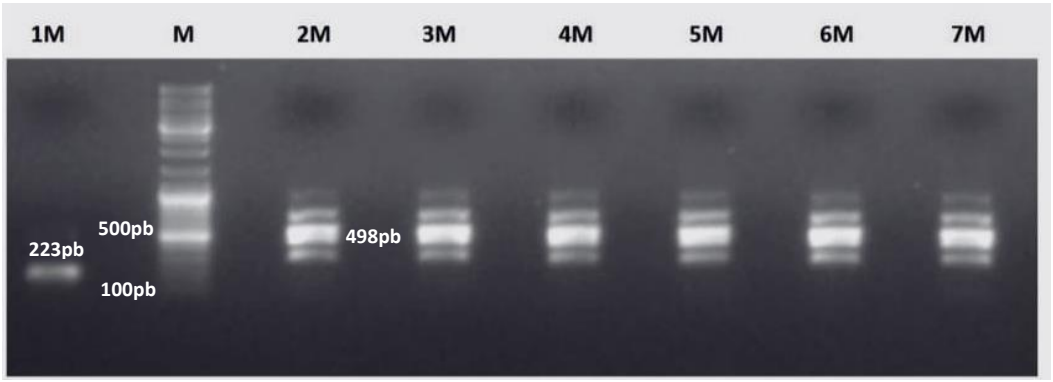
de contenido genético. Las relaciones A260/A280, las cuales van desde 1.69 hasta 1.90, sugieren una óptima calidad del ADN, haciéndolas adecuadas para la realización de la prueba molecular PCR.

Resultados similares a los obtenidos por Ojeda, (2018) que obtuvo un promedio de 1.68 y concentraciones de 18 a 60 ng/uL, donde la prueba molecular resultó exitosa en la determinación de *Brucella*. En esta investigación las dos hembras bovinas adicionales, que no fueron muestreadas para iELISA debido a la limitación del kit de 180 determinaciones, pero presentaban signología clínica y eran compañeras de un animal positivo se incluyeron en el análisis para realizar la prueba de PCR, similar a lo que realizó Gonuguntla et al., (2023) para determinar la incidencia de nuevos casos en un mismo predio.

4.1.3 Prueba Molecular PCR

Figura 13

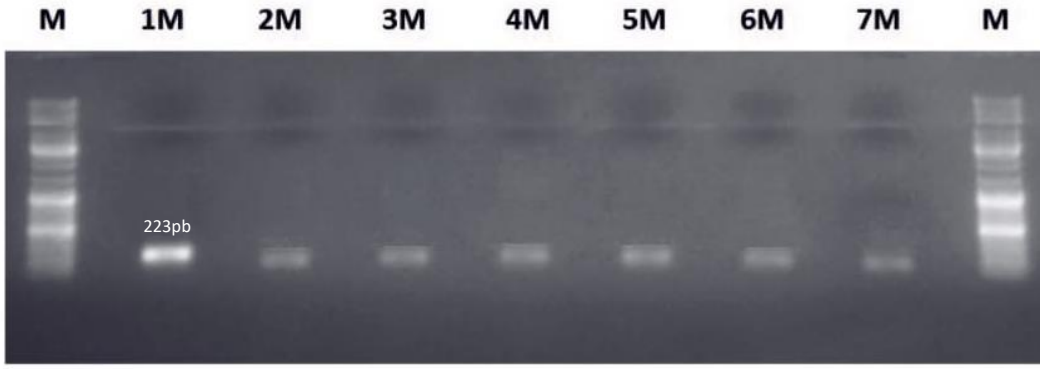
Electroforesis en gel de agarosa banda 223pb y bandas 498pb



En el carril 1M se utilizó los primers universales B4 y B5 que amplificó una región específica de 223 pb del gen BSCP31 de *Brucella*, indicando una muestra positiva. En los carriles 2M a 7M, se utilizaron los primers universales IS711 amplificaron una región de 498 pb, confirmando la positividad de todas las muestras analizadas. El carril M contiene un marcador de peso molecular utilizado como referencia.

Figura 14

Electroforesis en gel de agarosa bandas 223pb



En los carriles 1M a 7M se utilizó únicamente los primers universales B4 y B5 que amplificaron una región específica de 223 pb del gen BSCP31 de *Brucella*, indicando positividad de todas las muestras. Los carriles M contienen un marcador de peso molecular utilizados como referencia.

En un estudio realizado por Aljanazreh et al., (2023) mencionan que los primers universales IS711 se unen al elemento de inserción IS711, específico de *Brucella* y presente en múltiples copias en su genoma, ofreciendo alta sensibilidad y especificidad, aunque no son adecuados para secuenciar debido a la producción de múltiples productos de amplificación. Zamanian et al., (2021) detalla que, en contraste, los primers B4 y B5 amplifican una región del gen *bcsp31*, específica de todas las especies de *Brucella*, que suele estar presente en menos copias y puede resultar en una menor sensibilidad en la detección, pero son adecuados para la secuenciación.

4.1.4 Prevalencia Molecular

Tabla 13

Prevalencia de Brucella determinada por PCR

Prueba PCR	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
Positiva	7	3.8%	3.8%
Total	182	100%	100%

Tabla 14

Resultados de la prueba PCR por parroquias

	PCR			
Parroquia	**Negativo**	**Positivo**	**% Positivo**	**Total**
Gabriel I Veintimilla	-	1	0.5%	1
Guanujo	-	1	0.5%	1
Salinas	-	1	0.5%	1
San Lorenzo	-	3	1.6%	3
Simiatug	-	1	0.5%	1
Total	-	7	3.8%	7

De las 7 muestras analizadas, todas resultaron positivas en la prueba de PCR, indicando una prevalencia del 3.8% de *Brucella spp.* en todo el cantón. Entre las parroquias evaluadas, San Lorenzo presentó la mayor proporción de casos positivos, con un (1.6%). Las parroquias Gabriel Ignacio Veintimilla, Guanujo, Salinas y Simiatug tuvieron una prevalencia del (0.5%).

Tabla 15

Comparación de los resultados PCR con la prueba iELISA

Resultado iELISA	**PCR positiva**	**PCR negativa**	**Total**
Positivo	5	0	5
Total	5	0	180

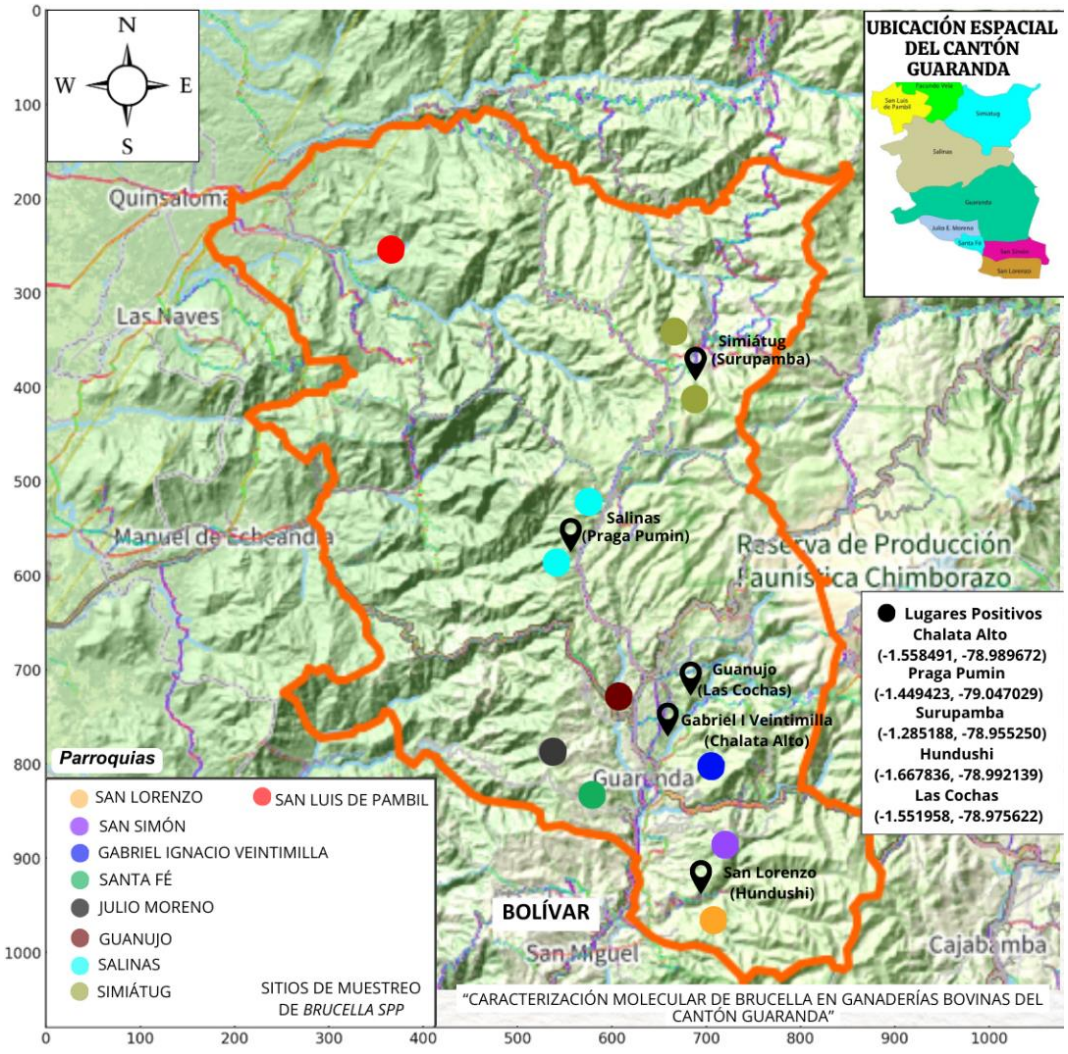
Se compararon la prueba serológica y la prueba molecular para la detección de *Brucella.* De los 5 animales que dieron positivo en iELISA también resultaron positivos en PCR, logrando una sensibilidad y un valor predictivo positivo del 100%. Sin embargo, no se compararon las dos muestras adicionales que dieron positivo en PCR porque no se les realizó la prueba serológica.

Legesse et al. (2023) destacan que la PCR es más sensible en etapas iniciales y con bajas cargas bacterianas en comparación con la iELISA, lo que subraya la

importancia de utilizar esta técnica de diagnóstico más efectiva para mejorar la identificación temprana de la bacteria.

Figura 15

Ubicación de los casos positivos en el cantón Guaranda



4.1.5 Análisis Filogenético

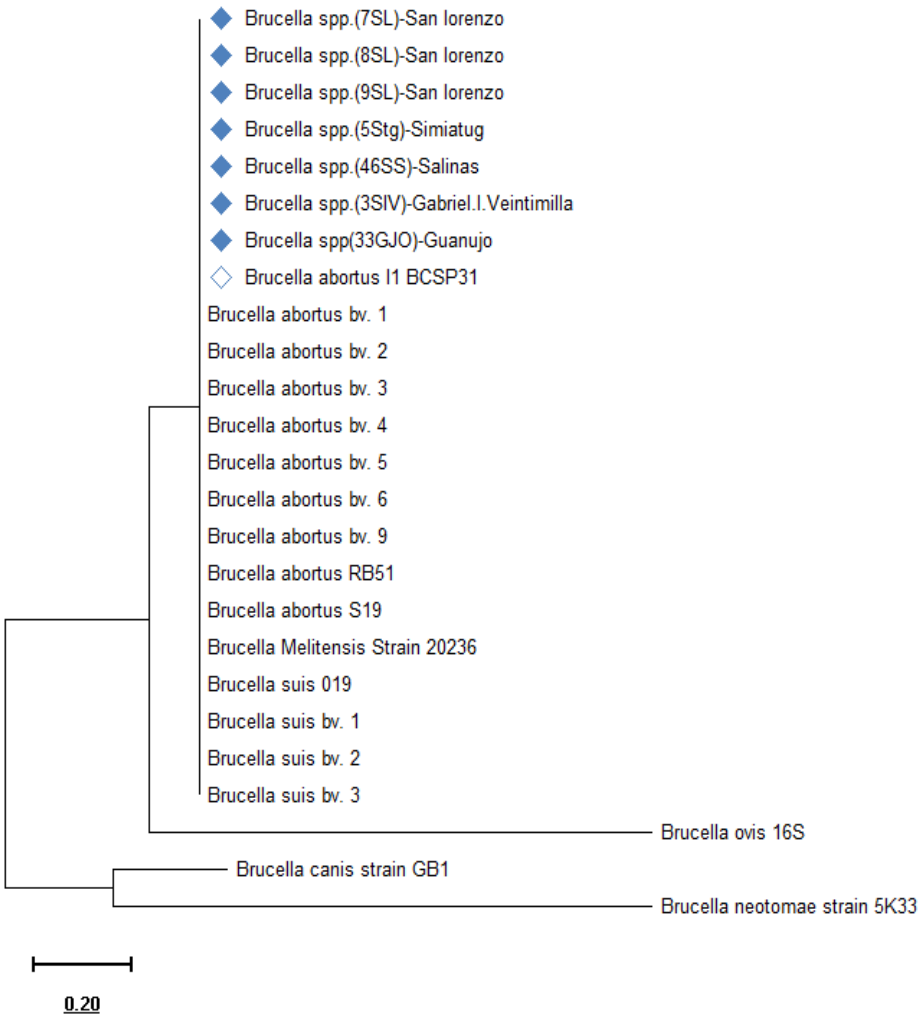
Para confirmar la identidad de *Brucella spp.*, el material genético amplificado con los primers universales B4 y B5, que amplifican una región específica de 223 pb del gen BSCP31, fue secuenciado en Macrogen Inc., en Seúl, Corea del Sur.

Los resultados del secuenciamiento se limpiaron y ensamblaron para ser ingresados en BLAST buscado homologías presentes, lo cual permitió identificar las especies y biovariedades que corresponden al género de la bacteria (Anexo 4).

El dendograma se obtuvo alineando las secuencias de *Brucella* obtenidas del cantón Guaranda y siendo comparadas con las cepas de referencia del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

Figura 16

Árbol filogenético de máxima verosimilitud de Brucellas encontradas en el cantón Guaranda y cepas de referencia



4.2 COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS.

En este estudio, se detectó la prevalencia de *Brucella spp.* en el 3.8% de las muestras confirmadas por PCR. Esto indica la circulación de diferentes biovares en las ganaderías bovinas del cantón.

Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (Ho) y se acepta la hipótesis alternativa (H1), confirmando que; Existe la prevalencia biovares de *Brucella spp.* circulando en las ganaderías del cantón Guaranda.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- La caracterización molecular de *Brucella spp.* en las ganaderías bovinas del cantón Guaranda ha permitido obtener un perfil detallado de la prevalencia y diversidad de esta bacteria en la región. Los resultados obtenidos proporcionan una base sólida para futuras investigaciones y para el desarrollo de estrategias efectivas de control y prevención de la brucelosis bovina.

- La prueba de iELISA reveló una prevalencia serológica del 2.8% en las muestras analizadas. Este hallazgo indica una presencia significativa de anticuerpos contra *Brucella*.

