Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial, siempre y cuando den crédito y licencia a nuevas creaciones bajo los mismos términos.

http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0

Universidad Nacional "San Luis Gonzaga"

Software Antiplagio

UNICHECK

INFORME DE REVISIÓN

Se ha realizado el analisis con el software antiplagio de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga", por parte de los docentes reponsables, al documento cuyo titulo es:

Prevalencia de Brucelosis caprina en el Distrito de Túpac Amaru Inca de la Provincia de Pisco

presentado por:

LUIS ALBERTO ARANGO ESPINO

del nivel **PREGRADO** de la facultad de **MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA** obteniéndose como resultado una coincidencia de **12.22%** otorgándosele el calificativo de:

APROBADO

Se adjunta al presenta el reporte de evaluación del software antiplagio.

Observaciones:

EL BACHILLER PASO SATISFACTORIAMENTE EL SISTEMA ANTIPLAGIO

Ica, **2** de **Julio** de **2021**

FRIEDA GABRIELA SANGUINETI DE RODRIGUEZ
COORDINADOR
SOFTWARE ANTIPLAGIO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EDMUNDO GAMIO GALARZA PORRAS
ASESOR
SOFTWARE ANTIPLAGIO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS

"PREVALENCIA DE BRUCELOSIS CAPRINA EN EL DISTRITO DE TÚPAC AMARU INCA DE LA PROVINCIA DE PISCO"

PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

AUTOR

Bach. LUIS ALBERTO ARANGO ESPINO

ASESOR

M. V. Z. AGUSTIN GUERRERO CANELO

CHINCHA – PERU

2018

DEDICATORIA

A mi familia, por ser los propulsores y motivadores en mi vida personal y profesional.

ÍNDICE GENERAL

		Pag.
COPIA DEL ACTA DE SUSTENTACIÓN		
DEDICATORIA		
ÍNDICE GENERAL		
ÍNDICE DE CUADROS		
ÍNDICE DE FIGURAS		
ÍNDICE DE ANEXOS		
RESUMEN		
ABSTRACT		
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.	ANTECEDENTES	3
2.2.	MARCO TEÓRICO	6
2.2.1.	*Brucella melitensis*	6
2.2.1.1.	Taxonomia	6
2.2.1.2.	Generalidades	7
2.2.1.3.	Extructuras	9
2.2.1.4.	Vias de transmisión	11
2.2.1.5.	Patogenia y signos clínicos	13
2.2.1.6.	Respuesta inmune	17
2.2.1.7.	Hospederos	18
2.2.1.8.	Control	19
2.2.1.9.	Diagnóstico	21

2.2.1.9.1. Prueba de Rosa de Bengala 21
2.2.1.9.2. Tecnica de Fijacion del Complemento 22
2.2.1.10. Prevencion (vacunación) 24
III. MATERIALES Y MÉTODOS 26
3.1. Lugar y fecha de ejecución 26
3.2. Instalaciones utilizadas 27
3.3. Materiales, equipos y reactivos 27
3.4. Tipo de investigación 27
3.5. Metodologia de la investigación 27
3.5.1. Poblacion de estudio 27
3.5.2. Extraccion de muestras de sangre 28
3.5.3. Deteccion de anticuerpos contra *Brucella melitensis* 28
3.6. Variables en estudio 29
3.7. Análisis estadístico 29
IV. RESULTADOS 30
V. DISCUSIÓN 31
VI. CONCLUSIONES 34
VII. RECOMENDACIONES 35
VIII. BIBLIOGRÁFICA 36
IX. ANEXOS 47
1. Condiciones de los establecimientos para la crianza de los caprinos 47
2. Extracción de muestras de sangre de caprinos 47
3. Prueba de Rosa de Bengala: equipos, materiales y reactivos 48
4. Prueba de Rosa de Bengala: análisis de las muestras de suero sanguíneo 48
5. Prueba de Rosa de Bengala: resultados 49

ÍNDICE DE CUADROS

		Pag.
1.	Principales características de las especies del género *Brucella*	6
2.	Características diferenciales de las especies del genero *Brucella*	8
3.	Poblacion de estudio, según los sectores del Distrito de Tupac Amaru Inca de la Provincia de Pisco	28
4.	Resultados de la prueba de Rosa de Bengala, según el Distrito de Tupac Amaru Inca de la Provincia de Pisco	30

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pag.
1.	Estructuras de las bacterias gran negativas	9

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: *Brucella melitensis* causa la Brucelosis caprina y ovina, de amplia distribución mundial. La zoonosis se produce principalmente por contacto directo a través de las mucosas con productos del aborto contaminados con *B. melitensis*, o por consumo de productos lácteos o sus derivados contaminados y no pasteurizados, por lo que es relevante un buen sistema de producción caprina. Afecta a los pequeños rumiantes sexualmente maduros; en las hembras provoca signos clínicos asociados a abortos, retención de placenta y nacimiento de crías débiles, con excreción de los microorganismos a través de las descargas uterinas y en la leche. En los machos produce orquitis y epididimitis. **OBJETIVO:** "Determinar la prevalencia de Brucelosis caprina en el Distrito de Túpac Amaru Inca de la Provincia de Pisco" **MÉTODO:** Se consideraron a toda la población con el criterio de inclusión de caprinos hembras sin vacunación mayores de 3 meses de edad provenientes de 12 hatos con un total de 300 animales, los cuales a través de sus sueros sangineos se evaluaron mediante la prueba de rosa de bengala para la detección de anticuerpos contra *Brucella melitensis*. **RESULTADOS:** El 100% (300/300), resultaron negativos. **CONCLUSIONES:** La prevalencia de Brucelosis caprina en el Distrito de Túpac Amaru Inca de la Provincia de Pisco fue de 0 %, cuyos resultados podrían deberse al efecto positivo del Programa de Control y Erradicación de Brucelosis Caprina conducido por el Ministerio de Salud del Perú (MINSA) y SENASA.

Palabras clave: *Brucella melitensis*, Brucelosis caprina, prevalencia, Pisco.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Brucella melitensis causes caprine and ovine brucellosis, widely distributed throughout the world. The zoonosis is produced mainly by direct contact through the mucous membranes with products of abortion contaminated with B. melitensis, or by consumption of dairy products or their contaminated and unpasteurized derivatives, which is why a good goat production system is relevant. It affects small, sexually mature ruminants; in females it causes clinical signs associated with abortions, retention of placenta and birth of weak offspring, with excretion of microorganisms through uterine discharges and in milk. In males, it produces orchitis and epididymitis. **OBJECTIVE:** "To determine the prevalence of caprine brucellosis in the Tupac Amaru Inca District of the Province of Pisco" METHOD: The entire population was considered with the criterion of inclusion of female goats without vaccination older than 3 months of age from 12 herds with a total of 300 animals, which through their blood samples were evaluated by the test of rose bengal for the detection of antibodies against Brucella melitensis. **RESULTS:** 100% (300/300), were negative. **CONCLUSIONS:** The prevalence of caprine brucellosis in the Tucac Amaru Inca District of the Province of Pisco was 0%, the results of which could be due to the positive effect of the Control and Eradication Program of Goat Brucellosis conducted by the Ministry of Health of Peru (MINSA) and SENASA.

Key words: *Brucella melitensis*, Goat brucellosis, prevalence, Pisco.

I. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es la enfermedad zoonótica más común a nivel mundial, con múltiples presentaciones clínicas y causante de diversas patologías: espondilodiscitis, eurobrucelosis y endocarditis infecciosa (las dos últimas causan la mayor parte de la mortalidad asociada al patógeno), situación que dificulta el diagnostico de no saberse la prevalencia o tener elevada presunción diagnostica (Herrick et al., 2014).

La *Brucella abortus*, es la especie más prevalente y están relacionadas con infecciones bovinas y abortos, por lo que se deben eliminar los animales infectados.

La *B. melitensis*, esta más asociada a la expresión clínica en humanos, debido a la dificultad que supone la erradicación en cabras y ovejas de ganadería extensiva en las regiones endémicas.

B. suis, *B. canis*, *B. maris* y otras, también pueden tener significación clínica; sin embargo, está limitada a áreas endémicas muy restringidas (Hollender et al., 2013).

La brucelosis causada por *Brucella melitensis* es una enfermedad infecciosa de amplia distribución mundial que afecta principalmente a caprinos, considerado su hospedador natural, y también a ovinos (Diaz Aparicio, 2013). La enfermedad es transmitida al hombre, por lo que constituye una de las zoonosis de mayor interés veterinario y de salud pública (Hotez y Gurwith, 2011). Afecta a los pequeños rumiantes sexualmente maduros; en las hembras provoca signos clínicos asociados a abortos, retención de placenta y nacimiento de crías débiles, con excreción de los microorganismos a través de las descargas uterinas y en la leche. En los machos produce orquitis y epididimitis (Lebre et al., 2014).

La transmisión al hombre se produce principalmente por contacto directo a través de las mucosas con productos del aborto contaminados con *B. melitensis*, o por consumo de productos lácteos o sus derivados contaminados y no pasteurizados (Mendez et al., 2011), por lo que esta zoonosis se torna relevante en los sistemas de producción caprina.

La Brucelosis, es considerada como una enfermedad ocupacional, relacionados a la ganadería, matarifes, carniceros, ganaderos, veterinarios y personal de laboratorio (Salgado et al., 1995).

En el Perú la población de caprinos es de aproximadamente 1,038,109; que representa el 4,79% de animales pecuarios (INEI, 2012), de los cuales el 68% se ubican en la Sierra, el 31% en la Costa y el 1% en la Selva. La mayor parte se concentra en manos de pequeños criadores, que carecen de programas de mejoramiento genético, técnicas apropiadas de manejo y sanidad. Estos criadores en su mayoría no tienen establecimientos fijos, siendo transhumantes por la necesidad de buscar alimento para su ganado, el cual representa la fuente de ingresos y sustento para su familia. (Gil y Seminario, 2000).

La presente investigación, tiene como objetivo determinar la prevalencia de Brucelosis caprina en el Distrito de Tupac Amaru Inca de la Provincia de Pisco, Departamento Ica. Para lo cual se utilizará la prueba de aglutinación de Rosa de Bengala, y la confirmación de los sospechosos, mediante la prueba de fijación de complemento. De esta manera conocer la seroprevalencia de Brucelosis caprina, el cual debe ser una vigilancia epidemiológica constante para prevenir la Brucelosis caprina y la zoonosis en Humanos.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ANTECEDENTES

Entre los años 2000 – 2002, la provincia de Callao presentó las tasas más elevadas de infección humana por *Brucella mellitensis* en el Perú, además la crianza de caprinos representa una actividad económica local importante, por lo que se analizaron muestras de sueros de 174 caprinos de 9 hatos de los distritos del Callao y Ventanilla para la seroprevalencia de Brucelosis, usando la prueba de Rosa de Bengala (RB) para descarte y el 2 – mercapto – etanol para confirmación. El 53,7 % (93) de las cabras fue mayor de seis meses; el antecedente de vacunación fue de 38,3 % y 81,9 %, respectivamente. Con RB se obtuvo 10/148 (6,8 %) de cabras positivas en Callao y 0/26 (0 %) en Ventanilla; sólo 7 fueron confirmadas. Persiste el riesgo de Brucelosis humana en el Callao ante la presencia de caprino infectado (Taboada et al., 2005).