- El análisis mediante PCR mostró una prevalencia molecular de *Brucella spp.* del 3.8% y la incidencia de nuevos casos. Esta técnica confirmó la presencia de ADN bacteriano en las muestras, lo que corrobora los resultados serológicos y destaca la eficacia de la PCR como herramienta de diagnóstico.

- La secuenciación del material genético amplificado permitió la identificación precisa del género *Brucella*.

- En conjunto, estos hallazgos subrayan la importancia de utilizar un enfoque combinado de pruebas serológicas y moleculares para detección y caracterización.

5.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar pruebas de tamizaje, como el Ring Milk Test, de manera recurrente en la leche.

- Los organismos de control en sanidad animal deberían establecer programas de muestreo periódicos para evaluar el estado de los animales, identificar las enfermedades zoonóticas y prevenir su propagación.

- Implementar controles preventivos al adquirir nuevos animales, que incluyan un período de cuarentena y pruebas diagnósticas periódicas antes de su incorporación al hato.

- Pasteurizar la leche y sus derivados para minimizar el riesgo de zoonosis.

- Evitar la adquisición de animales de descarte para prevenir la introducción de enfermedades en el rebaño.

- Realizar un estudio utilizando la técnica RFLP con el fin de diferenciar los biovares de *Brucella*.

BIBLIOGRAFÍA

Abdoel, T., Dias, I. T., Cardoso, R., y Smits, H. L. (2018). Desarrollo de pruebas de campo rápidas y sencillas para la detección de brucelosis en el ganado. Microbiología Veterinaria, 130(3-4), 312-319.

Agrocalidad. (2023). Población vacunal fiebre aftosa. Guaranda y sus parroquias: Proyecto Prozec.

Dahouk, S., Flèche, P. L., Nöckler, K., Jacques, I., Grayon, M., Scholz, H. C., et al. (2015). Evaluación de la tipificación MLVA de *Brucella* para el diagnóstico de brucelosis en humanos. Métodos Microbiológicos, 69(1), 137-145.

Al Dahouk, S., Tomaso, H., Nöckler, K., Neubauer, H., & Frangoulidis, D. (2013). Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella spp*. Clinical Laboratory, 49(9-10), 487-505.

Aljanazreh, B., Shamseye, A. A., Abuawad, A., & Ashhab, Y. (2023). Genomic distribution of the insertion sequence IS711 reveal a potential role in *Brucella* genome plasticity and host preference. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 105457. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105457

Ancora, M., Marcacci, M., Orsini, M., Zilli, K., Di Giannatale, E., Garofolo, G., & Cammà, C. (2014). Secuencia completa del genoma de una cepa ST26 de *Brucella ceti* aislada de un delfín rayado en la costa de Italia. Genome Announcements, 2, 9–10.

Asfaw Geresu, M., & Mamo Kassa, G. (2015). A Review on Diagnostic Methods of Brucellosis. Journal of Veterinary Science & Technology, 07(03). https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000323

Banai, M., & Corbel, M. (2022). Taxonomy of Brucella. The Open Veterinary Science Journal, 4(1), 85-101. https://doi.org/10.2174/18743188010

Banai, M., Itin, R., y Bardenstein, S. (2018). Perspectivas y resultados de la labor de un laboratorio de referencia para brucelosis. Frontiers in Veterinary Science, 4, 234. doi: 10.3389/fvets.2017.00234.

Barquero-Calvo, E., Conde-Alvarez, R., Chacón-Díaz, C., Quesada-Lobo, L., Martirosyan, A., Guzmán-Verri, C., & Pierre, J.P. (2017). La interacción diferencial de *Brucella* y *Ochrobactrum* con la inmunidad innata revela rasgos relacionados con la evolución de patógenos sigilosos.

Bocanegra, I. G., & Leva, R. Z. (2019). Enfermedades infectocontagiosas en rumiantes: Manuales clínicos de Veterinaria. Elsevier Health Sciences.

Bohlin, J., Snipen, L., Cloeckaert, A., Lagesen, K., Ussery, D., Kristo ersen, A.B., & Godfroid, J. (2010). Comparaciones genómicas de *Brucella spp*. y bacterias estrechamente relacionadas utilizando métodos basados en composición de bases y proteómica. BMC Evolutionary Biology, 10, 249.

Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V., & Oliveira, S. C. (2021). LPS no canónico de *Brucella spp*: Estructura, biosíntesis e interacción con el sistema inmunológico del huésped.

Celik, M., Akgul, F., Alkan, S., Altındag, D., Esmer, F., Sahin, A., Ipek, D., Cicek, Y., Gurbuz, E., Ceylan, M. R., & Guler Dincer, N. (2023). Testicular involvement of Brucellosis: A 10-year, multicentre study. Journal of Infection in Developing Countries, 17(9), 1285-1291. https://doi.org/10.3855/jidc.18084

Chaves-Olarte, E., Meza-Torres, J., Herrera-Rodríguez, F., Lizano-González, E., Suárez-Esquivel, M., Baker, K. S., Rivas-Solano, O., Ruiz-Villalobos, N., Villalta-Romero, F., Cheng, H.-P., Walker, G. C., Cloeckaert, A., Thomson, N. R., Frisan, T., Moreno, E., & Guzmán-Verri, C. (2023). A sensor histidine kinase from a plant-endosymbiont bacterium restores the virulence of a mammalian intracellular pathogen. Microbial Pathogenesis, 106442. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106442

Christopher, S., Umapathy, B. L., & Ravikumar, K. L. (2010). Brucellosis: Review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. Journal of

Laboratory Physicians, 2(2), 55-60. https://doi.org/10.4103/0974-2727.72149

Çiftci, A., İça, T., Savaşan, S., Sareyyüpoğlu, B., Akan, M., y Diker, K. S. (2017). Evaluación de métodos de PCR para la detección de cepas de *Brucella* en cultivos y tejidos. Producción Tropical de Salud Animal, 49(4), 755-763.

Corbel, M., Alton, G., Banai, M., Díaz, R., Dranovskaia, B., Elberg, S., Garin-Bastuji, B., Kolar, J., Mantovani, A., Mousa, A., Moriyón, I., Nicoletti, P., Seimenis, A., & Young, E. (2019). Brucellosis in humans and animals.

Dadar, M., Alamian, S., Behrozikhah, A. M., Yazdani, F., Kalantari, A., Etemadi, A., & Whatmore, A. M. (2019). Molecular identification of *Brucella* species and biovars associated with animal and human infection in Iran. Veterinary Research Forum, 10(4), 315. https://doi.org/10.30466/vrf.2018.89680.2171

De Massis, F., Ancora, M., Atzeni, M., Rolesu, S., Bandino, E., Danzetta, M. L., et al. (2015). El uso de MLVA como herramienta epidemiológica para rastrear la reaparición de *Brucella melitensis* biovar 1 en Italia. Enfermedades Transfronterizas y Emergentes, 62(5), 463–469.

Doosti, A., y Moshkelani, S. (2020). Primer informe sobre la prevalencia de la identificación y diferenciación directa de B abortus y B. melitensis mediante PCR en tiempo real en ratones en Irán. World Academy of Science, Engineering and Technology, 5, 84–87.

Duvnjak, S., Špic, S., Kušar, D., Papic, B., Reil, I., Zdelar-Tuk, M., ... & Hendriksen, R.S. (2017). Secuencia completa del genoma de la primera cepa de *Brucella ceti* de tipo 27 aislada en aguas europeas. Genome Announcements, 5, 1

Ferreira, A., Cardoso, R., Dias, I., Mariano, I., Belo, A., Preto, I., Manteigas, A., Fonseca, A., & Maria Inácia Corrêa de Sá. (2017). Evaluation of a modified Rose Bengal test and an indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. Veterinary Research, 34(3), 297-305. https://doi.org/10.1051/vetres:2017005

Figueiredo, P., Ficht, T. A., Rice-Ficht, A., Rossetti, C. A., & Adams, L. G. (2015). Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis. The American Journal of Pathology, 185(6), 1505-1517. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.003

Flores, M., García, L., & Soto, J. (2018). *Prevalencia de Brucella spp. en ganado bovino en zonas endémicas*. Revista de Veterinaria, 15(2), 100-108.

Foster, G., Osterman, B.S., Godfroid, J., Jacques, I., Cloeckaert, A. (2020). Propuesta de las especies *Brucella ceti sp.* nov. y *Brucella pinnipedialis sp.* nov. para cepas de *Brucella* asociadas a sus hospedadores preferidos. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(11), 2688–2693.

Fretin, D., Fauconnier, A., Kohler, S., Halling, S., Leonard, S., Nijskens, C., Ferooz, J., Lestrate, P., Delrue, R.M., Danese, I., Vandenhaute, J., Tibor, A., DeBolle, X., Letesson, J.J. (2016). El flagelo envuelto de *Brucella melitensis* participa en la persistencia en un modelo murino de infección. Cell Microbiol., 7, 687–698.

Garofolo, G., Di Giannatale, E., Platone, I., Zilli, K., Sacchini, L., Abass, A., ... & Di Donato, G. (2017). Orígenes y contexto global de *Brucella abortus* en Italia. BMC Microbiology, 17, 1–7.

Georgios, P., Nicolas, A., Mile, B., Epameinonds, T. (2023). Brucelosis. New England Journal of Medicine, 352, 2325-2336.

Głowacka, P., Żakowska, D., Naylor, K., Niemcewicz, M., & Bielawska-Drózd, A. (2018). Brucella—Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. Polish Journal of Microbiology, 67(2), 151-161. https://doi.org/10.21307/pjm-2018-029

Glynn, M. K., Lynn, T.V. (2024). La brucelosis. Journal of the American Veterinary Medical Association, 233, 900–908.

Godfroid, J., Cloeckaert, A., Liautard, J.-P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B., & Letesson, J.-J. (2015). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has

continuously been a re-emerging zoonosis. Veterinary Research, 36(3), 313-326. https://doi.org/10.1051/vetres:2005003

Godfroid, J., Nielsen, K., & Saegerman, C. (2010). Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. Croatian Medical Journal, 51(4), 296-305. https://doi.org/10.3325/cmj.2010.51.296

Gonuguntla, H. N., Surendra, K. S. N. L., Prasad, A., Sarangi, L. N., Rana, S. K., Manasa, G., Muthappa, P. N., Harikumar, A. V., & Sharma, G. K. (2023). *Brucella melitensis*: Divergence Among Indian Strains and Genetic Characterization of a Strain Isolated from Cattle. *Indian journal of microbiology*, *63*(3), 272–280. https://doi.org/10.1007/s12088-023-01081

Gwida, M., Al Dahouk, S., Melzer, F., Rösler, U., Neubauer, H., Tomaso, H. (2010). Brucelosis: enfermedad zoonótica emergente a nivel regional. Doi: 10.3325/cmj.2010.51.289.

Gutiérrez, A., Rodríguez, L., & Pérez, J. (2019). *Adaptabilidad y distribución de razas bovinas en regiones montañosas*. Revista de Producción Animal, 12(3), 45

Haileselassie, M. (2022). Estudio de seroprevalencia de la brucelosis bovina y su importancia para la salud pública en Tigray Occidental, FVM, AAU, Etiopía.

Halling, S.M., Peterson-Burch, B.D., Bricker, B.J., Zuerner, R.L., Qing, Z., Li, L.L., Kapur, V., Alt, D.P., Olsen, S.C. (2020). Finalización de la secuencia del genoma de *Brucella abortus* y comparación con los genomas altamente similares de *Brucella abortus.* International Journal of Bacteriology, 187, 2715–2726.

Hernández, M., Castro, G., & Rivas, D. (2016). *Adaptación de la raza Ayrshire en zonas tropicales y subtropicales*. Revista de Ganadería Tropical, 5(2), 33

Hilemlekot, M. (2021). Estudio de seroprevalencia de la brucelosis en ganado y humanos en Bahr Dar, FVM, AAU, Debre-zeit, Etiopía.

Ibrahim, N., Belihu, K., Lobago, F., Bekana, M. (2010). Seroprevalencia de la brucelosis bovina y sus factores de riesgo en la zona de Jimma, región de Oromía, suroeste de Etiopía. Tropical Animal Health and Production, 42, 35-41.

Ishihara, M., Abe, S., Imaoka, K., Nakagawa, T., Kadota, K., Oguro, H., Nakajima, H., Yamaguchi, S., & Nagai, A. (2023). Meningoencephalomyelitis Caused by *Brucella Canis*: A Case Report and Literature Review. Internal Medicine (Tokyo, Japan). https://doi.org/10.2169/internalmedicine.2664-23

Jegerfa, M. (2016). Epidemiología de la brucelosis bovina en tres agroecologías seleccionadas en Oromia Central. Tesis de maestría, FVM, AAU, Etiopía.

Jiang, H., Feng, L., Lu, J., & 1 State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China. (2020). Updated Guidelines for the Diagnosis of Human Brucellosis—China, 2019. China CDC Weekly, 2(26), 487-489. https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.129

Jones, J. D., Proffitt, K. M., Ramsey, J. M., Almberg, E. S., & Anderson, N. J. (2023). Reproductive Fate of Brucellosis-Seropositive Elk (Cervus canadensis): Implications for Disease Transmission Risk. Journal of Wildlife Diseases. https://doi.org/10.7589/JWD-D-22-00123

Kangethe, E.K., Ekuttan, C.E., Kimani,V.N., Kiragu, M.W. (2017). Investigaciones sobre la prevalencia de la brucelosis bovina y los factores de riesgo que predisponen a los humanos a la infección en hogares urbanos de ganadería lechera y no lechera en la División de Dagoretti, Nairobi, Kenia. East African Medical Journal, 84, 96-100.

Kato, Y., Masuda, G., Itoda, I., Imamura, A., Ajisawa, A., Negishi, M. (2017). Brucelosis una zoonosis emergente: probable transmisión *Brucella abortus*. Journal of Travel Medicine, 14, 343–345.

Kebede, T, Ejeta, G., Ameni, G. (2018). Seroprevalencia de brucelosis bovina en pequeñas explotaciones lecheras en el distrito de Wuchale-Jida, Etiopía. Revue de l'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, 159, 3

Khan, F. M., Qureshi, M. S., Nawaz, S., Aftab, M., Sadique, U., Islam, Z., et al. (2017). Evaluación comparativa de las pruebas de aglutinación en placa de suero (SPAT) y de placa de Rosa Bengal (RBPT) para el diagnóstico de *Brucella abortus* en sueros de ganado y humanos. International Journal of Biosciences, 10(5), 367-371.

Khan, M.Y., Mah, M.W., Memish, Z.A. (2014). Brucelosis una enfermedad de impacto. Clinical Infectious Diseases, 32, 1172–1177.

Le Flèche, P., Jacques, I., Grayon, M., AI Dahouk, S., Bouchon, P., Denoeud, F., et al. (2006). Evaluación y selección de loci de repeticiones en tándem para un ensayo de tipificación MLVA de Brucella. Microbiología BMC, 1–14.

Legesse, A., Mekuriaw, A., Gelaye, E., Abayneh, T., Getachew, B., Weldemedhin, W., Tesgera, T., Deresse, G., & Birhanu, K. (2023). Comparative evaluation of RBPT, I-ELISA, and CFT for the diagnosis of brucellosis and PCR detection of *Brucella* species from Ethiopian sheep, goats, and cattle sera. *BMC microbiology*, *23*(1), 216. https://doi.org/10.1186/s12866-023-02962-2

Lilenbaum, W., De Souza, G.N., Ristow, P., Moreira, M.C., Fraguas, S., Oelemann, W.M. (2016). Estudio serológico sobre *Brucella abortus*, el virus de la artritis-encefalitis caprina y *Leptospira* en cabras lecheras en Río de Janeiro. Brazilian Veterinary Journal, 173, 408–412.

López-Goñi, I., García-Yoldi, D., Marín, C. M., de Miguel, M. J., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., et al. (2011). Nuevo ensayo multiplex de PCR Bruce-ladder para la tipificación de biovar de *Brucella suis* y la discriminación entre *Brucella suis* y *Brucella canis*. Microbiología Veterinaria, 154(1-2), 152-155.

Lucero, N. E., Escobar, G. I., Ayala, S. M., Paulo, P. S., & Nielsen, K. (2023). Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. Journal of Medical Microbiology, 883-887. https://doi.org/10.1099/jmm.0.05217.

Lucero, N.E., Escobar, G.I., Ayala, S.M., Silva, P., Nielsen, K. (2023). Ensayo de polarización de fluorescencia para el diagnóstico de la brucelosis. Journal of Medical Microbiology, 52, 883-887.

Luo, J., Yang, H., Hu, F., Zhang, S., Wang, T., Zhao, Q., Wang, R., & Zhen, Q. (2019). Associated factors in distinguishing patients with brucellosis from suspected cases. BMC Infectious Diseases, 19(1), 1038. https://doi.org/10.1186/s12879-019-4662-3

Maichomo, M.W., Maichomo, J.J., McDermott, S.M., Arimi, P.B., Gathura, T.J., Mugambi, S.M. (2020). Estudio de la brucelosis en una comunidad pastoral y evaluación de la utilidad de los signos clínicos y síntomas para diferenciarla de otras enfermedades similares. African Journal of Health Sciences, 114–119.

Mantovani, C., Soares, C. O., Santos, L. R. D., & Rosinha, G. M. S. (2020). Research Article Bovine brucellosis vaccine strain S19 detected in calves before vaccination. Genetics and Molecular Research, 19(3). https://doi.org/10.4238/gmr18659

Mantur, B., Parande, A., Amarnath, S., Patil, G., Walvekar, R., Desai, A., Parande, M., Shinde, R., Chandrashekar, M., & Patil, S. (2021). ELISA versus conventional methods of diagnosing endemic brucellosis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 83(2), 314-318. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0790

Mantur, B.G., Amarnath, S.K., Shinde, R.S. (2020). Revisión de las características clínicas y de laboratorio de la brucelosis. Indian Journal of Medical Microbiology, 25, 188–202.

Mantur, B.G., Birada, M.S., Bidri, R.C., Mulimani, M.S., Kariholu, P. (2016). Manifestaciones clínicas variadas y desafíos diagnósticos de la brucelosis:

16 años de experiencia en un área endémica. Journal of Medical Microbiology, 55, 897-903.

Martínez, C., Silva, P., & Torres, M. (2020). *Eficiencia productiva de la raza Brown Swiss en sistemas semi-intensivos*. Ciencia Ganadera, 18(2), 102-110.

Martínez, A., López, R., & Fernández, S. (2019). *Factores que afectan la manifestación clínica de la brucelosis en rebaños bovinos*. Ciencia y Tecnología Veterinaria, 8(1), 200-215.

Massis, F., Giovannini, A., Ronchi, G. F., Tittarelli, M., Di Ventura, M., Nannini, D., et al. (2015). Utilización de las pruebas de fijación de complemento y brucelina para identificar ganado vacunado con la cepa RB51 de *Brucella abortus*. Veterinaria Italiana, 41, 291–299.

McGiven, J. A., Tucker, J. D., Perrett, L. L., Stack, J. A., Brew, S. D., y MacMillan, A. P. (2013). Validación de FPA y cELISA para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* en sueros de ganado y comparación con SAT, CFT e iELISA. Métodos Inmunológicos, 278(1–2), 171–178.

Moreno, E. (2014). Perspectivas retrospectivas y prospectivas sobre la brucelosis zoonótica. Frontiers in Microbiology, 5, 1–18.

Ms, S., & Sathyanarayan MS, S. D. (2011). A comparative study of agglutination tests, blood culture & elisa in the laboratory diagnosis of human brucellosis. BioMedSciDirect: 12 https://www.biomedscidirect.com/184/a-comparative study-ofagglutination-tests-blood-culture-elisa-in-the-laboratory diagnosis-of-human-brucellosis.

Muñoz, P.M., Mick, V., Sacchini, L., Janowicz, A., de Miguel, M.J., Cherfa, M.A., ... & Vergnaud, G. (2019). Filogeografía y epidemiología de *Brucella suis* biovar 2 en vida silvestre y cerdos domésticos. Veterinary Microbiology, 233, 68.

Naik, R. V., Murthy, H., Prakash, H. K., y Peerapur, B. V. (2017). Estudio comparativo de la Prueba de Aglutinación en Microplaca (MAT) con el

Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) para el diagnóstico de brucelosis. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6(10), 1550-1558.

NCBI, N. C. (03 de 03 de 2024). National Library of Medicine. Obtenido de Taxonomy: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon

Ndazigaruye, G., Mushonga, B., Kandiwa, E., Samkange, A., & Segwagwe, B. E. (2018). Prevalence and risk factors for brucellosis seropositivity in cattle in Nyagatare District, Eastern Province, Rwanda. Journal of the South African Veterinary Association, 89, 1625. https://doi.org/10.4102/jsava.v89i0.1625

Newby, D. T., Hadfield, T. L., y Roberto, F. F. (2018). Detección en tiempo real de *Brucella abortus:* un estudio comparativo de los ensayos con SYBR Green I, 5'- exonucleasa y sonda de hibridación. Microbiología Ambiental Aplicada, 69(8), 4753-4759.

Nielsen, K., Gall, D., Smith, P., Balsevicius, S., Garrido, F., Ferrer, M. D., Biancifiori, F., Dajer, A., Luna, E., Samartino, L., Bermudez, R., Moreno, F., Renteria, T., & Corral, A. (2014). Comparison of serological tests for the detection of ovine and caprine antibody to *Brucella melitensis.* Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics), 23(3), 979-987. https://doi.org/10.20506/rst.23.3.1532

Novoa, M. B., Aguirre, N., Valentini, B., Signorini, M., Aznar, N., Vanzini, V., & Torioni-de-Echaide, S. (2024). Development and Bayesian validation of a competitive inhibition ELISA for detection of antibodies against *Brucella abortus* in cattle. *Acta tropica*, 107319. Advance online publication. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107319

OIE. (2022, 24 de mayo). Brucelosis. Recuperado de Organización Mundial de Sanidad Animal: https://www.woah.org/es/enfermedad/brucelosis/

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. (2016). Brucelosis (*Brucella abortus, B. melitensis y B. suis)* (Infección con *B. abortus, B. melitensis* y *B. suis*). Manual de Pruebas Diagnósticas y Vacunas para Animales Terrestres.

Ojeda, K., & Román, F. (2018). Identificación molecular de *Brucella spp.* en muestras de sangre de ganado bovino de la provincia de Zamora Chinchipe. *Centro de Biotecnología UNL*, 7, 11-16.

Oliveira, S. C., & Giambartolomei, G. (Eds.). (2021). Host Immune Responses and Pathogenesis to *Brucella spp.* Infection. MDPI - Multidisciplinary Digital Publishing Institute. https://doi.org/10.3390/books978-3-0365-2419-1

Peeridogaheh, H., Golmohammadi, M. G., & Pourfarzi, F. (2013). Evaluation of ELISA and Brucellacapt tests for diagnosis of human Brucellosis. Iranian Journal of Microbiology, 5(1), 14-18.

Pérez, E., Gómez, R., & Fernández, S. (2018). *Características de producción de la raza Holstein en diferentes sistemas de manejo*. Revista de Ciencias Agropecuarias, 9(4), 250-260.

Poester, F. P., Gonçalves, V. S. P., Paixão, T. A., Santos, R. L., Olsen, S. C., Schurig, G. G., & Lage, A. P. (2016). Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. Vaccine, 24(25), 5327-5334. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.020

Praud, A., Giménez, O., Zanella, G., Dufour, B., Pozzi, N., Antras, V., et al. (2012). Estimación de la sensibilidad y especificidad de cinco pruebas serológicas para el diagnóstico de brucelosis porcina. Medicina Veterinaria Preventiva, 104, 94–100

Ramírez, H., & Torres, M. (2017). *Signos clínicos de brucelosis en ganado: un estudio comparativo*. Revista de Salud Animal, 10(3), 45-52.

Ramírez, H., & López, F. (2017). *Calidad de la leche en la raza Jersey comparada con otras razas lecheras*. Estudios Lecheros, 7(1), 78-85.

Rivas-Solano, O. (2015). *Brucella abortus*: Patogénesis y regulación génica de la virulencia. Revista Tecnología en Marcha, 28(2), 61. https://doi.org/10.18845/tm.v28i2.2334

Rodrigues Dos Santos Souza, M., Martins Soares Filho, P., Arrais Hodon, M., Gomes de Souza, P., & Osório Silva, C. H. (2022). Evaluation of diagnostic tests' sensitivity, specificity and predictive values in bovine carcasses showing brucellosis suggestive lesions, condemned by Brazilian Federal Meat Inspection Service in the Amazon Region of Brazil. *Preventive veterinary medicine, 200*. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105567

Román Cárdenas, F. A., Uchuari-Pauta, M., & Aguirre-Riofrío, E. (2020). Monitoreo de *Brucella mellitensis* en la población de cabras "Chuscas" de la provincia de Loja-Ecuador. Revista Científica y Tecnológica UPSE, 7(1), 54-57. https://doi.org/10.26423/rctu.v7i1.525

Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M., & López-Goñi, I. (2020). Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 33(3), 615-617.

Suárez-Esquivel, M., Chaves-Olarte, E., Moreno, E., & Guzmán-Verri, C. (2020). *Brucella* Genomics: Macro and Micro Evolution. International Journal of Molecular Sciences, 21(20), 7749. https://doi.org/10.3390/ijms21207749

Thrusfield, M. (2018). Veterinary epidemiology (3rd ed., repr). Blackwell Scence.

Tsolis, R.M. (2017). Análisis comparativo del genoma de las alfa-proteobacterias: Relaciones entre patógenos de plantas y animales y especificidad del huésped. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 12503–12505.

Wang, Y., Vallée, E., Compton, C., Heuer, C., Guo, A., Wang, Y., Zhang, Z., & Vignes, M. (2024). A novel Bayesian Latent Class Model (BLCM) evaluates multiple continuous and binary tests: A case study for *Brucella abortus* in dairy cattle. *Preventive veterinary medicine, 224*, 106115. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2024.106115

Warioba, J. P., Karimuribo, E. D., Komba, E. V. G., Kabululu, M. L., Minga, G. A., & Nonga, H. E. (2023). Occurrence and Risk Factors of Brucellosis in Commercial Cattle Farms from Selected Districts of the Eastern Coast Zone,

Tanzania. *Veterinary medicine international*, *2023*, 4904931. https://doi.org/10.1155/2023/4904931

Whatmore, A.M. (2019). Comprensión actual de la diversidad genética de Brucella, un género en expansión de patógenos zoonóticos. Infection, Genetics and Evolution, 9, 1168–1184.

Worthington, R. W., & Cordes, D. O. (2017). The complement fixation test for *Brucella ovis.* New Zealand Veterinary Journal, 29(4), 63. https://doi.org/10.1080/00480169.2017.34799.

Zamanian, M., Hashemi Tabar, G. R., Rad, M., & Haghparast, A. (2021). Evaluation of different primers for detection of *Brucella* in human and animal serum samples by using PCR method. *Archives of Iranian medicine*, *18*(1), 44–50.

Zhang, H., Zhang, Z., Li, Y., Li, W., Jin, Y., Li, Z., Zhou, J., & Tong, D. (2023). Seroprevalence of Chlamydia abortus and *Brucella spp*. And risk factors for Chlamydia abortus in pigs from China. Acta Tropica, 248, 107050. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.107050.

ANEXOS

Anexo 1

Mapa de ubicación de la investigación



Descripción: Cantón Guaranda y sus parroquias

Anexo 2

Croquis del ensayo

Parroquia	Tipo	Vacas en edad reproductiva	Proporción respecto a la población	Proporción	Nro. Muestras
Ángel Polibio Chávez	Urbana	**37**	0.14%	0.25	**1**
Gabriel Ignacio Veintimilla	Urbana	**1990**	7.56%	13.61	**13**
Guanujo	Urbana	**9336**	36.46%	63.83	**64**
Facundo Vela	Rural	**273**	1.04%	1.87	**2**
Julio Moreno	Rural	**195**	0.74%	1.33	**1**
Salinas	Rural	**6461**	24.54%	44.17	**44**
San Lorenzo	Rural	**909**	3.45%	6.21	**6**
San Luis de Pambil	Rural	**2027**	7.70%	13.86	**14**
San Simón	Rural	**1247**	4.74%	8.53	**9**
Santa Fé	Rural	**346**	1.31%	2.37	**2**
Simiatug	Rural	**3506**	13.32%	27.97	**24**
	Total	**26327**	7116		180

Descripción: Datos proporcionados por el Departamento de Sanidad Animal en base a la campaña de vacunación de la fiebre aftosa, Guaranda año 2023. Se utilizó un muestreo estratificado simple para la selección de animales, en base al cálculo muestral finito.