Se determinó, la prevalencia de brucelosis en cabras en los Distritos de Paramonga, Pativilca, Barranca y Supe de la Provincia de Barranca, Lima; mediante la prueba de aglutinación de Rosa Bengala en 392 animales de más de 3 meses de edad, que no fueron vacunados contra *Brucella*. No se encontraron muestras positivas, posiblemente debido al programa efectivo de control y erradicación llevado a cabo desde 1997 por el Ministerio de Salud y Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) (Garro et al., 2005).

Se realizó, un estudio epidemiológico para estimar la prevalencia de brucelosis caprina, criadas bajo un sistema semi – estabulado; en los Distritos de San Vicente, Nuevo Imperial y San Luis de la Provincia de Cañete, en Lima. Se colectaron muestras de sangre de 385 animales de 3 o más meses de edad, procedentes de 21 hatos y no vacunados contra *Brucella*. Hubo 4 cabras serorreactoras con la prueba Rosa de Bengala, y sólo una fue confirmada mediante la prueba de Fijación de Complemento, dando una prevalencia de brucelosis caprina de 0,26 ± 0,04%. Esta baja prevalencia podría deberse al efecto positivo del Programa de Control y Erradicación de Brucelosis Caprina conducido por el Ministerio de Salud del Perú (MINSA) y SENASA desde el año 2 000 en la provincia de Cañete (Toledo, et al., 2007).

Se reporta, el estudio epidemiológico de brucelosis en 516 majadas caprinas o mixtas (caprinos/ovinos) de las 3 regiones agroecológicas de la provincia de Formosa, Argentina. Mediante las pruebas de aglutinación en placa con antígeno tamponado y de fijación del complemento en suero sanguineo de 25 401 caprinos y 2 453 ovinos. Además, se realizaron cultivos bacteriológicos y PCR en muestras de leche de cabras de 3 majadas con brucelosis y abortos recientes. Se detectó brucelosis en 4 de los 9 departamentos de la provincia; la prevalencia global fue del 2 % y la intrapredial varió entre el 1 y el 40 %. La proporción de majadas positivas fue del 3,6, 12 y 36 % para las regiones este, centro y oeste, respectivamente. Se aisló *Brucella melitensis* bv. 1 de cabras por primera vez en la provincia. La PCR amplificó fragmentos esperados de 827 pb correspondiente al gen omp2ab (*Brucella spp*.) y de 731 pb correspondiente al inserto IS711 (*B. melitensis*). La detección de anticuerpos en ovinos que cohabitan con caprinos sugiere que las infecciones habrían sido causadas por *B. melitensis*, lo que constituye un riesgo adicional para la salud pública. Los programas de control y erradicación de la brucelosis deberían considerar las majadas mixtas como una sola unidad epidemiológica. Los resultados indican que la brucelosis por *B. melitensis* bv. 1 es altamente endémica en las regiones centro y oeste de la provincia de Formosa. (Russo, et al., 2016).

En Colombia, se estimó, la seroprevalencia de brucelosis en caprinos y en ovinos, en los municipios de Valledupar (Cesar) y Coloso (Sucre). Se realizó un estudio descriptivo prospectivo de corte transversal, que incluyó 329 animales, entre caprinos y ovinos. En el municipio de Valledupar, se muestrearon 209 caprinos, procedentes de diez predios y, del municipio de Coloso, 120 ovinos de cuatro predios. El diagnóstico serológico, se llevó a cabo por la técnica de aglutinación rápida en placa Rosa de Bengala y la técnica de ELISA indirecta, para la detección de anticuerpos en caprinos y en ovinos. La seroprevalencia de *B. abortus*, fue 1,2% (4/329) por la técnica de Rosa de Bengala; estos sueros fueron evaluados por ELISA competitiva, resultando negativos. La seroprevalencia de *B. melitensis* fue del 0%, lo que permitió establecer un riesgo limitado y mínimo, que concuerda con la notificación nunca antes realizada en Colombia. Estos hallazgos confirman la importancia de una vigilancia activa y permanente en estas especies susceptibles. (Tique et al., 2010).

En Mexico, entre los años 2009 y 2012 en la Zona Centro del Estado de Veracruz en 14 municipios, se determinó la seroprevalencia, los factores de riesgo (FR) y la distribución espacial de la brucelosis caprina para lo cual se incluyeron 572 animales de 81 unidades de producción (UP) seleccionadas por conglomerados. El diagnóstico fue en serie con las pruebas de tarjeta (PT) como tamiz y de inmunodifusión radial (IDR) como confirmatoria. La seroprevalencia se determinó con el programa VassarStats® y los FR, por razón de momios (RM). La seroprevalencia general fue del 0,52% (intervalo de confianza [IC] 95%: 0,13 – 1,65) y por UP del 2,47% (IC 95%: 0,43 – 9,46). Se identificaron como FR para la infección las UP en sistema estabulado y la seroconversión a PT por vacunación contra la brucelosis, y, como factor protector, la vacunación. La seroprevalencia y la distribución de la brucelosis caprina son bajas y el sistema intensivo constituye un riesgo, lo cual es consistente con los reportes que guarda la Secretaría de Salud sobre el bajo número de casos humanos en el Estado de Veracruz (Román et al, 2017).

Se determinó, la seroprevalencia de la *Brucella spp* en 455 personas entre 18 y 64 años de edad, que utilizaban la estrategia de Salud de la Familia. Las muestras de suero de los voluntarios fueron sometidas a las pruebas de antígeno acidificado tamponado, como tamizaje; inmunodifusión en gel de agar, pruebas de seroaglutinación lenta en tubos y 2 – mercaptoetanol, como confirmatorias. El 1,98% reaccionó al antígeno acidificado tamponado, el 2,85% reaccionó a la inmunodifusión en gel agar; y el 1,54%, a las pruebas de seroaglutinación lenta en tubos y 2 – mercaptoetanol. La prevalencia de la *Brucella spp* representada por las dos últimas pruebas fue del 4,4%. Los resultados de esta investigación sugieren que la población que ha sido estudiada se encuentra expuesta a la infección por *Brucella spp* (Cavalcanti et al., 2015).

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. *Brucella melitensis*

2.2.1.1. Taxonomía

Dominio **:** Bacteria

Reino **:** *Bacteria*

Filo **:** *Proteobacteria*

Clase **:** *Alphaproteobacteria*

Orden **:** *Rhizobiales*

Familia **:** *Brucellaeae*

Género **:** *Brucella*

Cuadro 1. Principales características de las especies del género *Brucella*

Especies	Biotipos	Hospedador preferencial	Potencial zoonótico
B. melitensis	1 – 3	oveja y cabra	+
B. abortus	1 – 6,9	Vaca, camello, búfalo	+
B. suis	1 – 5	Cerdo (1 – 3), liebre (2), Jabali (2), caribú (4) Reno (4), roedores (5)	+
B. canis	-	Perro	+
B. ovis	-	Oveja	-
B. microti	-	Roedores	
B. neotomae	-	Roedores	-
B. ceti	-	Cetaceos	+
B. pinnipedialis	-	Pinnipedos	+
B. inopinata	-	Humanos	No aplica

Fuente. Godfroid et al., 2011.

2.2.1.2. Generalidades

Son cocobacilos gram negativos de vida intracelular facultativa (Alton et al., 1988), lo que explica la respuesta inmune, la resistencia a ciertos antibióticos y algunas características típicas de la enfermedad (Nicoletti, 2010). No son fermentativos e inmóviles, aunque poseen genes para sintetizar flagelos (Fretin et al., 2005); carecen de los factores de virulencia clásicos (Gorvel y Moreno, 2002). Pueden producir ureasa y reducen los nitratos en nitritos. Los miembros de esta especie son positivos a la prueba de catalasa y, frecuentemente, al test de oxidasa (Alton et al., 1988).

Diferentes propiedades físico – químicas permiten la clasificación de Brucella en especies y biovares (Anon, 2000):

- Requerimientos de CO2.
- Habilidad para usar el ácido glutámico, ornitina, lisina y ribosa.
- Producción de sulfuro de hidrogeno (H_2S).
- Crecimiento en presencia de colorantes: tionina y fucsina básica en concentraciones de 1:25 000, 1:50 000 y 1:100 000.
- Aglutinación con antisueros contra los epítopes A y M del LPS de cepas lisas.
- Actividad de la ureasa.
- Susceptibilidad a bacteriófagos: Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar1 (Iz1) (que diferencian las especies lisas de Brucella) y R/C (para *B. ovis* y *B. canis*).
- Las principales propiedades bioquímicas y características diferenciales con las otras especies o biovares del género *Brucella* se resumen en el cuadro 2. Se considera que la susceptibilidad a la lisis por fagos es especialmente útil para la identificación a nivel de especie y la seroaglutinación, susceptibilidad a colorantes y producción de H_2S es a nivel de biovar (Whatmore, 2009).

Cuadro 2. Características diferenciales de las especies del género Brucella

Especie	Biovariedades	Morfologia	Oxidasa	Ureasa	CO2	H2S	Crecimiento en Colorantes (20 ug/mL)		Aglutinacion con suero monoclonal		Lisis con fagos				
							Tionina	Fucsina	A	M	R	Tb	Wb	Iz	R/C
B. melitensis	1								-	+	-				
	2	L	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
	3								+	+	-				
B. abortus	1						-	+	+	-	-				
	2				+	+	-	-	+	-	-				
	3						+	+	+	-	-				
	4	L	+	+			-	+	-	+	-	+	+	+	-
	5				-	-	+	+	-	+	-				
	6				-	-	+	+	+	-	-				
	9				+/-	+	+	+	-	+	-				
B. suis	1					+		-	+	-	-				
	2					-		-	+	-	-				
	3	L	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	
	4					-		-	+	+	-				
	5				-			-	-	+	-				
B. neotomae		L	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	
B. ovis		R	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
B. canis		R	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	
B. ceti		L	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
B. pinnipedialis		L	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
B. mkicroti		L	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
B. inopinata		L	+	+	-	+	+	+	+	-		-			

Fuente: OIE, 2009a

Cepas de *B. melitensis*, en su mayoría son susceptibles *in vitro* a un gran número de antibióticos: gentamicina, doxiciclina y rifampicina (Maves et al., 2011). La resistencia a la estreptomicina permite diferenciar la cepa vacunal Rev. 1 de *B. melitensis* de otras cepas de biovar 1 de campo susceptibles a este antibacteriano (Alton et al., 1988).