Anexo 3

Resultados de pruebas de laboratorio

CHEMTEST™

Bovinos

	04/04/2024	**Analista:**	Gabriel Conde Castillo
	1	**T (°C) / HR (%):**	20 °C
Test:	VETLIS® *Brucella* Glyco iELISA Bovinos	**Versión:**	15VL01_v08092022

Esquema de Siembra (91 muestras)

CN	M4	M12	M20	M28	M36	M44	M52	M60	M68	M76	M84
CN	M5	M13	M21	M29	M37	M45	M53	M61	M69	M77	M85
CP	M6	M14	M22	M30	M38	M46	M54	M62	M70	M78	M86
CP	M7	M15	M23	M31	M39	M47	M55	M63	M71	M79	M87
BM	M8	M16	M24	M32	M40	M48	M56	M64	M72	M80	M88
M1	M9	M17	M25	M33	M41	M49	M57	M65	M73	M81	M89
M2	M10	M18	M26	M34	M42	M50	M58	M66	M74	M82	M90
M3	M11	M19	M27	M35	M43	M51	M59	M67	M75	M83	M91

Criterios de Validez	
CP > 1.8	OK
CN < 0.25	OK
BM < 0.20	OK
CP/CN > 7.2	OK
Variación CP < 20%	OK

PR	Interpretación
≤ 14%	Negativo
> 14 ≤ 24%	Indeterminado
> 24%	Positivo

CP	2.16

Posición	Protocolo	N° Tubo	Abs450	%PR	Interpretación
M1	iELISA	Blanco	0.03	8.0	NEGATIVO
M2	iELISA	45SS	0.03	8.3	NEGATIVO
M3	iELISA	5 SS	0.02	6.3	NEGATIVO
M4	iELISA	63 GJO	0.03	7.7	NEGATIVO
M5	iELISA	10 SS	0.02	5.7	NEGATIVO
M6	iELISA	16 SS	0.02	6.9	NEGATIVO
M7	iELISA	17 SS	0.03	7.7	NEGATIVO
M8	iELISA	44 SS	0.03	7.2	NEGATIVO
M9	iELISA	45 SS	0.03	8.6	NEGATIVO
M10	iELISA	46 SS	0.09	24.3	POSITIVO
M11	iELISA	47 SS	0.03	8.9	NEGATIVO
M12	iELISA	26 GJO	0.03	8.0	NEGATIVO

M13	iELISA	15 GJO	0.01	2.0	NEGATIVO
M14	iELISA	4 SL	0.02	5.2	NEGATIVO
M15	iELISA	5 SL	0.03	9.2	NEGATIVO
M16	iELISA	6 SL	0.03	8.3	NEGATIVO
M17	iELISA	7 SL	0.34	95.9	POSITIVO
M18	iELISA	8 SS	0.02	6.3	NEGATIVO
M19	iELISA	14 GJO	0.04	12.0	NEGATIVO
M20	iELISA	29 SS	0.03	8.6	NEGATIVO
M21	iELISA	20 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M22	iELISA	21 GJO	0.03	8.3	NEGATIVO
M23	iELISA	36 GJO	0.03	8.6	NEGATIVO
M24	iELISA	4 GJO	0.01	3.1	NEGATIVO
M25	iELISA	35 SS	0.01	3.1	NEGATIVO
M26	iELISA	18 SS	0.02	5.7	NEGATIVO
M27	iELISA	23 SS	0.01	2.6	NEGATIVO
M28	iELISA	15 SS	0.03	8.3	NEGATIVO
M29	iELISA	55 GJO	0.04	10.3	NEGATIVO
M30	iELISA	21 STG	0.02	6.9	NEGATIVO
M31	iELISA	53 GJO	0.03	8.3	NEGATIVO
M32	iELISA	04	0.03	8.3	NEGATIVO
M33	iELISA	19 SS	0.03	7.2	NEGATIVO
M34	iELISA	20 SS	0.03	8.3	NEGATIVO
M35	iELISA	O7	0.03	8.3	NEGATIVO
M36	iELISA	29 GJO	0.03	8.6	NEGATIVO
M37	iELISA	12 GJO	0.03	8.9	NEGATIVO
M38	iELISA	37 GJO	0.03	8.9	NEGATIVO
M39	iELISA	48 SS	0.02	4.6	NEGATIVO
M40	iELISA	11 STG	0.02	4.3	NEGATIVO
M41	iELISA	11 SS	0.03	7.4	NEGATIVO
M42	iELISA	34 GJO	0.02	6.3	NEGATIVO
M43	iELISA	15 STG	0.03	8.0	NEGATIVO
M44	iELISA	5 STG	0.09	25.5	POSITIVO
M45	iELISA	4 STG	0.03	8.9	NEGATIVO
M46	iELISA	39 STG	0.03	9.4	NEGATIVO
M47	iELISA	35 GJO	0.03	9.7	NEGATIVO
M48	iELISA	01	0.02	6.0	NEGATIVO
M49	iELISA	14 STG	0.03	7.2	NEGATIVO
M50	iELISA	40 GJO	0.03	8.9	NEGATIVO
M51	iELISA	3 GJO	0.02	6.9	NEGATIVO
M52	iELISA	16 GJO	0.03	8.0	NEGATIVO
M53	iELISA	27 SS	0.02	6.6	NEGATIVO
M54	iELISA	31 SS	0.03	7.7	NEGATIVO
M55	iELISA	5 GJO	0.03	8.3	NEGATIVO
M56	iELISA	64 GJO	0.03	8.6	NEGATIVO

M57	iELISA	52 GJO	0.03	7.7	NEGATIVO
M58	iELISA	13 SS	0.03	9.2	NEGATIVO
M59	iELISA	43 SS	0.04	10.3	NEGATIVO
M60	iELISA	25 GJO	0.02	6.9	NEGATIVO
M61	iELISA	54 GJO	0.04	10.3	NEGATIVO
M62	iELISA	44 GJO	0.04	10.3	NEGATIVO
M63	iELISA	3 SL	0.03	9.7	NEGATIVO
M64	iELISA	22 SS	0.04	11.2	NEGATIVO
M65	iELISA	21 SS	0.04	11.2	NEGATIVO
M66	iELISA	14 SS	0.05	13.2	NEGATIVO
M67	iELISA	25 SS	0.04	10.3	NEGATIVO
M68	iELISA	33 SS	0.03	9.2	NEGATIVO
M69	iELISA	18 STG	0.03	7.4	NEGATIVO
M70	iELISA	6 GJO	0.02	5.7	NEGATIVO
M71	iELISA	2 SL	0.03	9.4	NEGATIVO
M72	iELISA	37 SS	0.02	6.9	NEGATIVO
M73	iELISA	36 SS	0.01	3.1	NEGATIVO
M74	iELISA	38 SS	0.01	3.1	NEGATIVO
M75	iELISA	3 SS	0.03	8.0	NEGATIVO
M76	iELISA	1 SL	0.03	9.2	NEGATIVO
M77	iELISA	40 SS	0.03	7.7	NEGATIVO
M78	iELISA	17 STG	0.03	7.7	NEGATIVO
M79	iELISA	9 STG	0.01	1.7	NEGATIVO
M80	iELISA	19 STG	0.02	6.0	NEGATIVO
M81	iELISA	17 GJO	0.03	7.4	NEGATIVO
M82	iELISA	12 SS	0.03	7.7	NEGATIVO
M83	iELISA	18 GJO	0.03	8.9	NEGATIVO
M84	iELISA	7 SS	0.03	7.7	NEGATIVO
M85	iELISA	34 GJO	0.03	7.2	NEGATIVO
M86	iELISA	39 GJO	0.02	5.4	NEGATIVO
M87	iELISA	24 SS	0.02	6.6	NEGATIVO
M88	iELISA	9 SS	0.02	6.3	NEGATIVO
M89	iELISA	24 GJO	0.02	5.7	NEGATIVO
M90	iELISA	32 SS	0.02	4.9	NEGATIVO
M91	iELISA	6 SS	0.02	4.3	NEGATIVO

CHEMTEST™

Bovinos

	04/04/2024	**Analista:**	Gabriel Conde Castillo
	2	**T (°C) / HR (%):**	20 °C
Test:	VETLIS® *Brucella* Glyco iELISA Bovinos	**Versión:**	15VL01_v08092022

Esquema de Siembra (91 muestras)

CN	M4	M12	M20	M28	M36	M44	M52	M60	M68	M76	M84
CN	M5	M13	M21	M29	M37	M45	M53	M61	M69	M77	M85
CP	M6	M14	M22	M30	M38	M46	M54	M62	M70	M78	M86
CP	M7	M15	M23	M31	M39	M47	M55	M63	M71	M79	M87
BM	M8	M16	M24	M32	M40	M48	M56	M64	M72	M80	M88
M1	M9	M17	M25	M33	M41	M49	M57	M65	M73	M81	M89
M2	M10	M18	M26	M34	M42	M50	M58	M66	M74	M82	M90
M3	M11	M19	M27	M35	M43	M51	M59	M67	M75	M83	M91

Criterios de Validez	
CP > 1.8	OK
CN < 0.25	OK
BM < 0.20	OK
CP/CN > 7.2	OK
Variación CP < 20%	OK

PR	Interpretación
≤ 14%	Negativo
> 14 ≤ 24%	Indeterminado
> 24%	Positivo

CP	2.16

Posición	Protocolo	N° Tubo	Abs450	%PR	Interpretación
M1	iELISA	Blanco	0.03	7.5	NEGATIVO
M2	iELISA	1 SLD	0.04	11.0	NEGATIVO
M3	iELISA	2 SLD	0.04	11.0	NEGATIVO
M4	iELISA	3 SLD	0.04	10.0	NEGATIVO
M5	iELISA	4 SLD	0.04	10.0	NEGATIVO
M6	iELISA	5 SLD	0.04	10.0	NEGATIVO
M7	iELISA	6 SLD	0.04	10.0	NEGATIVO
M8	iELISA	7 SLD	0.04	10.0	NEGATIVO
M9	iELISA	8 SLD	0.04	10.0	NEGATIVO
M10	iELISA	9 SLD	0.04	10.0	NEGATIVO
M11	iELISA	10 SLD	0.04	10.0	NEGATIVO
M12	iELISA	11 SLD	0.04	10.0	NEGATIVO
M13	iELISA	12 SLD	0.04	10.0	NEGATIVO
M14	iELISA	13 SLD	0.04	10.0	NEGATIVO
M15	iELISA	14 SLD	0.04	10.0	NEGATIVO
M16	iELISA	1 FV	0.04	10.0	NEGATIVO

M17	iELISA	2 FV	0.04	10.0	NEGATIVO
M18	iELISA	1 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M19	iELISA	2 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M20	iELISA	7 GJO	0.03	7.0	NEGATIVO
M21	iELISA	8 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M22	iELISA	9 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M23	iELISA	10 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M24	iELISA	11 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M25	iELISA	13 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M26	iELISA	19 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M27	iELISA	22 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M28	iELISA	23 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M29	iELISA	27 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M30	iELISA	28 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M31	iELISA	30 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M32	iELISA	31 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M33	iELISA	33 GJO	0.13	32.5	POSITIVO
M34	iELISA	38 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M35	iELISA	41 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M36	iELISA	42 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M37	iELISA	43 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M38	iELISA	45 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M39	iELISA	46 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M40	iELISA	47 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M41	iELISA	48 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M42	iELISA	50 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M43	iELISA	56 GJO	0.04	10.0	NEGATIVO
M44	iELISA	57 GJO	0.04	9.0	NEGATIVO
M45	iELISA	58 GJO	0.04	9.8	NEGATIVO
M46	iELISA	59 GJO	0.04	9.8	NEGATIVO
M47	iELISA	60 GJO	0.04	9.8	NEGATIVO
M48	iELISA	61 GJO	0.04	9.8	NEGATIVO
M49	iELISA	1 STG	0.04	9.8	NEGATIVO
M50	iELISA	2 STG	0.04	9.8	NEGATIVO
M51	iELISA	3 STG	0.04	9.8	NEGATIVO
M52	iELISA	6 STG	0.04	10.3	NEGATIVO
M53	iELISA	7 STG	0.04	10.3	NEGATIVO
M54	iELISA	8 STG	0.04	10.3	NEGATIVO
M55	iELISA	10 STG	0.04	10.3	NEGATIVO
M56	iELISA	12 STG	0.04	10.3	NEGATIVO
M57	iELISA	13 STG	0.04	10.3	NEGATIVO
M58	iELISA	16 STG	0.04	10.3	NEGATIVO
M59	iELISA	20 STG	0.04	10.3	NEGATIVO
M60	iELISA	22 STG	0.04	9.5	NEGATIVO

M61	iELISA	23 STG	0.04	9.5	NEGATIVO
M62	iELISA	24 STG	0.04	9.5	NEGATIVO
M63	iELISA	25 STG	0.04	9.5	NEGATIVO
M64	iELISA	1 APL	0.04	9.5	NEGATIVO
M65	iELISA	2 APL	0.04	9.5	NEGATIVO
M66	iELISA	3 SIV	0.13	31.8	POSITIVO
M67	iELISA	9 SIV	0.05	12.0	NEGATIVO
M68	iELISA	10 SIV	0.04	9.3	NEGATIVO
M69	iELISA	11 SIV	0.04	9.3	NEGATIVO
M70	iELISA	12 SIV	0.04	9.3	NEGATIVO
M71	iELISA	13 SIV	0.04	9.3	NEGATIVO
M72	iELISA	1 JM	0.04	9.3	NEGATIVO
M73	iELISA	1 SFE	0.04	9.3	NEGATIVO
M74	iELISA	2 SFE	0.04	9.3	NEGATIVO
M75	iELISA	02	0.04	9.3	NEGATIVO
M76	iELISA	03	0.04	9.3	NEGATIVO
M77	iELISA	1 SIV	0.08	9.3	NEGATIVO
M78	iELISA	2 SIV	0.08	9.3	NEGATIVO
M79	iELISA	1SL	0.04	9.3	NEGATIVO
M80	iELISA	3 SIV	0.04	9.3	NEGATIVO
M81	iELISA	4 SIV	0.04	9.3	NEGATIVO
M82	iELISA	5 SIV	0.04	9.3	NEGATIVO
M83	iELISA	6 SIV	0.04	9.3	NEGATIVO
M84	iELISA	7 SIV	0.04	9.3	NEGATIVO
M85	iELISA	8 SIV	0.04	9.3	NEGATIVO
M87	iELISA	17GJO	0.04	9.3	NEGATIVO
M88	iELISA	52GJO	0.04	9.3	NEGATIVO
M89	IELISA	62GJO	0.04	9.3	NEGATIVO
M90	IELISA	42SS	0.04	9.3	NEGATIVO
M91	iELISA	41SS	0.04	9.3	NEGATIVO

INFORME DE ENSAYOS N.º 0173-2024

Descripción de la muestra	
Solicitantes	Gabriel Conde Castillo
Muestras	Sangre de vacas
Código asignado UEB	INV 173
Estado de la muestra	Liquida
Envase de recepción	Tubos
Análisis requerido(s)	Extracción de DNA y purificación
Fecha de recepción	11 de julio de 2024
Fecha de análisis	11 de julio al 19 de 2024
Fecha de informe	11 de abril de 2024
Técnico asignado	Santiago Santos Jara