2.2.1.3. Estructuras

Es típica de las bacterias Gram negativas: una membrana citoplasmática, un espacio periplásmico y una membrana externa (Dubray y Plommet, 1976).

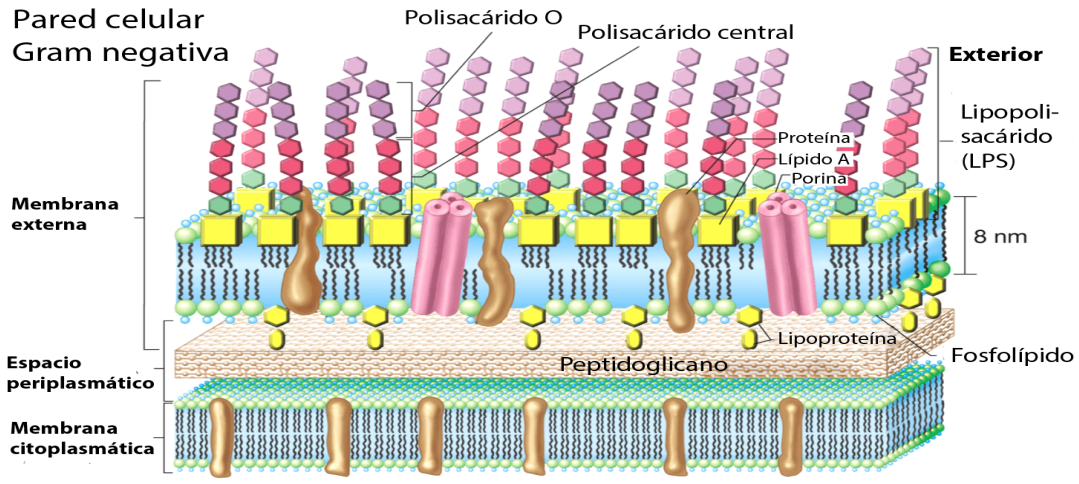

Figura 1. Estructura de las bacterias Gram negativas

Fuente: Dubray y Plommet, 1976.

El lipopolisacárido (LPS) es un componente estructural y funcional esencial para *Brucella* (Cardoso et al., 2006) y es un importante factor de virulencia (Lapaque et al., 2005), su estructura permite la diferenciación del género en dos grupos:

- Lisas (L): con la cadena O completa (*B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*).
- Rugosas (R): con cadena O incompleta o ausente (*B. ovis* y *B. canis*) (Baldwin y Goenka, 2006).

La expresión simultánea de L y R ha sido descrita en *B. melitensis* (Bowden et al., 1993). La estructura química del L de *B. melitensis* formado por el lípido A con dos tipos de aminoglicosa: amidas y ácidos; el núcleo oligosacárido: glucosa, manosa, glucosamina y quinovosamina, entre otros azúcares y un antígeno O en forma de cadenas laterales, formado por homopolímeros lineales de N – formil – perosamina unidos por dos tipos de enlaces, que determinan la forma del LPS (Bundle et al., 1989):

- α – 1,2 (mayoritario en cepas epítopo dominante A)
- α – 1,3 (mayoritario en cepas epítopo dominante M).

Existe un alto grado de similitud entre el LPS no clásico de *Brucella* y LPS clásico de otras bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* O:116, *E. coli* O:157, el grupo N (O:30) de *Salmonella*, *Vibrio cholerae* O:1 y *Yersinia enterocolitica* O:9 (Corbel, 1985b). Por las diferencias en el LPS clásico y LPS no clasico, tienen la capacidad de inducción: interferón (IFN), factor de necrosis tumoral (TNF), capacidad pirógena, etc. (Lapaque et al. 2005).

Debido a la similitud entre el LPS de *Brucella* y el de algunas enterobacterias, existe interferencia diagnóstica cuando se emplean técnicas serológicas basadas en la detección de anticuerpos (Nielsen et al., 2006). El L – LPS está constituido por varios determinantes antigénicos entre los que destacan A y M que están presentes en diferente proporción en las cepas lisas de *Brucella*, la aglutinación de las cepas de *Brucella melitensis* con anticuerpos dirigidos contra estos epítopos permiten la división de esta especie bacteriana en tres biovariedades: 1, 2 y 3 (Cuadro 2).

En ocasiones la diferenciación de los biovares 2 y 3 resulta complicada debido al empleo de sueros monoespecíficos de limitada capacidad discriminatoria y disociación de los cultivos de *B. melitensis* en formas rugosas. Al contrario que en *B. suis*, no existen diferencias evidentes en la epidemiología de los distintos biovares de *B. melitensis* (como la preferencia de hospedador) ni en la clínica a la que dan lugar (Blasco, 2010a).

La existencia de epítopos (C y C/Y) comunes en los serotipos A y M, evidenciada por el empleo de anticuerpos monoclonales, explica las reacciones cruzadas entre

estos serotipos. Se han demostrado que los anticuerpos monoclonales del epítope C muestran una ausencia de reacción cruzada con *Y. enterocolitica* O:9 (Palmer y Douglas, 1989), convirtiéndolos en un elemento específico de las cepas lisas de *Brucella*.

Otras estructuras importantes son las proteínas de membrana, los antígenos citosólicos y el hapteno nativo (HN) (Yang et al., 2011).

El HN posee una estructura química muy similar al O – PS (Moreno et al., 1987). El HN es un componente potencial como diana diagnóstica para la diferenciación de animales vacunados e infectados por cepas lisas de *Brucella*, debido a que, después de un tiempo suficiente tras la vacunación, sólo se detectarían anticuerpos frente al HN de las cepas de campo (Diaz et al., 1984).

La alta especificidad de las proteínas del género *Brucella*, las han convertido de interés para el desarrollo de técnicas específicas para el diagnóstico de *B. melitensis*. A pesar de ello, se ha sugerido la posibilidad de la existencia de reacciones cruzadas con proteínas de *Ochrobactrum anthropi* (Velasco et al., 1997), lo que se debería tener en consideración para la interpretación de los resultados de las técnicas diagnósticas basadas en proteínas de membrana externa.

La fosfaditilcolina (lecitina) es el principal fosfolípido de la membrana externa de los miembros del género *Brucella* (Roop et al., 2009), estando probablemente implicado en su virulencia.

Entre los constituyentes del periplasma, el glucano cíclico, es importante para la osmorregulación y supervivencia bacterina (Gorvel, 2008).

2.2.1.4. Vías de transmisión

Las principales vías de contagio en los pequeños rumiantes son la vía oral (a través de las mucosa orofaríngea), la vía respiratoria (mucosa del tracto respiratorio superior), la vía percutánea y la vía conjuntival a partir del contacto con material contaminado, principalmente fetos, placenta, descargas vaginales etc. derivados del aborto infeccioso (Alton, 1990).

La vía venérea, al contrario que en otras especies de este género, parece ser secundario en la transmisión en la monta natural, aunque se ha demostrado su presencia en el semen de animales infectados, alrededor del 20% de los carneros seropositivos excretan esta bacteria en el semen (Blasco, 2004).

La transmisión pseudo – vertical se produce principalmente durante la lactación a partir de madres infectadas que excretan la bacteria en leche o calostro (Tittarelli et al., 2005a). En menor proporción se puede producir una transmisión vertical a través de la placenta epiteliocorial, típica de los rumiantes. Ambas situaciones conllevan la aparición de animales infectados de manera latente en el rebaño (Díaz Aparicio, 2013), que suponen aproximadamente un 10% de los descendientes de madres infectadas (Blasco, 2010b) representando una potencial fuente de infección para otros individuos susceptibles. Algunos de estos animales podrían permanecer seronegativos (Tittarelli et al. 2005), incluso hasta el primer parto o aborto, pasando desapercibidos a las pruebas serológicas, lo que hace que sea aconsejable el sacrificio de los descendientes de hembras infectadas (Díaz Aparicio, 2013).

La infección a partir de agua circulante es rara y sólo es efectiva en cortas distancias al punto de infección (Samartino et al., 2005).

En la epidemiologia, las dos entradas más caracteristicos de *B. melitensis* en los rebaños de pequeños rumiantes son: la introducción de animales infectados en un rebaño y el uso común de pastos, granjas, material, etc. contaminados con *B. melitensis* (Duran Ferrer y Paramio, 2005).

Los pequeños rumiantes infectados sólo son una fuente de infección durante el periodo de excreción de *B. melitensis* (Alton, 1990), siendo las principales de fuentes: a) fetos, mortinatos, nacidos no viables y anexos fetales, debido al fallo reproductivo. Se consideran los elementos potencialmente más contaminados (hasta $10^{10} – 10^{13}$ UFC/gramo de tejido). b) Excreción vaginal, calostro y leche. En cabras, en las que *B. melitensis* puede aislarse de los exudados vaginales antes del parto, es típico que la excreción bacteriana en leche se repita en lactaciones posteriores y las secreciones vaginales suelen estar ampliamente contaminadas durante largos periodos de tiempo de 2 – 3 meses e incluso hasta un año (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). Sin embargo, en ovejas es raro aislar la bacteria en leche en parideras

posteriores a la del fallo reproductivo (Alton, 1990). Aproximádamente el 80 % de las ovejas seropositivas a *Brucella* eliminan este patógeno en leche en aprox. 10^5 UFC/mL (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). La excreción vaginal en ovino, a menudo observada tan sólo en el 50 % de los reactores (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000) es también más limitada que en las cabras (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001). Esta diferenciación ha de ser generalizada, existen evidencias de una dilatada persistencia de la excreción vaginal y/o en leche durante dos o tres gestaciones posteriores al aborto brucelar en ovino (Tittarelli et al., 2005a). Si la infección se establece de manera permanente en la glándula y/o linfonodos mamarios se puede producir una excreción constante o intermitente a través de la leche, lo que también favorecerá la diseminación y transmisión de *Brucella*. Se considera que aproximadamente en el 80 % de los rumiantes infectados, la bacteria permanece localizada en la glándula mamaria y linfonodo supramamario (Blasco, 2010b). c) Semen. Los carneros pueden estar infectados con *B. melitensis* y sufrir la enfermedad, sobre todo orquitis y epididimitis (Chand et al., 2002). Considerando esta información y la excreción del patógeno por vía vaginal en hembras infectadas, se debe considerar que la monta puede suponer un riesgo para la infección de animales no infectados (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). d) Orina, heces, secreción nasal. La posible excreción por dichas vías las convierte en posibles fuentes de infección que se deben considerar en el control de esta enfermedad, aunque de manera secundaria (Alton, 1990).

2.2.1.5. Patogenia y signos clínicos

Tradicionalmente el género *Brucella* ha incluido bacterias patógenas que no se multiplican en el medio ambiente sino que se transmiten de hospedador a hospedador, en los que se sitúa intracelularmente excepto en la fase previa a su diseminación (Moreno et al., 2002).

A pesar de la patogenia, respueta inmune y signos clínicos causada por *B. melitensis* puede variar en función de diversos factores dependientes del patógeno (especie, cepa, dosis, vía de infección) y del hospedador (especie, edad, sexo, estado fisiológico, inmunización previa, etc.) (Poester et al., 2013).

La patogenia causada por *B. melitensis* en los pequeños rumiantes es muy similar a la de *B. abortus* en el ganado bovino (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001).

La vía de entrada más importante en los pequeños rumiantes es la mucosa oral (Poester et al., 2013), aunque las células M del intestino también han sido identificadas como una posible vía de acceso para *B. melitensis* (Paixao et al., 2009).

La respuesta inmune contra *B. melitensis* cuando invade el sistema digestivo tiene un impacto limitado en su viabilidad (Paixao et al., 2009), posiblemente debido a la acción de la propia bacteria: inhibiendo la secreción de citoquinas, la presentación de antígenos, etc. (Gorvel y Moreno, 2002). *B. melitensis*, en el interior del hospedador (opsonizada y no opsonizada), suele localizarse en el interior de fagocitos mononucleares y polimorfonucleares localizados en la submucosa. La opsonización por anticuerpos tiene un escaso impacto en la supervivencia intracelular de la bacteria (Baldwin y Goenka, 2006).

Muchos mecanismos de virulencia de *Brucella* son aún desconocidos, aunque el LPS es importante para su supervivencia en el interior del hospedador, previniendo la activación de la vía alternativa del complemento (Lapaque et al. 2005). Las cepas rugosas de *Brucella* podrían presentar una menor capacidad de supervivencia debido a que poseen el O – PS defectuoso (Godfroid et al., 1998).

Es importante, la acción de ciertos compuestos antimicrobianos como la lactoferrina, la inducción de citoquinas inflamatorias (TNF – α) y óxido nítrico sintetasa (Jiménez de Bagues et al., 2004).

Cuando los mecanismos inmunitarios consiguen destruir las bacterias, el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II presenta los péptidos en la superficie celular estimulando la respuesta inmune (Díaz Aparicio, 2013).

La *Brucella*, puede sobrevivir en el interior de células fagocíticas: células dendríticas y macrófagos y no fagocíticas: epiteliales, trofoblastos placentarios (Roop et al. 2009). Una vez que se ha unido a células fagocíticas no profesionales, *B. melitensis* es internalizada mediante un proceso de fagocitosis mediada por receptores, posiblemente activado por la propia bacteria, y cambios en el citoesqueleto de la

célula hospedadora, mediados por el sistema de regulación BvrR/BvrS (López et al., 2002).

Aproximadamente el 90 % de las bacterias son destruidas en el interior de macrófagos y células dendríticas (Skendros y Boura, 2013). *B. melitensis*, podría promover el fenómeno de autofagia en los macrófagos infectados (Guo et al., 2012). En el interior de la célula hospedadora estas bacterias se ubican en el retículo endoplásmico rugoso (RER) donde se multiplican siempre de una forma silenciosa (sin interrumpir el ciclo y funciones celulares) e inhibiendo la apoptosis celular, mediado por la cadena O del LPS (Jiménez de Bagues et al., 2004). A pesar de que los motivos del tropismo de *Brucella* por el RER son desconocidos, se han propuesto que la disponibilidad de metabolitos presente en este orgánulo sería atractivo para la bacteria (Gorvel y Moreno, 2002).

El Sistema de Secreción Tipo IV (T4SS), codificado por el locus virB, tiene un papel fundamental en la evasión de la fusión con los lisosomas, permitiendo su persistencia en el RER (Celli et al., 2003). El entorno donde sobrevive *Brucella* es ácido debido a la activación de la bomba de protones ATPasa lo que evita la acción de muchos antibacterianos (Pappas y Papadimitriou, 2007) facilitando su supervivencia intracelular.

A través de la vía linfática, el patógeno en el interior de los macrófagos, llega al linfonodo más cercano al punto de entrada (Ficht y Adams, 2009). Cuando la replicación de *B. melitensis* no es controlada, la bacteria destruye la célula e invade otras células donde se replica de nuevo, también puede multiplicarse extracelularmente en el interior del hospedador (Purcell et al., 2008).

Cuando la *Brucella*, sobrepasa las defensas, pasa a la circulación sanguínea produciéndose una fase de bacteremia de duración variable, dependiendo de la vía de entrada, dosis infectiva, etc.; invadiendo preferencialmente el sistema reproductivo y reticuloendotelial (Ficht y Adams, 2009).

Los más susceptibles a la infección por *B. melitensis* son las hembras gestantes; este patógeno tiene tropismo por la placenta invadiendo los trofoblastos eritrofagociticos de los placentomas y los trofoblastos corioalantoideos donde produce necrosis,

vasculitis y otras lesiones que resultan en la separación de los trofoblastos y epitelio uterino (Anderson et al., 1986) dando lugar al principal signo clínico de esta patología, la aparición de abortos, generalmente durante los dos últimos meses de gestación o nacidos débiles (Alton, 1985b). Se ha relacionado el tropismo de esta bacteria por el útero de los rumiantes con la alta concentración de eritritol presente en este órgano (Keppies et al., 1965). Sin embargo, esta bacteria también se ha aislado de úteros de especies roedores en los que la concentración de esta hormona es baja (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000).

B. melitensis, puede invadir diferentes órganos parenquimatosos y otros tejidos dando lugar a diversos signos clínicos. Las lesiones causadas en los diferentes tejidos y órganos no son patognomónicas como en los ganglios linfáticos puede causar lesiones granulomatosas (Adams, 2002) lo que dificulta el diagnóstico de esta enfermedad.

La infección por *B. melitensis*, puede dar lugar a nacidos viables o abortos en los que no se puede aislar el agente causal (Alton, 1990). Los fetos abortados pueden presentar ascitis y/o hidrotórax sanguinolento, esplenomegalia, hepatomegalia, lesiones necrotizantes en cotiledones que se tornan de un color grisáceo y aspecto pastoso (Poester et al., 2013). Cuando la infección se establece en otros órganos, puede causar placentitis necrotizante, lesiones necrotizantes en testículos, epidídimo y glándulas anexas que evolucionan a granulomas, etc., dando lugar a una signología variada: orquitis, epididimitis, artritis y metritis (Adams, 2002).

2.2.1.6. Respuesta Inmune

La respuesta inmune contra *Brucella* está supeditada al estado fisiológico del hospedador o virulencia de la cepa infectiva (Grillo et al., 2012); generalmente la infección provoca respuesta inmune de tipo celular (Skendros y Boura, 2013), también la respuesta inmune humoral es importante contra este patógeno (Montaraz y Winter, 1986). La respuesta humoral, es muy variable y puede pasar desapercibida cuando se infectan animales sexualmente inmaduros o en hembras preñadas hasta el momento del aborto/parto (World Health Organisation et al., 2006). La respuesta humoral está mayoritariamente inducida por el LPS (Jiménez de Bagues et al., 1992).

Los anticuerpos contra las proteínas de membrana tienen un bajo poder protector contra la infección por *B. melitensis* debido posiblemente a que la mayoría de estas proteínas quedan ocultas por el LPS (Cloeckaert et al. 2002).

La respuesta humoral se inicia aproximadamente dos semanas después de la infección, predominando en fases iniciales la inmunoglobulinas (Ig) M y en una segunda fase la IgG (Alton, 1990). En fases más tardías se producirán IgA, en menor proporción y de manera irregular (Nielsen et al., 1984). En estados más crónicos de infección, las IgG se convierten en el isotipo predominante (Alton, 1990). La Ig M, es la principal responsable de los falsos positivos debido a reacciones cruzadas con otras bacterias (Corbel, 1985) y la Ig G es el principal tipo de anticuerpo reconocido por la mayorías de las pruebas serológicas (Nielsen et al., 2005). Los anticuerpos, el complemento y algunas citoquinas, diferentes de interferón tipo gamma (IFN – γ), producidas por células Natural Killers (NK) podrían complementar la lucha contra *Brucella* en las primeras fases de infección o multiplicación extracelular de la bacteria (Purcell et al., 2008).

La respuesta inmune celular es generalmente de tipo Th1, liderada por macrófagos y linfocitos T y está protagonizada principalmente por el IFN – γ que es esencial en el control de *Brucella* (Zhan y Cheers, 1993). IFN – γ, es producida principalmente por linfocitos T CD4+ y CD8+ (Weynants et al., 1998), también se ha demostrado la participación de CD5+ en su producción (Suraud et al., 2008). *In vitro*, el IFN – γ, estimula la activación de los macrófagos promoviendo la producción de especies reactivas de oxígeno (Jiang et al., 1993), entre otros mecanismos celulares.

La respuesta inmune celular se desencadena principalmente por la acción de proteínas de *Brucella* y igual que la respuesta inmune humoral, es variable y puede no ser detectada (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001).

2.2.1.7. Hospederos

Cabras y ovejas son los principales hospedadores de *B. melitensis*. Este patógeno puede infectar a individuos de todas las edades aunque únicamente causa enfermedad en adultos sexualmente maduros (Scientific Committee on Animal Health and

Animal Welfare, 2001). Todas las razas de cabras se consideran susceptibles a la infección; sin embargo, en el ovino se han observado importantes diferencias asociadas a este factor: las razas de leche y aquellas de cola grasa (Sureste Asiático y Mediterráneo), se consideran más susceptibles a la infección que aquéllas de aptitud cárnica, de raza Maltesa y típicas de América del Sur (Alton, 1990). Tras la recuperación de la infección por *B. melitensis*, las ovejas suelen ser resistentes a infecciones posteriores (Alton, 1990). Las corderas nacidas de madres infectadas procedentes de rebaños crónicamente infectados suelen abortar con menos frecuencia que aquéllas infectadas en rebaños sin historial de brucelosis (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001).

B. melitensis, es el miembro del género con menor especificidad de hospedador dado su gran poder de adaptación a diferentes especies, incluyendo no sólo mamíferos sino también ocasionalmente animales de sangre fría como Clarias gariepinus (el – Tras et al., 2010). *B. melitensis*, ha sido aislada de diferentes especies de ganado, incluyendo vacas (Kahler, 2000), cerdos (Borts et al., 1946), camellos (Godfroid, 2002) y búfalos (Refai, 2002).

La infección de bovino por *B. melitensis* suele estar asociada a la presencia de pequeños rumiantes infectados (Alton, 1990), por lo que su control es en los pequeños rumiantes.

B. melitensis, no suele causar tormentas de abortos en el bovino, aunque puede ser excretada a través de las ubres, por lo que la leche de vaca podría constituir una fuente de infección para sus crías, incluso, para el hombre (Alton, 1990). Los camélidos también han sido reconocidos como una posible causa de brucelosis humana (The Center For Food Security and Public Health, 2009).

B. melitensis, puede infectar otras especies animales como perros y gatos que viven en explotaciones con rebaños infectados, pudiendo actuar adicionalmente como vectores mecánicos de este agente (Seleem et al., 2010).