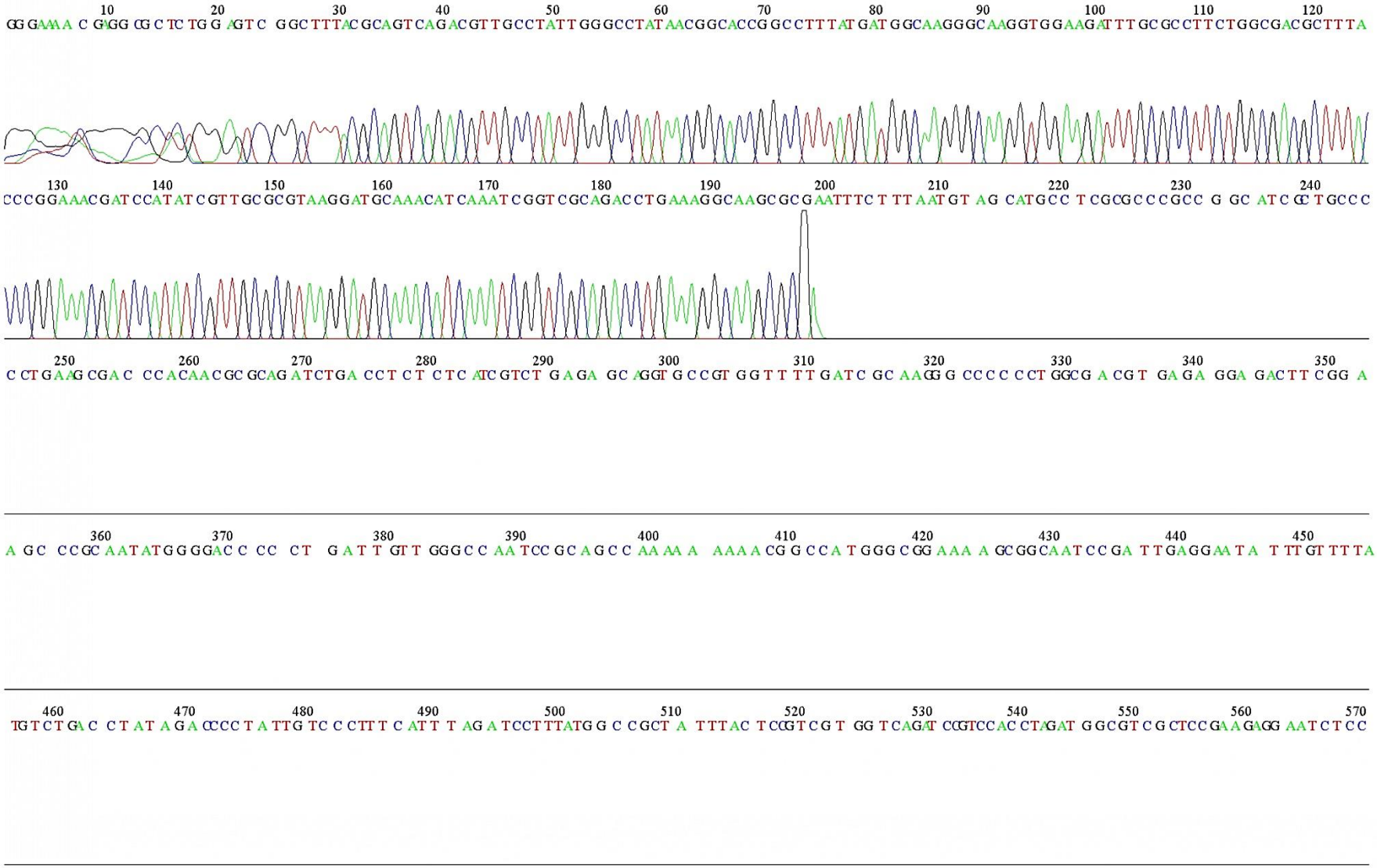
Muestra	n/ul	A260/280	A260/270
C1	14.6	1.69	1.19
C2	32.8	1.79	1.97
C3	19.5	1.90	1.13
C4	50.1	1.81	2.36
C5	38.5	1.76	1.69
C6	31.0	1.76	1.69
C7	54.2	1.81	1.94

Kit utilizado para la extracción: Pure Link Genomic DNA mini Kit

Firmado electrónicamente por: SANTIAGO XAVIER SANTOS JARA	Firmado electrónicamente por: ISIDRO FAVIAN BAYAS MOREJON
Elaborado Ing. Santiago Santos	Revisado Dr. Favian Bayas

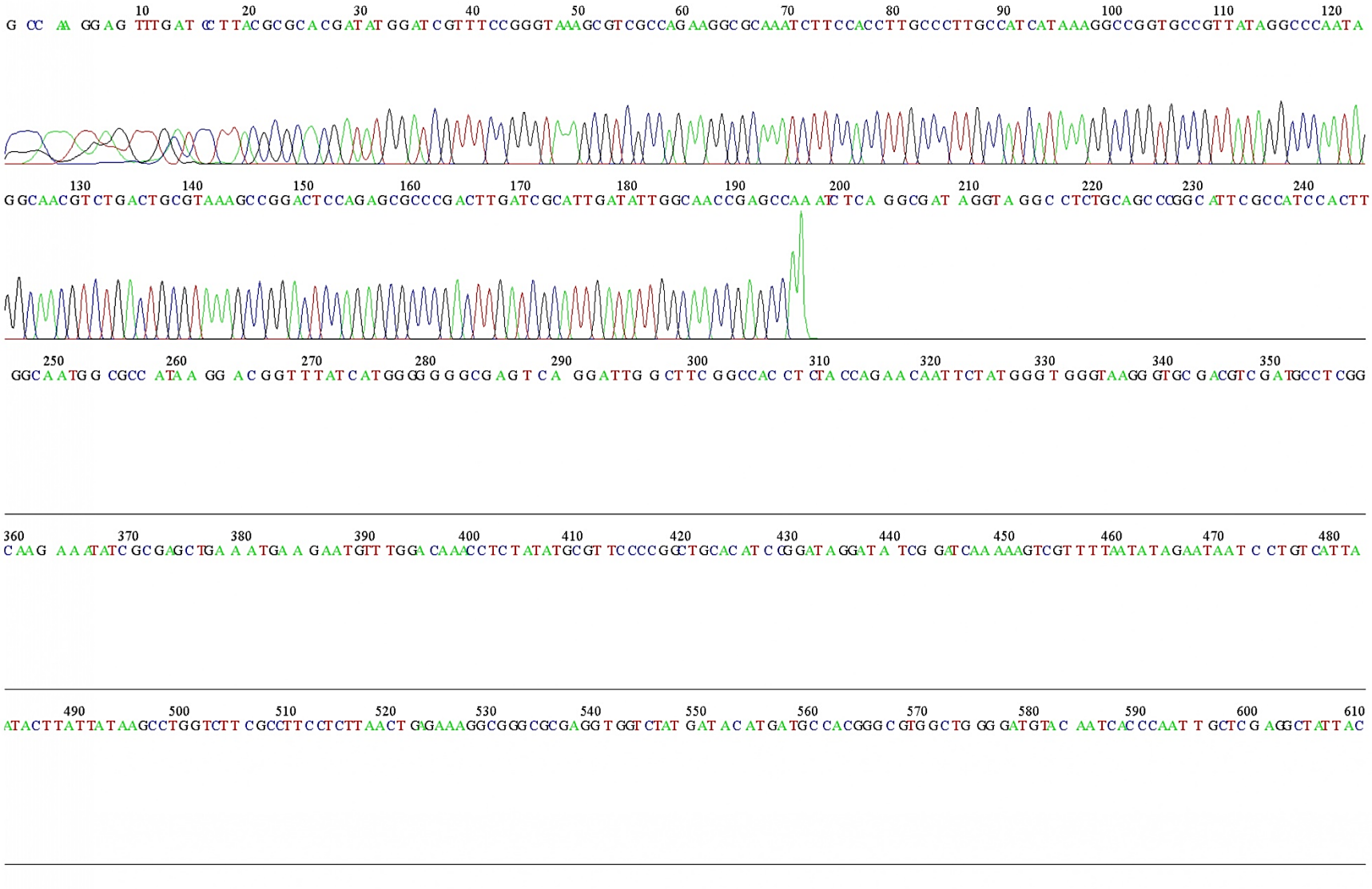
File: 1M_B4.ab1 Run Ended: 2024/7/2 2:12:53 Signal G:1029 A:1234 C:2024 T:1347

Sample: 1M_B4 Lane: 23 Base spacing: 16.014809 2365 bases in 32767 scans Page 1 of 2



File: 1M_B5.ab1 Run Ended: 2024/7/2 2:12:53 Signal G:1414 A:1478 C:3058 T:1898

Sample: 1M_B5 Lane: 21 Base spacing: 16.125698 1181 bases in 13770 scans Page 1 of 2

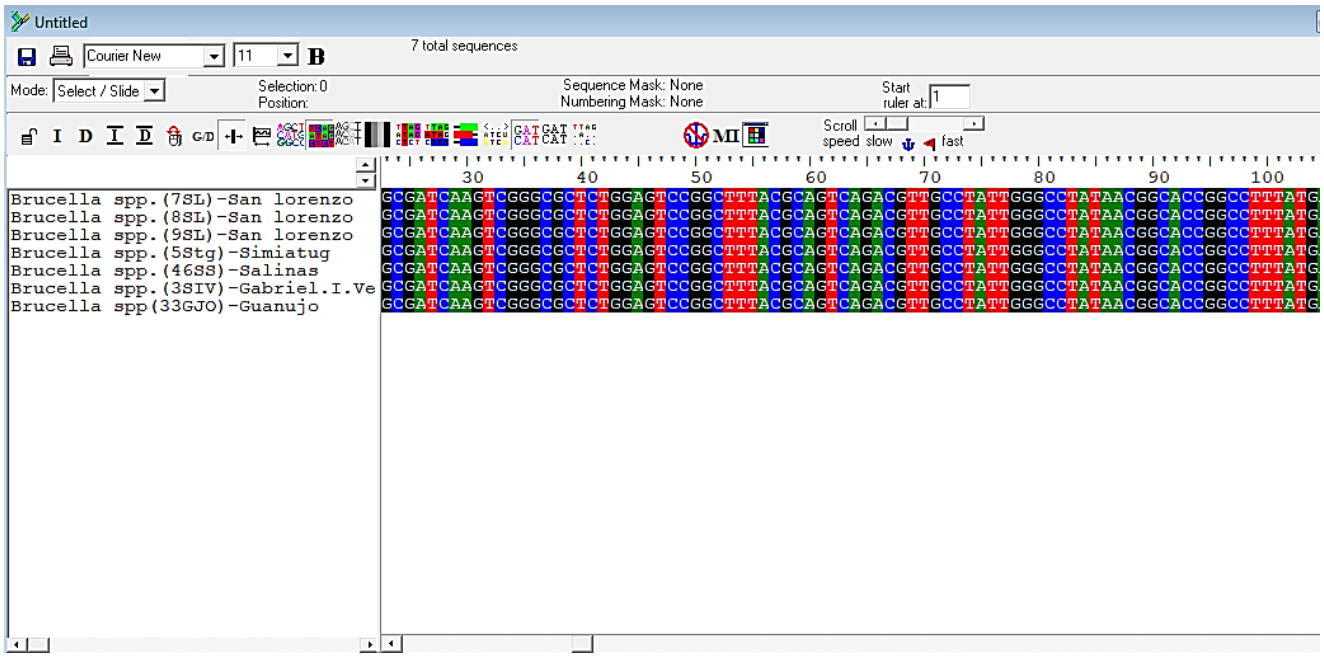


Anexo 4

Secuencias y alineamiento de Brucella spp.

Primers
B4 (forward): 5'- TGGCTCGGTTGCCAATATCAA -3' **B5 (reverse)**: 5'- CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG -3' Reverse complement **B5**: CAGACCTGAAAGGCAAGCGCG
1M Secuencia: (7SL) San lorenzo
TGGCTCGGTTGCCAATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTCCGGCTTTAC GCAGTCAGACGTTGCCTATTGGGCCTATAACGGCACCGGCCTTTATGATGGCAAGGG CAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCTTTACCCGGAAACGATCCATATCGT TGCGCGTAAGGATGCAAACATCAAATCGGTCGCAGACCTGAAAGGCAAGCGCG
2M Secuencia: (8SL) San lorenzo
TGGCTCGGTTGCCAATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTCCGGCTTTAC GCAGTCAGACGTTGCCTATTGGGCCTATAACGGCACCGGCCTTTATGATGGCAAGGG CAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCTTTACCCGGAAACGATCCATATCGT TGCGCGTAAGGATGCAAACATCAAATCGGTCGCAGACCTGAAAGGCAAGCGCG
3M Secuencia: (9SL) San lorenzo
TGGCTCGGTTGCCAATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTCCGGCTTTAC GCAGTCAGACGTTGCCTATTGGGCCTATAACGGCACCGGCCTTTATGATGGCAAGGG CAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCTTTACCCGGAAACGATCCATATCGT TGCGCGTAAGGATGCAAACATCAAATCGGTCGCAGACCTGAAAGGCAAGCGCG
4M Secuencia: (5Stg) Simiátug
TGGCTCGGTTGCCAATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTCCGGCTTTAC GCAGTCAGACGTTGCCTATTGGGCCTATAACGGCACCGGCCTTTATGATGGCAAGGG CAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCTTTACCCGGAAACGATCCATATCGT TGCGCGTAAGGATGCAAACATCAAATCGGTCGCAGACCTGAAAGGCAAGCGCG
5M Secuencia: (46SS) Salinas
TGGCTCGGTTGCCAATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTCCGGCTTTAC GCAGTCAGACGTTGCCTATTGGGCCTATAACGGCACCGGCCTTTATGATGGCAAGGG CAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCTTTACCCGGAAACGATCCATATCGT TGCGCGTAAGGATGCAAACATCAAATCGGTCGCAGACCTGAAAGGCAAGCGCG
6M Secuencia: (3SIV) Gabriel I Veintimilla
TGGCTCGGTTGCCAATATCAACGGTTGCCAATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTC TGGAGTCCGGCTTTACGCAGTCAGACGTTGCCTATTGGGCCTATAACGGCACCGGCC TTTATGATGGCAAGGGCAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCTTTACCCGG AAACGATCCATATCGTTGCGCGTAAGGATGCAAACATCAAATCGGTCGCAGACCTG AAAGGCAAGCGCG

7M Secuencia: (33GJO) Guanujo
TGGCTCGGTTGCCAATATCAATCGGTTGCCAATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCT CTGGAGTCCGGCTTTACGCAGTCAGACGTTGCCTATTGGGCCTATAACGGCACCGGC CTTTATGATGGCAAGGGCAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCTTTACCCG GAAACGATCCATATCGTTGCGCGTAAGGATGCAAACATCAAATCGGTCGCAGACCT GAAAGGCAAGCGCG