Se ha descrito la presencia de *B. melitensis* en garrapatas (Ornithodorus) e insectos (Stomoxys calcitrans) aunque su relevancia en la epidemiología de la enfermedad no parece ser decisiva (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000)

Se ha demostrado que los rumiantes salvajes presentan una baja seroprevalencia de brucelosis, por lo que tampoco son esenciales en la transmisión de *B. melitensis* (Munoz et al., 2010), sin embargo se debe mantener una vigilancia, sobre todo en aquellas zonas donde se realiza un manejo artificial de esta fauna salvaje que pueda conllevar ciertas situaciones epidemiológicas en densidades elevadas que favorezcan la transmisión del patógeno desde fauna salvaje a ganado doméstico como se ha observado en Francia (Mick et al., 2014).

2.2.1.8. Control

La brucelosis es una enfermedad cuyo control sólo puede ser abordado a través de la estrategia integral de la sanidad animal y la salud pública (Plumb et al., 2013). Poco después de la descripción de la enfermedad, se puso de manifiesto la relación directa entre la brucelosis ovina y caprina y la enfermedad en humanos: la prohibición del consumo de leche cruda proveniente de cabras supuso un descenso drástico del número de casos de enfermedad entre los miembros de las tropas inglesas (Nicoletti, 2002). Por el contrario, los oriundos del lugar siguieron consumiendo la leche de estos animales por lo que la brucelosis se perpetuó como un grave problema de salud para este sector de la población (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). La principal fuente de infección de *B. melitensis* para los humanos son los animales y/o productos derivados de los mismos (Corbel, 1997).

La ausencia de una vacuna de eficacia probada en humanos (Doménech et al., 2009), hace que la principal medida de lucha contra esta enfermedad, sea el control del patógeno en animales (Zinsstag et al., 2005). La aparición de casos de brucelosis humana puede ser uno de los primeros indicadores de la presencia de la enfermedad en la cabaña ganadera (Alton, 1990). Del mismo modo, el descenso de la incidencia de enfermedad en personas puede servir como indicador del éxito de las campañas de control de *B. melitensis* en ovejas y cabras (Blasco, 2010a).

En la lucha contra la brucelosis causada por *B. melitenis*, se han dedicado tiempo, dinero y esfuerzo sin impacto, e incluso a veces, desalentadores; al contrario de la brucelosis bovina causada por *B. abortus*. Esto es debido a factores inherentes a la propia enfermedad: existencia de estados de latencia asociada a la ausencia de respuesta humoral y medidas de control. Para la erradicación de la enfermedad, no

existe una prueba diagnóstica que permitan identificar la totalidad de los animales infectados (Adone y Pasquali, 2013). Existen factores asociados al patogeno como la relativa inespecificidad de *B. melitensis* para infectar diferentes especies animales (Alton, 1990) y la resistencia ambiental de esta especie bacteriana (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001) y a ciertas prácticas de manejo propias de la producción de los pequeños rumiantes como la trashumancia, aprovechamiento de pastos, etc. (Smits, 2013). Además, el control ha sido tradicionalmente menos exhaustivo que el control de la brucelosis bovina, dado que esta enfermedad ha estado asociada a la producción de pequeños rumiantes propia de zonas marginales y países en vías de desarrollo (Blasco y Molina, 2011).

Existen tres medidas que son efectivas en su prevención y control (Nicoletti, 2010):

a) Estrictas medidas higiénico sanitarias y de manejo

b) Diagnóstico serológico unido al sacrificio de los animales reactores.

c) Vacunación

2.2.1.9. Diagnóstico

El sacrificio de los animales positivos, es un paso imprescindible ya que evita la circulación del patógeno y la infección de animales susceptibles. A pesar de que se han descrito casos de curación espontánea de un 10 – 15% de enfermos (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000); muchos animales infectados pueden quedar como portadores silenciosos, recirculando el patógeno y, en situaciones en las que desciende la inmunidad, pueden dar lugar a los abortos.

2.2.1.9.1. Prueba de Rosa de Bengala

Se trata de una técnica de aglutinación en porta que utiliza como antígeno células de B. abortus S99 o S1119 – 3 teñidas con Rosa de Bengala al 1% (OIE, 2009b) y que detecta principalmente IgM y IgG1 (Crespo, 1994). El antígeno está tamponado con un pH ácido (3,65 ± 0,5) con el fin de limitar la aglutinación debida a IgM y favorecer aquella asociada a IgG1 incrementado así la especificidad de la técnica (Nielsen, 2002).

El fundamento consiste en mezclar el antígeno con el suero problema y observar la aglutinación sobre un fondo de luz blanca en un tiempo de 4 minutos, durante el cual deben realizarse movimientos circulares constantes, un tiempo mayor puede conllevar la formación de coágulos de fibrina (Poester et al., 2010).

El incremento de la cantidad de suero usado (75µl en vez de 25µl) provoca un aumento tanto en la sensibilidad de la técnica como en su correlación con los resultados de la prueba de fijación de complemento en ovino y caprino (Ferreira et al., 2003).

La temperatura es uno de los parámetros que deben controlarse para la conservación del antígeno y para la misma realización del test ya que los resultados pueden verse afectados (Alton, 1990).

La principal característica de esta técnica es su alta sensibilidad, lo que la hace muy adecuada para determinar la presencia o ausencia de infección a nivel de rebaño (OIE, 2009b). Sus bajos requerimientos técnicos, de infraestructura y de personal, la rapidez en la obtención de resultados y el bajo costo son algunas de las características que han hecho que esta herramienta diagnóstica sea ampliamente utilizada desde su descripción.

Los principales inconvenientes que presenta están relacionados con sus limitaciones en términos de sensibilidad y especificidad en determinadas condiciones:

a) Presencia de falsos reactores por interferencia con anticuerpos debidos a la vacunación con Rev. 1, aunque este problema se reduce considerablemente cuando la vacunación se realiza por vía conjuntival (Jiménez de Bagues et al,. 1992).

b) Presencia de falsos negativos por efecto prozona (Nielsen, 2002): ausencia de reacción antígeno – anticuerpo debido a un exceso de anticuerpos.

c) Variación de los valores de sensibilidad de la prueba a nivel individual en función de la prevalencia de la enfermedad, sobre todo en ovejas (Blasco et al., 1994a).

Considerando las características de esta técnica, en muchos países se usa como prueba de screening a nivel de rebaño (Blasco et al., 1994) cuyas reacciones positivas deben ser confirmadas con alguna técnica adicional en ausencia de evidencias de infección. Sin embargo, en aquellas circunstancias en las que la infección ha sido confirmada a nivel de rebaño esta técnica se puede utilizar en paralelo junto con la técnica de Fijación de Complemento (FC) con el fin de incrementar la probabilidad de detección a nivel individual (Garin et al., 2006), pudiéndose observar en ocasiones animales reactores a FC y negativos a RB, especialmente cuando la prevalencia de la enfermedad es reducida (Blasco et al., 1994).

2.2.1.9.2. Técnica de Fijación del Complemento (FC)

Esta prueba se basa en la capacidad del complemento, obtenido a partir de suero cobayas, para lisar eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina. Cuando existen anticuerpos en el suero problema, éstos se unen específicamente a antígenos de *Brucella*, formándose complejos antígeno – anticuerpo a los que se une el complemento (Alton et al., 1988); la cantidad de complemento presente en la reacción disminuye, impidiendo su unión a la hemolisina y previniendo la lisis de los eritrocitos añadidos posteriormente. El complemento del suero problema se inactiva mediante calor a 56°C durante 30 – 60 minutos (Nielsen, 2002). Los anticuerpos que participan en esta reacción son IgM e IgG1 fundamentalmente (Crespo, 1994). Existen dos variantes de la técnica: aquélla en la que la primera incubación se realiza a 37ºC durante 1h (Hill, 1963) y otra en la que se realiza en frío a 4°C durante 18hrs. (Mackinnon, 1963).

En condiciones de campo, la FC puede mostrar una menor sensibilidad que la prueba del RB y, al igual que ésta, presenta una mayor fiabilidad a nivel de rebaño que a nivel individual (Rodríguez Ferri y Crespo, 2000). La sensibilidad está directamente relacionada con la fase de infección en la que se encuentran los animales analizados: en animales crónicamente infectados se han determinado valores de sensibilidad del 88.6% para la FC poniendo en duda la validez de esta técnica diagnóstica a nivel individual (Blasco et al. 1994). Sin embargo en animales clínicamente infectados en una fase aguda, que han sufrido aborto debido a *B. melitensis* y en los que

se observa excreción de la bacteria, la sensibilidad puede alcanzar el 100% (Jiménez de Bagues et al., 1992).

Los inconvenientes que presenta esta técnica se basan en la subjetividad de su interpretación, especialmente para títulos bajos, la complejidad de su realización y la variabilidad de los reactivos, procedimientos, etc. (Garin et al., 2006). Hay que considerar el potencial de actividad anticomplementaria que puede existir en el suero, especialmente si procede de oveja (Alton, 1990), lo que puede conducir a la aparición de falsas reacciones positivas, si bien se ha intentado minimizar este inconveniente con ajustes en el procedimiento de la técnica. Aunque se ha especulado sobre su potencial valor para diferenciar animales vacunados e infectados debido a la incapacidad de la prueba para detectar animales vacunados con Rev. 1 a los 2 – 4 meses tras la vacunación (Kolar, 1984).

En la práctica se ha comprobado que la FC presenta una especificidad relativamente baja cuando se aplica en animales vacunados con Rev. 1 en los meses posteriores a la inmunización, especialmente si la vacunación se realiza por la vía subcutánea (Diaz Aparicio et al., 1994), y en caso de animales sensibilizados con ciertas bacterias como *Y. enterocolítica* O:9 (Garin et al., 2006).

La FC se ha usado ampliamente como técnica confirmatoria en los programas de erradicación y control de Brucelosis caprina (Garin et al., 2006).

2.2.1.10. Prevención (Vacunación)

En general, la vacunación suele estar dirigida a los sujetos más susceptibles a la enfermedad con el fin de estimular las defensas del individuo. Sin embargo en brucelosis, los animales objeto de vacunación son los menos susceptibles a la enfermedad (hembras primíparas no gestantes), mientras que la vacunación está totalmente contraindicada en los animales más susceptibles (hembras preñadas) (Nicoletti, 2010).

Se han expuesto las características que debería presentar la vacuna ideal contra la brucelosis (Olsen, 2013):

a) Conferir inmunidad duradera y sólida en una sola dosis.

b) Inducir inmunidad cruzada con especies del género Brucella.

c) Ser inocua para todos los individuos.

d) No producir interferencia diagnóstica con las pruebas serológicas empleadas tradicionalmente.

e) Avirulenta para el hombre y sin resistencia alguna a los antibióticos.

f) No producir contaminación ambiental.

g) Estable y económicamente viable.