Brucella abortus strain CIIMS-NV-4 chromosome I, complete sequence	Brucella abortus	409	409	100%	2e-109	100.00%	2124241	CP025743.1
Brucella melitensis strain CIIMS-BH-2 chromosome I, complete sequence	Brucella melitensis	409	409	100%	2e-109	100.00%	2125700	CP025680.1
Brucella melitensis strain CIIMS-PH-3 chromosome 1, complete sequence	Brucella melitensis	409	409	100%	2e-109	100.00%	2122768	CP026005.1
Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 1	Brucella melitensis	409	409	100%	2e-109	100.00%	2117000	LT963350.1
Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 1	Brucella melitensis	409	409	100%	2e-109	100.00%	2117205	LT963348.1
Brucella melitensis isolate 1 genome assembly, chromosome: 1	Brucella melitensis	409	409	100%	2e-109	100.00%	2117003	LT962953.1
Brucella melitensis strain 2010724553 chromosome 1 sequence	Brucella melitensis	409	409	100%	2e-109	100.00%	2126370	CP016985.1
Brucella suis strain 2004000577 chromosome 1, complete sequence	Brucella suis	409	409	100%	2e-109	100.00%	2107886	CP016981.1
Brucella sp. 2002734562 chromosome 1, complete sequence	Brucella sp. 2002734562	409	409	100%	2e-109	100.00%	2121345	CP016979.1
Brucella canis strain 2010009751 chromosome 1, complete sequence	Brucella cani			100%	2e-109	100.00%	2106942	CP016977.1
Brucella canis strain 2009013648 chromosome 1 sequence	Brucella canis	409	409	100%	2e-109	100.00%	2107069	CP016975.1
Brucella canis strain 2009004498 chromosome 1, complete sequence	Brucella canis	409	409	100%	2e-109	100.00%	2100452	CP016973.1
Brucella abortus strain F1/18-0221 genome assembly, chromosome: 1	Brucella abortus	409	409	100%	2e-109	100.00%	2118235	OY741352.1
Brucella abortus strain LBAB014 chromosome 1, complete sequence	Brucella abortus	409	409	100%	2e-109	100.00%	2121976	CP081951.1
Brucella abortus strain LBAB054 chromosome 1, complete sequence	Brucella abortus	409	409	100%	2e-109	100.00%	2122674	CP081441.1
Brucella abortus strain LBAB053 chromosome 1, complete sequence	Brucella abortus	409	409	100%	2e-109	100.00%	2122629	CP081439.1
Brucella abortus strain LBAB052 chromosome 1, complete sequence	Brucella abortus	409	409	100%	2e-109	100.00%	2099551	CP081437.1
complete sequence	Brucella abortus	409	409	100%	2e-109	100.00%	2122685	CP081435.1

Taxonomy for Brucella sp. 2002734562

www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1891098

Anexo 5

Base de datos

Nro. de Predios	Código	Identificación	Raza	CC 1.5/5	Edad	Parroquia	Sector	Coordenadas	Fecha
Predio 1	1 SIV	Esperanza	Mestiza	3	3 años	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	-1.558491, -78.989671	08/03/2024
	2 SIV	Morena	Mestiza	3	4 años	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	-1.558491, -78.989672	08/03/2024
	3 SIV	Mercedes	Jersey	3	4 años	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	-1.558491, -78.989673	08/03/2024
Predio 2	4 SIV	Sin Cachos	Mestiza	2.75	8 años	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	-1.558137, -78.986817	08/03/2024
	5 SIV	Cachona	Brown Swiss	3.25	10 años	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	-1.558137, -78.986818	08/03/2024
	6 SIV	Cacho Quebrado	Brown Swiss	2.75	2 años	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	-1.558137, -78.986819	08/03/2024
	7 SIV	Cachos Rectos	Brown Swiss	3	5 años	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	-1.558137, -78.986820	08/03/2024
Predio 3	8 SIV	Crema	Brown Swiss	3	6 años	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	-1.560872, -78.987718	09/03/2024
	9 SIV	Pintada	Holstein	3	4 años	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	-1.560872, -78.987719	09/03/2024
	10 SIV	Mulata Oscura	Brown Swiss	2.75	5 años	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	-1.560872, -78.987720	09/03/2024
Predio 4	11 SIV	Crema cachona	Brown Swiss	3.25	5 años	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	-1.564261, -78.989778	09/03/2024
	12 SIV	Crema oscura	Brown Swiss	3	8 años	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	-1.564261, -78.989779	09/03/2024
	13 SIV	Café Oscuro	Mestiza	2.75	10 años	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	-1.564261, -78.989780	09/03/2024
Predio 5	1 SFE	Rafica	Holstein	2.75	5 años	Santa Fé	Moranshuaco	-1.614683, -79.019835	03/03/2024
	2 SFE	Pazmiña	Mestiza	3	6 años	Santa Fé	Moranshuaco	-1.614683, -79.019836	03/03/2024
Predio 6	1 FV	Normandita	Mestiza	3	3 años	Facundo Vela	La Unión	-1.204427, -79.059387	18/03/2024
	2 FV	Negrita Lola	Brown Swiss	3	10 años	Facundo Vela	La Unión	-1.204427, -79.059388	18/03/2024
Predio 7	1 JM	Carishina	Brown Swiss	3	3 años	Julio Moreno	Hoaripata el Espino	-1.582366, -79.030658	10/03/2024

Predio 8	1 APC	Negra	Mestiza	3.5	5 años	Ángel Polibio Chávez	Merced Alta	-1.603709, -79.006543	12/03/2024
	2 APC	Colorada Amarilla	Mestiza	3.5	6 años	Ángel Polibio Chávez	Merced Alta	-1.603709, -79.006544	12/03/2024
Predio 9	1 SLD	Negra	Mestiza	2.75	10 años	San Luis de Pambil	Guagraurco	-1.226872, -79.246082	14/03/2024
	2 SLD	Pequeñita	Mestiza	2.75	4 años	San Luis de Pambil	Guagraurco	-1.226872, -79.246083	14/03/2024
	3 SLD	Fajada	Mestiza	2.5	11 años	San Luis de Pambil	Guagraurco	-1.226872, -79.246084	14/03/2024
	6 SLD	Negra Cachona	Mestiza	2.5	8 años	San Luis de Pambil	Guagraurco	-1.226872, -79.246084	14/03/2024
Predio 10	4 SLD	Pintadita	Mestiza	2.5	3 años	San Luis de Pambil	Tabanal	-1.226658, -79.271531	14/03/2024
	5 SLD	Pintada Grande	Mestiza	2.75	3 años	San Luis de Pambil	Tabanal	-1.226658, -79.271532	15/03/2024
	7 SLD	Pintada pequeña	Mestiza	2.75	4 años	San Luis de Pambil	Tabanal	-1.226658, -79.271531	15/03/2024
Predio 11	8 SLD	Negra Brown Swiss	Mestiza	3.5	6 años	San Luis de Pambil	Río Verde	-1.215481, -79.248485	15/03/2024
	9 SLD	Charo Amarilla	Mestiza	3.5	6 años	San Luis de Pambil	Río Verde	-1.215481, -79.248486	15/03/2024
	10 SLD	Pony Girolando	Mestiza	2.75	3 años	San Luis de Pambil	Río Verde	-1.215481, -79.248487	15/03/2024
	11 SLD	Pony Negra	Mestiza	3	6 años	San Luis de Pambil	Río Verde	-1.215481, -79.248488	16/03/2024
Predio 12	12 SLD	Brown Swiss	Brown Swiss	3	7 años	San Luis de Pambil	Río Verde	-1.219728, -79.252691	16/03/2024
	13 SLD	Loca	Brown Swiss	3	6 años	San Luis de Pambil	Río Verde	-1.219728, -79.252692	16/03/2024
	14 SLD	Roja	Mestiza	3	5 años	San Luis de Pambil	Río Verde	-1.219728, -79.252693	16/03/2024
Predio 13	1 Gjo	Colorada	Mestiza	2.75	2 años y medio	Guanujo	Chaquishca	-1.542157, -78.991729	23/02/2024
	2 Gjo	Cristal	Holstein	3	4 años	Guanujo	Chaquishca	-1.542157, -78.991730	23/02/2024
	3 Gjo	Teresa	Holstein	3	6 años	Guanujo	Chaquishca	-1.542157, -78.991731	23/02/2024
	4 Gjo	Cachudita	Brown Swiss	2.75	6 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551026, -78.986107	23/02/2024

Predio 14	5 Gjo	Cachona	Brown Swiss	2.75	6 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551026, -78.986108	23/02/2024
	6 Gjo	Colorada	Mestiza	3	5 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551026, -78.986109	23/02/2024
	7 Gjo	Negra	Mestiza	2.75	8 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551026, -78.986110	23/02/2024
	8 Gjo	Negra Mocha	Mestiza	2.75	7 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551026, -78.986111	23/02/2024
Predio 15	9 Gjo	Brown Swiss oscura	Brown Swiss	3	10 años	Guanujo	Las Cochas	-1.553557, -78.985410	23/02/2024
	10 Gjo	Julia	Brown Swiss	3	7 años	Guanujo	Las Cochas	-1.553557, -78.985411	23/02/2024
	11 Gjo	Naranja Mulata	Jersey	3	7 años	Guanujo	Las Cochas	-1.553557, -78.985412	23/02/2024
Predio 16	12 Gjo	Cachos pequeños	Mestiza	2.75	5 años	Guanujo	Las Cochas	-1.543315, -78.975292	23/02/2024
	13 Gjo	Negra Coja	Mestiza	2.5	6 años	Guanujo	Las Cochas	-1.543315, -78.975293	23/02/2024
	14 Gjo	Brown swiss	Brown Swiss	3	4 años	Guanujo	Las Cochas	-1.543315, -78.975294	23/02/2024
	15 Gjo	Pequeña	Brown Swiss	3	4 años	Guanujo	Las Cochas	-1.543315, -78.975295	23/02/2024
Predio 17	16 Gjo	Flaca sin Cachos	Brown Swiss	2.75	2 años	Guanujo	Las Cochas	-1.547230, -78.975303	23/02/2024
	17 Gjo	Mocha	Mestiza	3	2 años y medio	Guanujo	Las Cochas	-1.547230, -78.975304	23/02/2024
	18 Gjo	Negra Cachona	Mestiza	3	3 años	Guanujo	Las Cochas	-1.547230, -78.975305	23/02/2024
	19 Gjo	Cacho pequeño	Mestiza	2.75	3 años	Guanujo	Las Cochas	-1.547230, -78.975306	24/02/2024
	20 Gjo	Viejita	Mestiza	2.75	8 años	Guanujo	Las Cochas	-1.547230, -78.975307	24/02/2024
	21 Gjo	Negra Grande	Mestiza	2.75	6 años	Guanujo	Las Cochas	-1.547230, -78.975308	24/02/2024
Predio 18	22 Gjo	Colorada	Brown Swiss	2.75	2 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551680, -78.977556	24/02/2024
	23 Gjo	Pinta Flaca	Holstein	2.75	3 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551680, -78.977557	24/02/2024
	24 Gjo	La negra	Mestiza	2.75	5 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551680, -78.977558	24/02/2024
	25 Gjo	La viejita	Brown Swiss	3	5 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551680, -78.977559	24/02/2024
	26 Gjo	Cara Blanca	Brown Swiss	3	3 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551680, -78.977560	24/02/2024
	27 Gjo	Frente blanca	Brown Swiss	2.75	4 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551680, -78.977561	24/02/2024

	28 Gjo	Pintada Cacho roto	Holstein	2.75	5 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551680, -78.977562	24/02/2024
	29 Gjo	Pintada Gorda	Holstein	2.75	3 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551680, -78.977563	24/02/2024
	30 Gjo	Negra pequeña	Mestiza	2.5	3 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551680, -78.977564	24/02/2024
	31 Gjo	Cachona	Brown Swiss	3	4 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551680, -78.977565	24/02/2024
Predio 19	32 Gjo	Manzanilla	Mestiza	3	6 años	Guanujo	Las Cochas	-1.555852, -78.978490	24/02/2024
Predio 20	33 Gjo	Negrita Cachona	Mestiza	2.5	3 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551958, -78.975622	24/02/2024
	34 Gjo	Mocha	Brown Swiss	3	3 años	Guanujo	Las Cochas	-1.551958, -78.975623	24/02/2024
Predio 21	35 Gjo	Mocha Colorada	Mestiza	2.75	5 años	Guanujo	Paltabamba	-1.581383, -78.977956	25/02/2024
	36 Gjo	Lomo colorado	Jersey	2.75	7 años	Guanujo	Paltabamba	-1.581383, -78.977957	25/02/2024
	37 Gjo	Pintada mochita	Mestiza	2.75	5 años	Guanujo	Paltabamba	-1.581383, -78.977958	25/02/2024
	38 Gjo	Pintada	Mestiza	3	5 años	Guanujo	Paltabamba	-1.581383, -78.977959	25/02/2024
	39 Gjo	Amarilla	Jersey	2.75	3 años	Guanujo	Paltabamba	-1.581383, -78.977960	25/02/2024
	40 Gjo	Atigrada	Jersey	2.75	4 años	Guanujo	Paltabamba	-1.581383, -78.977961	25/02/2024
Predio 22	41 Gjo	Mulata Mocha	Mestiza	2.75	6 años	Guanujo	Paltabamba	-1.582585, -78.974952	25/02/2024
	42 Gjo	Colorada	Mestiza	3	6 años	Guanujo	Paltabamba	-1.582585, -78.974953	25/02/2024
Predio 23	43 Gjo	Camila amarilla	Jersey	3	3 años	Guanujo	Paltabamba	-1.583185, -78.982334	25/02/2024
	44 Gjo	Carmen	Ayrshire	3.25	3 años	Guanujo	Paltabamba	-1.583185, -78.982335	25/02/2024
	45 Gjo	Carmita	Ayrshire	3.25	7 años	Guanujo	Paltabamba	-1.583185, -78.982336	25/02/2024
	46 Gjo	Coneja	Jersey	3	4 años	Guanujo	Paltabamba	-1.583185, -78.982337	25/02/2024
	47 Gjo	Coneja cachona	Jersey	3	4 años	Guanujo	Paltabamba	-1.583185, -78.982338	25/02/2024
	48 Gjo	Juliana 020	Jersey	2.75	4 años	Guanujo	Paltabamba	-1.583185, -78.982339	25/02/2024
	49 Gjo	Juliana 012	Jersey	3	5 años	Guanujo	Paltabamba	-1.583185, -78.982340	25/02/2024
	50 Gjo	Juliana 013	Jersey	3	5 años	Guanujo	Paltabamba	-1.583185, -78.982341	26/02/2024
Predio 24	51 Gjo	Morita	Holstein	3	3 años	Guanujo	Sixipamba	-1.525058, -79.011016	26/02/2024

Predio 25	52 Gjo	Negra Cachona	Mestiza	2.75	4 años	Guanujo	Atandahua	-1.554281, -79.037641	26/02/2024
	53 Gjo	Amarilla Cachona	Mestiza	2.75	3 años	Guanujo	Atandahua	-1.554281, -79.037642	26/02/2024
Predio 26	54 Gjo	Mulata Lola	Mestiza	2.75	3 años	Guanujo	Atandahua	-1.555686, -79.042609	26/02/2024
	55 Gjo	María Pintada	Holstein	3	9 años	Guanujo	Cachiaco	-1.555686, -79.042610	26/02/2024
Predio 27	56 Gjo	Martina	Mestiza	2.5	3 años	Guanujo	Bramadero chico	-1.546081, -79.053638	26/02/2024
	57 Gjo	Fortuna	Mestiza	3	3 años	Guanujo	Bramadero chico	-1.546081, -79.053638	26/02/2024
Predio 28	58 Gjo	Rosa	Mestiza	3	5 años	Guanujo	Bramadero chico	-1.546081, -79.053638	26/02/2024
Predio 29	59 Gjo	Flor de aba	Holstein	2.5	6 años	Guanujo	Quilitahua	-1.551701, -79.053767	26/02/2024
Predio 30	60 Gjo	Gringa	Brown Swiss	2.75	3 años	Guanujo	Yatapamba	-1.543164, -79.054947	26/02/2024
	61 Gjo	Cachosa pintada	Mestiza	2.75	9 años	Guanujo	Yatapamba	-1.543164, -79.054948	26/02/2024
	62 Gjo	Negrita	Mestiza	2.5	4 años	Guanujo	Yatapamba	-1.543164, -79.054949	26/02/2024
	63 Gjo	Ambateña	Mestiza	2.75	8 años	Guanujo	Yatapamba	-1.543164, -79.054950	26/02/2024
Predio 31	64 Gjo	Negra Mocha	Mestiza	2.75	4 años	Guanujo	Bellavista	-1.527463, -78.974069	26/02/2024
Predio 32	1 SS	Fernanda	Mestiza	3	4 años	Salinas	Apahua	-1.463450, -79.040499	27/02/2024
	2 SS	Motonga	Mestiza	3	8 años	Salinas	Apahua	-1.463450, -79.040500	27/02/2024
	3 SS	Princesa	Mestiza	3	4 años	Salinas	Apahua	-1.463450, -79.040501	27/02/2024
Predio 33	4 SS	Blanca	Mestiza	3.5	10 años	Salinas	Apahua	-1.463890, -79.039070	27/02/2024
	5 SS	Yulissa	Mestiza	3	5 años	Salinas	Apahua	-1.463890, -79.039071	27/02/2024
Predio 34	6 SS	Blanquita	Holstein	3	10 años	Salinas	Apahua	-1.463987, -79.031036	27/02/2024
Predio 35	7 SS	Olguita	Mestiza	2.5	6 años	Salinas	Apahua	-1.461724, -79.028177	27/02/2024
	8 SS	Esperanza	Brown Swiss	3	7 años	Salinas	Mercedes de Pumin	-1.434552, -79.036283	27/02/2024

Predio 36	9 SS	Martina	Brown Swiss	3	6 años	Salinas	Mercedes de Pumin	-1.434552, -79.036284	27/02/2024
	10 SS	Tigre	Brown Swiss	3	8 años	Salinas	Mercedes de Pumin	-1.434552, -79.036285	28/02/2024
Predio 37	11 SS	Cotaleña	Mestiza	2.75	8 años	Salinas	Mercedes de Pumin	-1.427580, -79.036964	28/02/2024
	12 SS	Barrosita	Mestiza	2.75	6 años	Salinas	Mercedes de Pumin	-1.427580, -79.036965	28/02/2024
Predio 38	13 SS	María A 012	Holstein	3.5	3 años	Salinas	Mercedes de Pumin	-1.437191, -79.041257	28/02/2024
Predio 37	14 SS	Blanquita	Mestiza	2.5	4 años	Salinas	Mercedes de Pumin	-1.427580, -79.036964	29/02/2024
Predio 39	15 SS	Negra Primeriza	Mestiza	3	2 años	Salinas	Mercedes de Pumin	-1.429766, -79.030168	29/02/2024
	16 SS	Guarandeña	Mestiza	3	5 años	Salinas	Mercedes de Pumin	-1.429766, -79.030169	29/02/2024
Predio 40	17 SS	Martita	Holstein	3	5 años	Salinas	Mercedes de Pumin	-1.433386, -79.033752	29/02/2024
Predio 41	18 SS	María Ángeles 04	Jersey	3	4 años	Salinas	Mercedes de Pumin	-1.437191, -79.041257	01/03/2024
	19 SS	María Ángeles 21	Jersey	3	3 años	Salinas	Mercedes de Pumin	-1.437191, -79.041258	01/03/2024
	20 SS	María Ángeles 15	Holstein	3	5 años	Salinas	Mercedes de Pumin	-1.437191, -79.041259	01/03/2024
	21 SS	María Ángeles 33	Jersey	3.5	2 años	Salinas	Mercedes de Pumin	-1.437191, -79.041260	01/03/2024
Predio 42	22 SS	Flaquita	Mestiza	2.75	6 años	Salinas	Apahua	-1.459111, -79.046026	01/03/2024
	23 SS	Mocha	Mestiza	2.75	4 años	Salinas	Apahua	-1.459111, -79.046026	01/03/2024
Predio 43	24 SS	Negra	Mestiza	2.75	4 años	Salinas	El Estadio	-1.409795, -79.028087	01/03/2024
Predio 44	25 SS	Paridita	Mestiza	2.75	4 años	Salinas	El Estadio	-1.409795, -79.028087	01/03/2024
	26 SS	Martha	Jersey	3	3 años	Salinas	Plancha	-1.417831, -79.035560	01/03/2024

Predio 45	27 SS	Rosita	Mestiza	2.5	4 años	Salinas	Plancha	-1.417831, -79.035561	01/03/2024
	28 SS	María	Ayrshire	2.5	5 años	Salinas	Plancha	-1.417831, -79.035562	01/03/2024
	29 SS	Blanca	Ayrshire	2.75	6 años	Salinas	Plancha	-1.417831, -79.035563	01/03/2024
Predio 46	30 SS	Colorada Cachona	Brown Swiss	2.75	10 años	Salinas	Plancha	-1.426004, -79.037641	02/03/2024
	31 SS	Guarandeñita	Mestiza	2.75	8 años	Salinas	Plancha	-1.426004, -79.037642	02/03/2024
	32 SS	Martita	Mestiza	2.75	12 años	Salinas	Plancha	-1.426004, -79.037643	02/03/2024
	33 SS	Mocha pequeña	Mestiza	3	7 años	Salinas	Plancha	-1.426004, -79.037644	02/03/2024
Predio 47	34 SS	Mocha Barrosa	Brown Swiss	3	5 años	Salinas	Las Minas	-1.404304, -79.037185	04/03/2024
	35 SS	Mocha Mulata	Brown Swiss	3	6 años	Salinas	Las Minas	-1.404304, -79.037186	04/03/2024
	36 SS	Blanca	Mestiza	3	6 años	Salinas	Las Minas	-1.404304, -79.037187	04/03/2024
Predio 48	37 SS	Brava	Brown Swiss	3	6 años	Salinas	El Estadio	-1.405151, -79.026349	04/03/2024
	38 SS	Blancanieves	Brown Swiss	2.75	4 años	Salinas	El Estadio	-1.405151, -79.026350	04/03/2024
	39 SS	Mocha Blanca	Brown Swiss	2.75	3 años	Salinas	El Estadio	-1.405151, -79.026351	04/03/2024
	40 SS	Chiquita	Mestiza	3	5 años	Salinas	El Estadio	-1.405151, -79.026352	04/03/2024
Predio 49	41 SS	Bebé	Brown Swiss	3	8 años	Salinas	Pumin	-1.445264, -79.043129	11/03/2024
	42 SS	Colorada	Mestiza	3	2 años	Salinas	Pumin	-1.445264, -79.043130	11/03/2024
Predio 50	43 SS	Mocha	Mestiza	2.75	2 años	Salinas	San Carlos	-1.431485, -79.019360	11/03/2024
	44 SS	Linda	Brown Swiss	2.75	3 años	Salinas	San Carlos	-1.431485, -79.019361	11/03/2024
	45 SS	Esperanza	Brown Swiss	2.75	3 años	Salinas	San Carlos	-1.431485, -79.019362	11/03/2024
Predio 51	46 SS	Negra 07	Jersey	3	3 años	Salinas	Praga Pumin	-1.449423, -79.047028	11/03/2024
	47 SS	Jersey Pintada	Mestiza	2.5	3 años	Salinas	Praga Pumin	-1.449423, -79.047029	11/03/2024
Predio 52	48 SS	Colorada Gateada	Mestiza	2.5	5 años	Salinas	San Carlos	-1.436751, -79.025207	11/03/2024
	1 SL	Careta	Mestiza	3	4 años	San Lorenzo	Censo Naguan	-1.680994, -78.979920	13/03/2024

Predio 53	2 SL	Negra	Mestiza	3	7 años	San Lorenzo	Censo Naguan	-1.680994, -78.979921	13/03/2024
	3 SL	Pintasa	Holstein	3	9 años	San Lorenzo	Censo Naguan	-1.680994, -78.979922	13/03/2024
Predio 54	4 SL	Aba	Holstein	3	7 años	San Lorenzo	Hundushi	-1.667836, -78.992136	05/03/2024
	5 SL	Colorada	Mestiza	3	7 años	San Lorenzo	Hundushi	-1.667836, -78.992137	05/03/2024
	6 SL	Mulata	Mestiza	3	6 años	San Lorenzo	Hundushi	-1.667836, -78.992138	05/03/2024
	7 SL	Loquita	Mestiza	2.5	3 años	San Lorenzo	Hundushi	-1.667836, -78.992139	05/03/2024
	8SL	Pintada	Holstein	3	4 años	San Lorenzo	Hundushi	-1.667836, -78.992140	01/06/2024
	9SL	Colorada	Jersey	3	4 años	San Lorenzo	Hundushi	-1.667836, -78.992141	01/06/2024
Predio 55	1 Stg	Maigua	Mestiza	2.75	5 años	Simiatug	Huantuquiaco	-1.278079, -78.956000	06/03/2024
	2 Stg	Bachita	Mestiza	2.75	2 años	Simiatug	Huantuquiaco	-1.278079, -78.956001	06/03/2024
	3 Stg	Hechera	Mestiza	2.75	3 años	Simiatug	Huantuquiaco	-1.278079, -78.956002	06/03/2024
Predio 56	4 Stg	Cachuda	Brown Swiss	2.75	7 años	Simiatug	Surupamba	-1.285242, -78.955250	06/03/2024
Predio 57	5 Stg	Negra	Mestiza	2.5	3 años	Simiatug	Surupamba	-1.285188, -78.955250	06/03/2024
	6 Stg	Mulata	Brown Swiss	3	6 años	Simiatug	Surupamba	-1.285188, -78.955251	06/03/2024
	7 Stg	Amarilla	Mestiza	2.75	4 años	Simiatug	Surupamba	-1.285188, -78.955252	06/03/2024
Predio 58	8 Stg	Marta Julia	Mestiza	2.5	7 años	Simiatug	Pimbalo	-1.277827, -78.938255	06/03/2024
Predio 59	9 Stg	Losera/Amarilla	Mestiza	2.75	4 años	Simiatug	Pimbalo	-1.278631, -78.933084	06/03/2024
	10 Stg	Morocha	Mestiza	2.75	6 años	Simiatug	Pimbalo	-1.278631, -78.933085	06/03/2024
Predio 60	11 Stg	Ambateña	Mestiza	2.75	4 años	Simiatug	Pimbalo	-1.280036, -78.938834	06/03/2024
Predio 61	12 Stg	Negra	Mestiza	2.75	5 años	Simiatug	Pimbalo	-1.275553, -78.940390	06/03/2024
Predio 62	13 Stg	Morgana	Mestiza	3	2 años	Simiatug	Pimbalo	-1.273504, -78.936045	06/03/2024
Predio 63	14 Stg	Mulata	Mestiza	2.75	3 años	Simiatug	Pimbalo	-1.272013, -78.939918	06/03/2024
Predio 64	15 Stg	Pintada	Mestiza	2.75	2 años	Simiatug	Pimbalo	-1.275960, -78.931517	07/03/2024
	16 Stg	Negra	Mestiza	3	3 años	Simiatug	Pimbalo	-1.275960, -78.931518	07/03/2024

Predio 65	17 Stg	Mulata	Mestiza	2.5	4 años	Simiatug	Pimbalo	-1.278931, -78.932161	07/03/2024
	18 Stg	Negra	Mestiza	2.5	4 años	Simiatug	Pimbalo	-1.278931, -78.932162	07/03/2024
	19 Stg	Maracha	Mestiza	2.5	3 años	Simiatug	Pimbalo	-1.278931, -78.932163	07/03/2024
Predio 66	20 Stg	Morocha	Mestiza	2.75	3 años	Simiatug	Pimbalo	-1.280444, -78.940508	07/03/2024
	21 Stg	Negra Muca	Mestiza	2.75	5 años	Simiatug	Pimbalo	-1.280444, -78.940509	07/03/2024
	22 Stg	Ambateñita	Mestiza	3	5 años	Simiatug	Pimbalo	-1.280444, -78.940510	07/03/2024
Predio 67	23 Stg	Lola	Mestiza	3	2 años	Simiatug	Pimbalo	-1.278642, -78.939971	07/03/2024
	24 Stg	Morita	Mestiza	2.5	2 años	Simiatug	Pimbalo	-1.278642, -78.939972	07/03/2024
	25 Stg	Cachona Negra	Mestiza	2.75	8 años	Simiatug	Pimbalo	-1.278642, -78.939973	07/03/2024
Predio 68	01	Cachorra	Mestiza	3.5	8 años	San Simón	Tandaguan	-1.651804, -78.975239	21/02/2024
Predio 69	02	Benita	Mestiza	3	2 años	San Simón	Shacundo	-1.647214, -78.974220	21/02/2024
Predio 70	03	Bragadita	Mestiza	2.5	8 años	San Simón	Tandaguan	-1.652608, -78.966259	21/02/2024
	04	Chispidita	Mestiza	2.5	8 años	San Simón	Tandaguan	-1.652608, -78.966260	21/02/2024
Predio 71	05	Pinta Café	Mestiza	2.75	9 años	San Simón	Tandaguan	-1.653702, -78.959543	21/02/2024
	06	Frontina Blanca	Mestiza	3	8 años	San Simón	Tandaguan	-1.653702, -78.959544	21/02/2024
	07	Florcita	Mestiza	2.5	3 años	San Simón	Tandaguan	-1.653702, -78.959545	22/02/2024
	08	Rosita	Mestiza	2.5	7 años	San Simón	Tandaguan Alto	-1.653702, -78.959546	22/02/2024
	09	Luchita	Mestiza	2.5	5 años	San Simón	Tandaguan	-1.653702, -78.959547	22/02/2024
	10	Bertita	Mestiza	2.75	5 años	San Simón	Tandaguan Alto	-1.653702, -78.959548	22/02/2024
Predio 72	11	Lila	Brown Swiss	3.5	5 años	San Simón	Tandaguan Alto	-1.659879, -78.961538	22/02/2024
	12	Liliana	Holstein	3	3 años	San Simón	Tandaguan Alto	-1.659879, -78.961539	22/02/2024