La vacuna ideal propuesta, dista mucho de aquéllas disponibles. En brucelosis de los pequeños rumiantes, la vacuna más efectiva disponible es la Rev. 1 (Robinson, 2003), es eficiente en la prevención del aborto y transmisión de brucelosis, pero no así la prevención de la infección y la seroconversión tras la exposición a cepas de campo (Olsen, 2013). El éxito de la utilización de una cepa viva en la inmunización reside en el equilibrio entre una óptima colonización del hospedador que permita inducir una protección suficiente frente a cepas de campo y un índice de replicación limitado que minimice la virulencia de la cepa vacunal (Elzer et al., 2002). A pesar de que no se conocen los parámetros concretos para evaluar la protección inducida por una vacuna contra *B. melitensis,* se ha demostrado que una vacuna eficaz frente a *B. melitensis* debe estimular la respuesta inmune innata, activar las células CD8+ y CD4+y generar una efectiva población de células de memoria (Olsen, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar y fecha de ejecución

El presente estudio se llevo a cabo en el Distrito de Tupac Amaru Inca de la Provincia de Pisco. La Provincia de Pisco, es una de las cinco provincias que conforman el Departamento de Ica, bajo la administración del Gobierno Regional de Ica. Fue creada mediante Ley del 19 de octubre de 1900. La denominación de Pisco, proviene de la voz quechua "pisqu", que significa pájaro o ave. Y los antiguos pobladores le dieron este nombre debido a la existencia de numerosas aves que hay en el mar tanto en el puerto, en la bahía, península e islas. Cabe precisar que el 23 de noviembre de 1640, la provincia de Pisco fue fundada por el virrey del Perú Pedro Toledo y Leyva.

Distritos de la provincia de Pisco:

- Pisco
- Huancano
- Humay
- Independencia
- Paracas
- San Andrés
- San Clemente
- Tupac Amaru Inca

El estudio se realizó desde Diciembre (2018) – Mayo (2019) en el Distrito de Túpac Amaru.

Límites del Distrito de Túpac Amaru Inca:

- Al norte con la provincia de Chincha.
- Al este con el Departamento de Huancavelica.
- Al sur con la provincia de Ica.
- Al oeste con el océano Pacífico.

3.2. Instalaciones utilizadas

- Establos para la crianza de caprinos (ver anexo 1).
- Laboratorio de inmunología de la FMVZ – UNICA.

3.3. Materiales, equipos y reactivos

Materiales:

- Tubos al vacío (Vacutainer de 10 ml) y agujas Vacutainer.
- Mezcladores (palitos de madera desechables).
- Tips descartables de 20 – 200 uL.
- Caja térmica con refrigerante.

Equipos:

- Refrigeradora.
- Micropipeta digital de precisión con rango de medida de 20 – 200 uL.
- Aglutinoscopio.

Reactivos:

- Antígeno Rosa de Bengala (Cepa *Brucella abortus* 119 – 3 al 8 %, pH de 3,65).

3.4. Tipo de investigación

Epidemiológica, no experimental (Estudio prospectivo – transversal – de nivel descriptivo).

3.5. Metodología de la investigación

3.5.1. Población de estudio:

300 caprinos hembras sin vacunación mayores de 3 meses de edad del Distrito de Túpac Amaru Inca, el cual cuenta con 12 hatos de ganados caprinos con un total 575 animales. En el cuadro 1 se observan las procedencia de los animales.

Cuadro 3. Poblacion de estudio, según los sectores del Distrito de Túpac Amaru Inca de la Provincia de Pisco. Año 2019.

Nº	Ganaderos	Sectores	Población	
			Total	%
1	Gavino Emilio Ballarte Bardales	San Carlos bajo	20	6,67
2	Jhon Dany Olivares Melgar	San Carlos bajo	15	5,00
3	Yoel Yauricaza Diaz	San Carlos bajo	18	6,00
4	Yhon Edson Olivares Melgar	San Carlos bajo	22	7,33
5	Edwin Iman Vidarte	San Carlos bajo	23	7,67
6	Jose Yauricaza Curo	San Carlos bajo	15	5,00
7	Joel Diaz Mansilla	San Carlos alto	20	6,67
8	Nery Quispe Omonte	San Carlos alto	30	10,00
9	Raúl Nolberto Flores	San Carlos alto	15	5,00
10	Saul Guadalupe Bravo	San Carlos alto	21	7,00
11	Bryan Carpio Arellano	San Carlos alto	28	9,33
12	Jeanpierre Torres Saravia	Monte fuerte	73	24,33
Total			300	100,00

3.5.2. Extracción de muestras de sangre

- Se realizó la asepsia a nivel de la vena yugular y se extrajo 3 a 4 mL. de sangre (ver anexo 2).
- Se dejo reposar la sangre en tubos vacutaimer sin anticougulante en forma inclinada para la coagulación sanginea y liberacion del suero sanguíneo.
- Se remitieron al laboratorio de Inmunologia de la FMVZ, 300 sueros sanguíneos almacenados en viales y conservados a temperatura de refrigeración.

3.5.3. Detección de anticuerpos contra *Brucella melitensis*

Se realizó mediante la prueba de la Rosa de Bengala, con una concentración de *Brucella abortus*, inactivada por calor y fenol, tiene una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 99,5 % (Rajme, 2017). Se emplea como prueba Tamiz, por ser una prueba estándar para el diagnóstico de la brucelosis en el país y como prueba confirmatoria la prueba de Fijacion del Complemento.

3.5.3.1. Prueba de Rosa de bengala

- Los sueros y el antígeno se temperaron al medio ambiente.
- Se colocó75 uL de cada suero sobre los cuadrados del aglutinoscopio.
- Se adicionó, 25 uL de antígeno de Rosa de Bengala al costado de cada suero.
- Se mezcló el suero y el antígeno con los mezcladores, formando áreas de aproximadamente 2 cm de diámetro.
- Se agitó el aglutinoscopio en círculos de sentido horario y antihorario durante 4 minutos a razón de 10 a 12 movimientos por minuto.

3.5.3.2. Lectura

- Se realizó a los 4 a 5 minutos como lo recomienda Sánchez (1996).
- **Positivos (P),** es considerado cuando se observa aglutinación o grumos.
- **Negativos (N),** cuando no se observa aglutinación o grumos.

3.6. Variable en estudio

- Variable independiente: suero sanguíneo de caprinos hembras de más de 3 meses de edad, en buenas condiciones sanitarias.
- Variable dependiente: presencia/ausencia de anticuerpos contra *Brucella melitensis.*

3.7. Análisis estadístico

Para determinar la prevalencia de la *Brucella melitensis* en los caprinos, se empleó la siguiente fórmula de la prevalencia de periodo:

$$P = \frac{\text{Reactores positivos}}{\text{Total de la población}} \times 100$$

IV. RESULTADOS

La presente investigacion se realizó en el Distrito de Túpac Amaru Inca de la Provincia de Pisco durante el periodo Diciembre (2018) – Mayo (2019), con el objetivo de determinar la prevalencia de Brucelosis caprina, debido a su desconocimiento estadístico. Para la investigación se consideraron a toda la población con el criterio de inclusión de caprinos hembras sin vacunación mayores de 3 meses de edad provenientes de 12 hatos con un total de 300 animales. Los resultados de la prueba de rosa de bengala se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 4. Resultados de la prueba de rosa de bengala, según el Distrito de Tupac Amaru Inca. 2019

Nº	Ganaderos	Población		Rosa de bengala
		Total	%	Positivo (%)
1	Gavino Emilio Ballarte Bardales	20	6,67	0/20 (0)
2	Jhon Dany Olivares Melgar	15	5,00	0/15 (0)
3	Yoel Yauricaza Diaz	18	6,00	0/18 (0)
4	Yhon Edson Olivares Melgar	22	7,33	0/22 (0)
5	Edwin Iman Vidarte	23	7,67	0/23 (0)
6	Jose Yauricaza Curo	15	5,00	0/15 (0)
7	Joel Diaz Mansilla	20	6,67	0/20 (0)
8	Nery Quispe Omonte	30	10,00	0/30 (0)
9	Raúl Nolberto Flores	15	5,00	0/15 (0)
10	Saul Guadalupe Bravo	21	7,00	0/21 (0)
11	Bryan Carpio Arellano	28	9,33	0/28 (0)
12	Jeanpierre Torres Saravia	73	24,33	0/73 (0)
Total		300	100,00	00,00 (0)

De acuerdo al cuadro 3, el 100 % de las muestras resultaron negativas.

V. DISCUSIÓN

El 100 % (300/300) de las muestras de suero sanguíneo resultaron negativos a la presencia de anticuerpos contra Brucella melitensis cuyos resultados a nivel nacional son similares a los reportados por los Distritos de Paramonga, Pativilca, Barranca y Supe de la Provincia de Barranca, Lima; en los cuales se evaluaron 392 animales de mas de 3 meses de edad y no vacunados contra Brucella mediante la prueba de aglutinación de Rosa Bengala. No se encontraron muestras positivas, posiblemente debido al programa efectivo de control y erradicación llevado a cabo desde 1997 por el Ministerio de Salud y Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) (Garro et al., 2005); sin embargo se obtuvieron menores resultados comparado a los reportes entre los años 2000 – 2002, en la Provincia del Callao: distrito del Callao obtuvieron 10/148 (6,8 %) de cabras positivas mediante la prueba de rosa de brengala y 0/27 (0 %) en Ventanilla; de los cuales 7 fueron confirmadas con el 2 – mercapto – etanol (Taboada et al., 2005), a si mismo al estudio epidemiológico realizado en los Distritos de San Vicente, Nuevo Imperial y San Luis de la Provincia de Cañete (Lima), en 385 cabras de 3 o más meses de edad procedentes de 21 hatos y no vacunados contra Brucella, criadas bajo un sistema semi – estabulado, de los cuales 4/385 (1,04 %) fueron serorreactoras con la prueba Rosa de Bengala, y sólo una fue confirmada mediante la prueba de Fijación de Complemento, dando una prevalencia de brucelosis caprina de 0,26 ± 1,04%. Esta baja prevalencia podría deberse al efecto positivo del Programa de Control y Erradicación de Brucelosis Caprina conducido por el Ministerio de Salud del Perú (MINSA) y SENASA desde el año 2 000 en la provincia de Cañete (Toledo, et al., 2007).

A nivel internacional, comparado con Argentina, en la se realizo un estudio epidemiológico en 516 majadas caprinas o mixtas (caprinos/ovinos) de las 3 regiones agroecológicas de la provincia de Formosa, Argentina. Mediante las pruebas de aglutinación en placa con antígeno tamponado y de fijación del complemento en suero sanguineo de 25 401 caprinos y 2 453 ovinos. Además, se realizaron cultivos bacteriológicos y PCR en muestras de leche de cabras de 3 majadas con brucelosis y abortos recientes. Se detectó brucelosis en 4 de los 9 departamentos de la provincia; la prevalencia global fue del 2 % y la intrapredial varió entre el 1 y el 40 %. La proporción de majadas positivas fue del 3,6, 12 y 36 % para las regiones este, centro

y oeste, respectivamente. Se aisló *Brucella melitensis* bv. 1 de cabras por primera vez en la provincia. La PCR amplificó fragmentos esperados de 827 pb correspondiente al gen omp2ab (*Brucella spp*.) y de 731 pb correspondiente al inserto IS711 (*B. melitensis*). La detección de anticuerpos en ovinos que cohabitan con caprinos sugiere que las infecciones habrían sido causadas por *B. melitensis*, lo que constituye un riesgo adicional para la salud pública. Los programas de control y erradicación de la brucelosis deberían considerar las majadas mixtas como una sola unidad epidemiológica. Los resultados indican que la brucelosis por *B. melitensis* bv. 1 es altamente endémica en las regiones centro y oeste de la provincia de Formosa. (Russo, et al., 2016).

Con respecto a Colombia, la seroprevalencia de brucelosis en 209 caprinos procedentes de 10 predios y 120 ovinos de 4 predios de los municipios de Valledupar (Cesar) y Coloso (Sucre), respectivamente. El diagnóstico serológico, se llevó a cabo por la técnica de aglutinación rápida en placa Rosa de Bengala y la técnica de ELISA indirecta, para la detección de anticuerpos en caprinos y en ovinos. La seroprevalencia de *B. abortus*, fue 1,2% (4/329) por la técnica de Rosa de Bengala; estos sueros fueron evaluados por ELISA competitiva, resultando negativos. La seroprevalencia de *B. melitensis* fue del 0%, lo que permitió establecer un riesgo limitado y mínimo, que concuerda con la notificación nunca antes realizada en Colombia. Estos hallazgos confirman la importancia de una vigilancia activa y permanente en estas especies susceptibles. Tique et al., 2010).

En Mexico, entre los años 2009 y 2012 en la Zona Centro del Estado de Veracruz en 14 municipios, se determinó la seroprevalencia, los factores de riesgo (FR) y la distribución espacial de la brucelosis caprina para lo cual se incluyeron 572 animales de 81 unidades de producción (UP) seleccionadas por conglomerados. El diagnóstico fue en serie con las pruebas de tarjeta (PT) como tamiz y de inmunodifusión radial (IDR) como confirmatoria. La seroprevalencia se determinó con el programa VassarStats® y los FR, por razón de momios (RM). La seroprevalencia general fue del 0,52 % (intervalo de confianza [IC] 95%: 0,13 – 1,65) y por UP del 2,47% (IC 95%: 0,43 – 9,46). Se identificaron como FR para la infección las UP en sistema estabulado y la seroconversión a PT por vacunación contra la brucelosis, y, como factor protector, la vacunación. La seroprevalencia y la distribución de la brucelosis

caprina son bajas y el sistema intensivo constituye un riesgo, lo cual es consistente con los reportes que guarda la Secretaría de Salud sobre el bajo número de casos humanos en el Estado de Veracruz (Román et al, 2017).

Con respecto a la salud publica, en Brasil, se determino la seroprevalencia de la *Brucella spp*, 455 personas entre 18 y 64 años de edad voluntarios fueron sometidas a las pruebas de antígeno acidificado tamponado, como tamizaje; inmunodifusión en gel de agar, pruebas de seroaglutinación lenta en tubos y 2 – mercaptoetanol, como confirmatorias. El 1,98 % reaccionó al antígeno acidificado tamponado, el 2,85 % reaccionó a la inmunodifusión en gel agar; y el 1,54 %, a las pruebas de seroaglutinación lenta en tubos y 2 – mercaptoetanol. La prevalencia de la *Brucella spp* representada por las dos últimas pruebas fue del 4,4 %. Los resultados de esta investigación sugieren que la población que ha sido estudiada se encuentra expuesta a la infección por *Brucella spp* (Cavalcanti et al., 2015).

VI. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de Brucelosis caprina en el Distrito de Túpac Amaru Inca de la Provincia de Pisco fue de 0 %.

2. La baja prevalencia podría deberse al efecto positivo del Programa de Control y Erradicación de Brucelosis Caprina conducido por el Ministerio de Salud del Perú (MINSA) y SENASA.

VII. RECOMENDACIONES

1. Mantener la vigilancia epidemiológica de la Brucelosis caprina a nivel nacional.

2. Educación a los criadores para mejorar el manejo y sanidad de sus animales y alertar en caso de sospecha de Brucelosis.

3. En salud publica, realizar estudios sobre la prevalencia de Brucelosis.

VIII. BIBLIOGRÁFIA

1. Adams LG. (2002). The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the Brucella genome. Vet Microbiol 90:553-561.

2. Adone R y Pasquali P. (2013). Epidemiosurveillance of brucellosis. Rev Sci Tech 32:199 – 205.

3. Alton GG. (1985b). The epidemiology of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. In: Verger JM and Plommet M (eds), *Brucella melitensis* pp. 187-196. Martinus Nijhoff.

4. Anderson TD, Meador VP y Cheville NF. (1986). Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with Brucella abortus. I. Gross and histologic lesions. Vet Pathol, 23:219-226.

5. Alton GG, Jones LM, Angus RD y Verger JM. (1988). Techniques for the brucelosis laboratory. Inra Publications, Paris, France.

6. Alton GG. (1990). Brucella melitensis. In: Duncan JR and Nielsen K (eds), Animal Brucellosis pp. 383-409. Boston.

7. Anon .(2000). OIE Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccine for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.4. Bovine Brucellosis. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Office International des Epizzoties pp. 359-370.

8. Baldwin CL y Goenka R. (2006). Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? Crit Rev Immunol 26:407-442.

9. Blasco JM, Garin-Bastuji B, Marín CM et al. (1994). Efficacy of different Rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep and goats. Vet Rec 134:415-420.

10. Blasco JM. (2004). Estado Actual de la Brucelosis en España. Profesión Veterinaria, 15:22-34.

11. Blasco JM. (2010a). Control and eradication strategies for Brucella melitensis infection in sheep and goats. Prilozi 31:145-165.

12. Blasco JM. (2010b). Situación actual y perspectivas futuras de erradicación de la brucelosis ovina y caprina (BOC) en España (I). Tierras-Ganadería:30-39.

13. Blasco JM y Molina-Flores B. (2011). Control and eradication of Brucella melitensis infection in sheep and goats. Vet Clin North Am Food Anim Pract 27:95-104.

14. Borts IH, McNutt SH y Jordan CF. (1946). *Brucella melitensis* isolated from swine tissues in Iowa. J Am Med Assoc 130:966.

15. Bowden RA, Verger JM, Grayon M, Limet JN y Dubray G. (1993). Simultaneous expression of smooth and rough phase properties related to lipopolysaccharide in a strain of *Brucella melitensis*. J Med Microbiol 39:363-370.

16. Bundle DR, Cherwonogrodzky JW, Gidney MAJ et al. (1989). Definition of brucella-A and brucella-M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. Infection and Immunity 57:2829-2836.

17. Cardoso PCG, Macedo GC, Azevedo V y Oliveira SC. (2006). Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. Microbial Cell Factories 5.

18. Cavalcanti, C., Almeida J., Feitosa dos Santos A., Firmino O., Rocha Andrade Cruz, da Silva Júnior, F. (2015). Prevalencia de la *Brucella spp* en humanos. Rev. Latino-Am. Enfermagem, 23(5):919 – 26. DOI: 10.1590/0104 – 1169.0350.2632.

19. Celli J, de CC, Franchini DM et al. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirBdependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. J Exp Med 198:545-556.

20. Cloeckaert A, Vizcaíno N, Paquet JY, Bowden RA y Elzer PH. (2002). Major outer membrane proteins of Brucella spp.: past, present and future. Vet Microbiol, 90:229-247.

21. Corbel MJ. (1985). Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. Veterinary Bulletin 55:927.

22. Corbel MJ (1997) Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis 3:213-221.

23. Crespo León F. Patogenia Programa sanitario. (1994). Aspectos generales que han de considerarse. En: Off Int Epiz, editores.Brucelosis ovina y caprina. 1.a ed. Paris: OIE; p. 99-112; 325-346.

24. Chand P, Sadana JR y Malhotra AK. (2002). Epididymo-orchitis caused by Brucella melitensis in breeding rams in India. Vet Rec 150:84-85.

25. Díaz R, Toyos J, Salvo MD et al. (1984). Studies on the polysaccharide B and native haptene of Brucella and Yersinia enterocolitica serotype 9. Dev Biol Stand 56:213-220.

26. Díaz-Aparicio E, Marín C, Alonso-Urmeneta B et al. (1994). Evaluation of serological tests for diagnosis of Brucella melitensis infection of goats. J Clin Microbiol 32:1159-1165.

27. Díaz Aparicio E. (2013). Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. Rev Sci Tech 32:53-60.

28. Doménech Martínez M, Garrifo P y Mora MT. (2009). Brucelosis a final del siglo XX, ¿es necesario desarrollar una vacuna humana? An Vet (Murcia) 25:71-85.

29. Dubray G y Plommet M. (1976). Structure and constituents of Brucella. Characterization and biological properties of the fractions. Dev Biol Stand 31:68 – 72

30. el – T ras WF, Tayel AA, Eltholth MM and Guitian J. (2010). *Brucella* infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, Clarias gariepinus, with Brucella melitensis. Vet Microbiol 141:321-325.

31. Elzer PH, Hagius SD, Davis DS, DelVecchio VG y Enright FM. (2002). Characterization of the caprine model for ruminant brucellosis. Vet Microbiol .

32. Ferreira AC, Cardoso R, Travassos D, I et al. (2003). Evaluation of a modified Rose Bengal test and an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep. Vet Res 34:297-305.

33. Ficht TA y Adams LG. (2009). Brucellosis. In: Alan D.T.Barrett y Lawrence R.Stanberry (ed), Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases pp. 807-829.

34. Fretin D, Fauconnier A, Kohler S et al. (2005). The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. Cellular Microbiology 7:687-698.

35. Garin – Bastuji B, Blasco JM, Marín C y Albert D. (2006). The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. Small Ruminant Research 62:63-70.

36. Garro, E., Delgado, A., Evaristo, R. y Manchego, A. (2005). Prevalencia de Brucelosis caprina en la Provincia de Barranca, Lima. Rev Inv Vet Perú; 16 (2): 184 – 186.

37. Gil, D. y L. Seminario. (2000). Zoonosis en los Sistemas de Producción Animal de las Áreas Urbanas y Peri urbanas de América Latina. División de Producción y Salud Animal. FAO.

38. Godfroid F, Taminiau B, Danese I et al. (1998). Identification of the perosamine synthetase gene of Brucella melitensis 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. Infect Immun 66:5485-5493.

39. Godfroid J y Kasbohrer A (2002) Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. Vet Microbiol 90:135-145.

40. Godfroid J, Scholz HC, Barbier T et al. (2011). Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. Prev Vet Med 102:118-131.