Código	Parroquia	Sector	Signología
1 SIV	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	Retención placentaria
2 SIV	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	Retención placentaria
3 SIV	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	Aborto
9 SIV	Gabriel I Veintimilla	Chalata Alto	Articulaciones inflamadas
1 APC	Ángel Polibio Chávez	Merced Alta	Retención placentaria + Debilidad
2 APC	Ángel Polibio Chávez	Merced Alta	Retención placentaria + Debilidad
1 Gjo	Guanujo	Chaquishca	Debilidad
16 Gjo	Guanujo	Las Cochas	Debilidad
17 Gjo	Guanujo	Las Cochas	Debilidad
18 Gjo	Guanujo	Las Cochas	Debilidad
20 Gjo	Guanujo	Las Cochas	Infertilidad
21 Gjo	Guanujo	Las Cochas	Infertilidad
52 Gjo	Guanujo	Atandahua	Aborto
53 Gjo	Guanujo	Atandahua	Debilidad + Articulaciones Inflamadas
55 Gjo	Guanujo	Cachiaco	Retención placentaria
56 Gjo	Guanujo	Bramadero chico	Debilidad
59 Gjo	Guanujo	Quilitahua	Ganglios Inflamados
60 Gjo	Guanujo	Yatapamba	Infertilidad
63 Gjo	Guanujo	Yatapamba	Debilidad
64 Gjo	Guanujo	Bellavista	Aborto + Retención placentaria
4 SS	Salinas	Apahua	Infertilidad
6 SS	Salinas	Apahua	Infertilidad
8 SS	Salinas	Mercedes de Pumin	Aborto
10 SS	Salinas	Mercedes de Pumin	Aborto
15 SS	Salinas	Mercedes de Pumin	Aborto
16 SS	Salinas	Mercedes de Pumin	Infertilidad
17 SS	Salinas	Mercedes de Pumin	Aborto
22 SS	Salinas	Apahua	Debilidad
27 SS	Salinas	Plancha	Infertilidad
43 SS	Salinas	San Carlos	Debilidad
44 SS	Salinas	San Carlos	Infertilidad
45 SS	Salinas	San Carlos	Aborto
46 SS	Salinas	Praga Pumin	Aborto
47 SS	Salinas	Praga Pumin	Articulaciones inflamadas
4 SL	San Lorenzo	Censo Naguan	Aborto

5 SL	San Lorenzo	Censo Naguan	Aborto
6 SL	San Lorenzo	Censo Naguan	Aborto
7 SL	San Lorenzo	Hundushi	Aborto
3 Stg	Simiatug	Huantuquiaco	Aborto
13 Stg	Simiatug	Pimbalo	Aborto + Retención placentaria + Secreción Vaginal + Debilidad
1	San Simón	Tandaguan	Aborto + Infertilidad
5	San Simón	Tandaguan	Debilidad
12	San Simón	Tandaguan	Debilidad +Inflamación Vulvar

Anexo 6

Ficha de recolección de datos

Ficha de recolección de datos	
Nro. de Muestra:	Cantón: Guaranda
Nombre/Identificación:	Parroquia:
Fecha:	Sector:
Raza:	Nombre de UPA:
Edad:	Propietario:
Condición Corporal:	Tipo de explotación:
Historial de Vacunación:	Notas Adicionales:

Signos Clínicos	**X**
Abortos en el último año	
Infertilidad	
Muerte fetal	
Retención placentaria en los partos	
Debilidad	
Ganglios Linfáticos inflamados	
Inflamación de Articulaciones (Rodillas)	
Inflamación de Testículos (en machos)	
Inflamación de Órganos Sexuales Femeninos (en hembras)	
Secreción Vaginal (en hembras)	
Cojera o Dificultad para Caminar	
Otros Signos Clínicos Relevantes:	

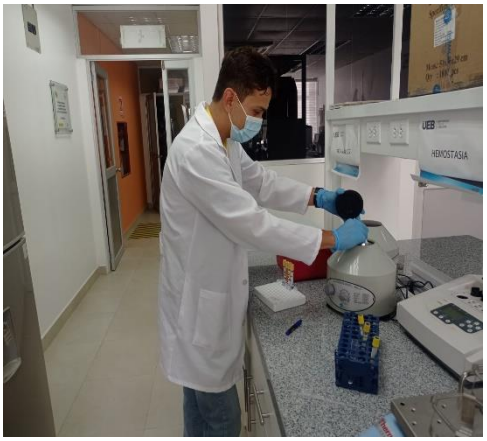
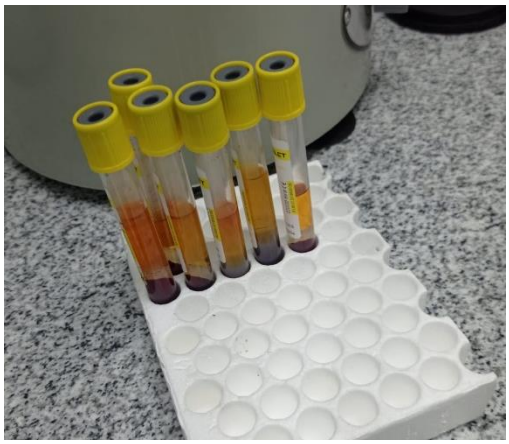
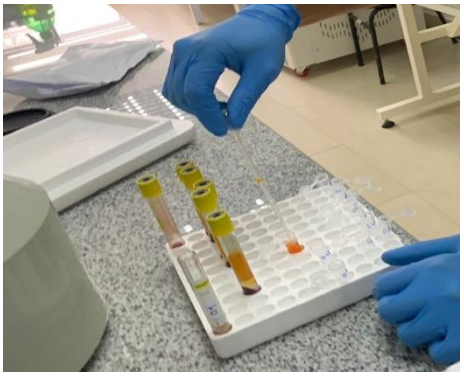
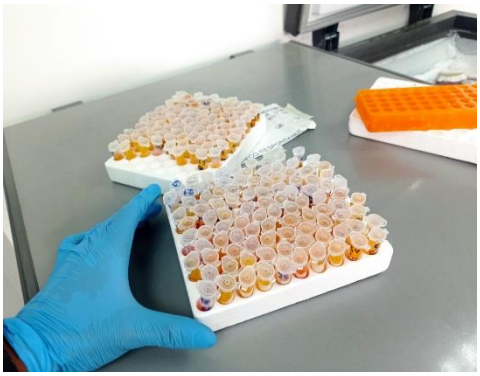
Antecedentes	**Si**	**No**
Se ha diagnosticado Brucelosis antes en la propiedad		
Otros animales de la misma finca con sospecha o confirmación de brucelosis		
Contacto con animales de otras fincas que presentan signos clínicos, sospecha de brucelosis o confirmación de brucelosis		

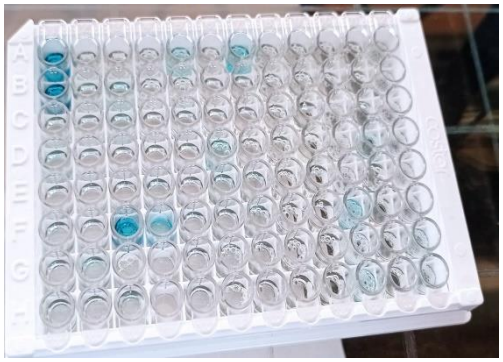
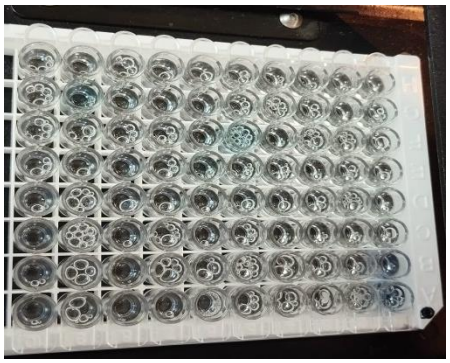
Resultados de Pruebas Diagnósticas	**Positivo**	**Negativo**
Prueba de iELISA		
Prueba Molecular		

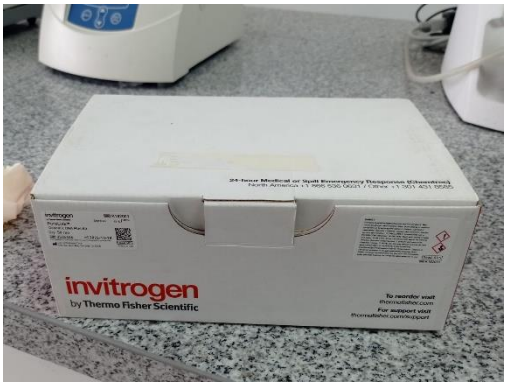
Observaciones:

Anexo 7

Fotografías

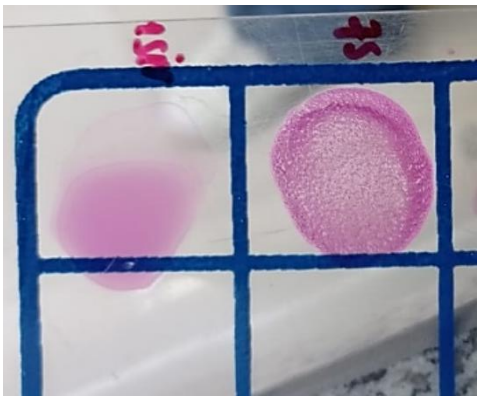
<table>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Recolección de muestras de sangre</td><td>Transporte de muestras</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Centrifugación de muestras</td><td>Obtención de suero</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Separación de suero y rotulado</td><td>180 muestras de suero en tubos Eppendorf</td></tr>
</table>

	
Preparativos para prueba ELISA indirecto	Realización de la prueba iELISA
	
Microplaca 1 de ELISA indireto	Microplaca 2 de ELISA indirecto
	
Lectura del lector de microplacas ELISA	Recolección de muestras sangre de los animales positivos a iELISA

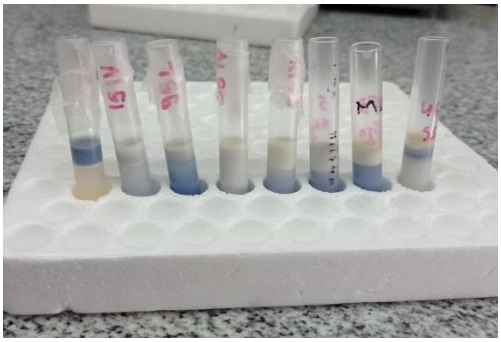
	
Muestras de sangre en tubos con EDTA para extracción de DNA	Kit de extracción de DNA utilizado, Invitrogen
	
Realización de extracción de ADN	Muestras de ADN obtenidas
	
Lectura de concentración y pureza de ADN obtenido - Nanodrop	Paquete enviado con muestras de DNA a Macrogen, Seúl, Corea del Sur



Paquete entregado a Macrogen, Inc



Prueba adicional “Rosa de Bengala”
Muestra positiva: 7SL



Prueba adicional “Milk Ring Test”
Anillo en leche: 7SL y 46SS positivas

Anexo 8

Glosario de términos técnicos

Aerobias: Son bacterias que necesitan oxígeno para sobrevivir y crecer. Se encuentran en una amplia variedad de entornos, incluidos el aire, el agua y el suelo.

Análisis filogenético: Métodos estadísticos utilizados para inferir relaciones entre cepas a partir de datos moleculares, como secuencias de ADN o proteínas.

Antígeno: Es una molécula que desencadena una respuesta del sistema inmunitario. Puede ser una sustancia extraña al cuerpo, como una bacteria o un virus, o una sustancia que el cuerpo produce, como una proteína mal plegada. Los antígenos se encuentran en la superficie de las células, en el interior de las células o en el fluido que rodea a las células. El sistema inmunitario reconoce los antígenos mediante proteínas llamadas anticuerpos.

Caracterización molecular: Conjunto de técnicas de biología molecular utilizadas para identificar y analizar la composición y estructura de moléculas, como el ADN y las proteínas, presentes en un organismo.

Catabolismo: Es el proceso metabólico que descompone las moléculas complejas en moléculas más simples. Este proceso libera energía que se utiliza para las actividades celulares, como la síntesis de proteínas, la división celular y la reparación del ADN.

Catalasas positivas: Bacterias que producen la enzima catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La catalasa es una enzima que se encuentra en muchos organismos vivos, incluyendo bacterias, hongos y plantas. Su función principal es descomponer el peróxido de hidrógeno, un compuesto tóxico que se produce como subproducto del metabolismo celular.

Cebador: Iniciador o primer es una secuencia corta de ADN o ARN de cadena sencilla que sirve como punto de partida para la síntesis de ADN. Son esenciales en diversas técnicas de laboratorio, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la secuenciación del ADN y la expresión génica.

Citocromos: Son proteínas que contienen un grupo hemo, que es un complejo de hierro y un anillo de porfirina. Los citocromos están involucrados en una variedad de reacciones bioquímicas, incluyendo la respiración celular, la fotosíntesis y la degradación de los fármacos.

Genoma: Es el conjunto completo de material genético de un organismo. Está compuesto por ácido desoxirribonucleico (ADN), que es una molécula que contiene instrucciones para el desarrollo y funcionamiento del organismo.

Gramnegativas: Bacterias que no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue: de ahí el nombre de "gramnegativas" o también "Gram-negativas".

Homología génica: Es la relación que existe entre dos o más genes que comparten un origen evolutivo común. Los genes homólogos se derivan de un gen ancestral común que se ha heredado a través de las generaciones.

Inmunodominante: Se refiere a una parte de un antígeno que es reconocida con mayor frecuencia por el sistema inmunitario. Los epítopos inmunodominantes son más propensos a desencadenar una respuesta inmunitaria, como la producción de anticuerpos

Iones: Partículas cargadas eléctricamente que están compuestas por un átomo o molécula que no es eléctricamente neutra.

Oligosacáridos: Son carbohidratos que resultan de la unión de dos a diez monosacáridos. Los monosacáridos son las unidades básicas de los carbohidratos y están compuestos por tres o más átomos de carbono.

Pasteurización: Es un proceso térmico que se utiliza para matar los patógenos que pueden causar enfermedades en caso de la leche 80°C.

Patógeno: Es un agente biológico que puede causar enfermedad en un huésped susceptible. Los patógenos pueden ser virus, bacterias, hongos, protozoos o parásitos.

Perosamina: Es un tipo de molécula de azúcar llamada aminodesoxiazúcar, lo que significa que se deriva de otro azúcar (manosa, en este caso) pero con un grupo

amino (-NH2) que reemplaza a uno de los grupos hidroxilo (-OH). Se encuentra en ciertas bacterias y desempeña un papel en su estructura y función.

Polimorfismos de nucleótido (SNP): Son variaciones en la secuencia de ADN que afectan a sola base.

Primers: Son secuencias cortas de ADN o ARN de cadena sencilla que sirven como puntos de inicio para la síntesis de ADN. Son esenciales en diversas técnicas de laboratorio, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la secuenciación del ADN y la expresión génica.

Proteobacterias α-2: Grupo de bacterias que son muy diversas y desempeñan una amplia gama de funciones en el medio ambiente. Incluyen especies que fijan nitrógeno, degradan materia orgánica y causan enfermedades.

Quinovosamina: Es un tipo de azúcar amino que se encuentra en algunos microorganismos, principalmente bacterias. Al igual que la perosamina, pertenece al grupo de los aminodesoxiazúcares y se deriva de la glucosa, pero con un grupo amino (-NH2) en lugar de un grupo hidroxilo (-OH).

WGS: Secuenciación del Genoma Completo, es una técnica de laboratorio que permite determinar la secuencia completa de ADN de un organismo, es decir, leer la totalidad de la información genética que contiene un genoma.