41. Gorvel JP y Moreno E. (2002). Brucella intracellular life: from invasion to intracelular replication. Vet Microbiol 90:281-297.

42. Gorvel JP. (2008). *Brucella*: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll. Microbes Infect, 10:1010-1013.

43. Grillo MJ, Blasco JM, Gorvel JP, Moriyón I y Moreno E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model? Vet Res 43:29.

44. Guo F, Zhang H, Chen C et al. (2012) Autophagy favors *Brucella melitensis* survival in infected macrophages. Cell Molec Biol Lett 17:249-257.

45. Herrick JA, Lederman RJ, Sullivan B, Powers JH, Palmore TN. (2014). *Brucella*: Clinical manifestations, trearment, and prognosis. The Lancet Infectious Diseases. Volume 14(6): 520-526. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70270-6.

46. Hill W (1963) Standardization of the complement fixation test for brucellosis. Bull Off Int Epiz 60:401-410.

47. Hollender D, Conde SB, Salustio E, Samartino LE. (2013). Deteccion de un complejo clonal con el genotipo de *Brucella abortus* biovariedad 2 de Argentina. Revista Argentina de Microbiología. 45(4): 229-39. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70029-4.

48. Hotez PJ, Gurwith M. (2011). Europe's neglected infections of poverty. International Journal of Infectious Diseases. (9):611-e619. Disponible en: http://dx.doi. org/10.1016/j.ijid.2011.05.006.

49. INEI - IV CENSO NACIONAL AGROPECUARIO 2012.

50. Jiang X, Leonard B, Benson R y Baldwin CL. (1993). Macrophage control of Brucella abortus: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. Cell Immunol 151:309 – 319.

51. Jiménez de Bagues MP, Marín CM, Blasco JM, Moriyón I y Gamazo C. (1992). An ELISA with Brucella lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of B. melitensis infection in sheep and for the evaluation of serological responses

following subcutaneous or conjunctival B. melitensis strain Rev 1 vaccination. Vet Microbiol 30:233 – 241.

52. Jiménez de Bagues MP, Terraza A, Gross A y Dornand J. (2004). Different responses of macrophages to smooth and rough Brucella spp.: relationship to virulence. Infect Immun 72:2429 – 2433.

53. Kahler SC. (2000). Brucella melitensis infection discovered in cattle for first time, goats also infected. JAVMA 216:648.

54. Keppies J, Williams A, Witt K y Smith H. (1965). The role of erythritol in the tissue localization of Brucellae. British Journal of Experimental Pathology 46:104 – 108.

55. Kolar J. (1984). Diagnosis and control of brucellosis in small ruminants. Prev Vet Med 2:215 – 225.

56. Lapaque N, Moriyón I, Moreno E y Gorvel JP. (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. Current Opinion in Microbiology 8:60 – 66.

57. Lebre A, Velez J, Seixas D, Rabado E, Oliveira J, Saraiva de Cunha J, Silvestre AM. (2014). Brucellar spondylodiscitis: Case series of the last 25 years. Acta Med Port.; 27:204 – 10.

58. López-Goni I, Guzmán-Verri C, Manterola L et al. (2002). Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. Vet Microbiol 90:329 – 339.

59. Mackinnon D. (1963). The complement fixation test in brucellosis. Bull Off Int Epiz 60:383 – 400.

60. Méndez González KY, Hernández Castro R, Carrillo Casas EM, Monroy JF, López Merino A, Suárez Güemes F.(2011). *Brucella melitensis* survival during manufacture of ripened goat cheese at two temperatures. Foodborne Pathog Dis. 8:1257 – 61.

61. Mick V, Le CG, Corde Y et al. (2014). *Brucella melitensis* in France: Persistence in Wildlife and Probable Spillover from Alpine Ibex to Domestic Animals. PLoS ONE 9:e94168.

62. Montaraz JA y Winter AJ. (1986). Comparison of living and nonliving vaccines for Brucella abortus in BALB/c mice. Infect Immun 53:245 – 251.

63. Moreno E, Mayer H y Moriyón I. (1987). Characterization of a native polysaccharide hapten from Brucella melitensis. Infection and Immunity 55:2850 – 2853.

64. Moreno E, Cloeckaert A y Moriyón I. (2002). *Brucella* evolution and taxonomy. Vet Microbiol 90:209 – 227.

65. Munoz PM, Boadella M, Arnal M et al. (2010). Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates. BMC Infect Dis 10:46.

66. Nicoletti P. (2002). A short history of brucellosis. Vet Microbiol 90:5-9.

67. Nicoletti P (2010) Brucellosis: past, present and future. Prilozi 31:21-32.

68. Nielsen K, Heck F, Wagner G et al. (1984). Comparative assessment of antibody isotypes to *Brucella abortus* by primary and secondary binding assays. Prev Vet Med 2:197-204.

69. Nielsen K, Smith P, Yu W et al. (2005). Towards single screening tests for brucellosis.Rev Sci Tech 24:1027-1037.

70. Nielsen K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. Vet Microbiol 90:447-459.

71. Nielsen K, Smith P, Yu W et al. (2006). Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella spp*. and *Yersinia enterocolitica* O : 9 in cattle and pigs. Veterinary Immunology and Immunopathology 109:69 – 78.

72. OIE (2009a). Bovine Brucellosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals Chapter 2.4.3.

73. OIE (2009b). Caprine and Ovine Brucellosis (excluding *Brucella ovis*). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals Chapter 2.7.2.

74. Olsen SC. (2013). Recent developments in livestock and wildlife brucelosis vaccination. Rev Sci Tech 32:207 – 217.

75. Paixao TA, Roux CM, den Hartigh AB et al. (2009). Establishment of systemic Brucella melitensis infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. Infect Immun 77:4197-4208.

76. Palmer DA y Douglas JT. (1989). Analysis of *Brucella* lipopolysaccharide with specific and cross-reacting monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 27:2331 – 2337.

77. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L y Tsianos EV. (2006). The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis 6:91 – 99.

78. Pappas G y Papadimitriou P. (2007). Challenges in *Brucella bacteraemia*. Int J Antimicrob Agents 30 Suppl 1:S29 – S31.

79. Plumb GE, Olsen SC y Buttke D. (2013). *Brucellosis*: 'One Health' challenges and opportunities. Rev Sci Tech 32:271 – 278.

80. Poester FP, Samartino LE y Santos RL. (2013). Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. Rev Sci Tech 32:105 – 115.

81. Poester F, Nielsen K, Samartino L y Yu WL. (2010). Diagnosis of Brucellosis. The Open Veterinary Science Journal 4:46 – 60.

82. Purcell B, Hoover D y Friedlander A. (2008). Brucellosis. In: Govt Printing Office (ed), Medical Aspects of Biological Warfare pp. 185 – 198.

83. Rajme, D.; Hernández, M.; Cruz, M. y Padron, L. (2017). Evaluación de un antígeno de *Brucella abortus* para aglutinación en placa como prueba tamiz en el diagnóstico de la brucelosis bovina. VacciMonitor, 26(3):81-87

84. Refai M. (2002). Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Vet Microbiol 90:81 – 110.

85. Robinson A. (2003). Guidelines for coordinated human and animal brucelosis surveillance. FAO Animal Production and Health Paper 156.

86. Rodríguez Ferri EF y Crespo F. (2000). Brucelosis. Veterinaria en Castilla y León 13:13 – 43.

87. Román, D., Martínez, D., Villagómez, J., Peniche, A., Morales, J. y Flores R. (2017). Epidemiología de la brucelosis caprina en la Zona Centro del Estado de Veracruz. Gac Med Mex, 153:26 – 30.

88. Roop RM, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC y Martin DW. (2009). Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. Med Microbiol Immunol, 198:221 – 238.

89. Russo, A., Mancebo, O., Monzón, C., Gait, J.,Casco, R. y Torioni de Echaide, S. (2016). Epidemiología de la Brucelosis caprina y ovina en la provincia de Formosa, Argentina. Rev Argent Microbiol, 48(2):147 – 153.

90. Salgado, E.; C. Jaramillo; L. Sánchez del A.; H. Fragoso y J. García. (1995). Estudio de brucelosis a partir de muestras de leche de bovinos en el trópico subhúmedo del estado de Guerrero. Revista Mexicana cienc. Vet. 26 (4).

91. Samartino L, Gil A y Elzer P. (2005). Capacity building for surveillance and control of bovine and caprine brucellosis. FAO/WHO/OIE Expert and Technical Consultation. Appendix 3: Expert consultation, 55-66. 14 – 6 – 2005. Rome, Italy. Capacity building for surveillance and control of zoonotic diseases.

92. Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Brucellosis in Sheep and Goats. European Commission. SANCO.C.2/AII/R23/2001, 1-89. 2001.

93. Seleem MN, Boyle SM y Sriranganathan N. (2010). Brucellosis: a re-emerging zoonosis. Vet Microbiol 140:392 – 398.

94. Skendros P y Boura P. (2013). Immunity to brucellosis. Rev Sci Tech 32:137 – 147.

95. Smits HL. (2013). Brucellosis in pastoral and confined livestock: prevention and vaccination. Rev Sci Tech 32:219 – 228.

96. Suraud V, Jacques I, Olivier M y Guilloteau LA. (2008). Acute infection by conjunctival route with *Brucella melitensis* induces IgG+ cells and IFN-gamma producing cells in peripheral and mucosal lymph nodes in sheep. Microbes Infect 10:1370 – 1378.

97. Taboada, E., Campos L., Leiva R., Gómez B., Mansilla H., Salazar, A. (2005). Seroprevalencia de Brucelosis en ganado caprino en hatos del Callao, Peru, 3003. Rev Peru Med Exp Salud Publica 22(2), 133 – 139.

98. The Center for For Food Security and Public Health (2009). Ovine and Caprine Brucellosis: *Brucella melitensis*. Iowa State University. 1 – 5.

99. Tique, V., Daza, E., Álvarez, J., Mattar, S. (2010). Seroprevalencia de *Brucella abortus* y ocurrencia de *Brucella melitensis* en caprinos y en ovinos de Cesar y Sucre. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 13 (2): 133 – 139.

100. Tittarelli M, Di VM, de MF et al. (2005). The persistence of *Brucella melitensis* in experimentally infected ewes through three reproductive cycles. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 52:403-409.

101. Toledo, M., Delgado, A., Suárez, F. y Noé, N. (2007). Prevalencia de Brucelosis caprina en tres Distritos de la Provincia de Cañete, Lima. Rev Inv Vet Perú; 18 (2): 136 – 140.

102. Velasco J, Díaz R, Grillo MJ et al. (1997). Antibody and delayed-type hypersensitivity responses to Ochrobactrum anthropi cytosolic and outer membrane antigens in infections by smooth and rough *Brucella spp*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 4:279-284.

103. Weynants V, Walravens K, Didembourg C et al. (1998). Quantitative assessment by flow cytometry of T-lymphocytes producing antigen-specific

gamma-interferon in *Brucella* immune cattle. Vet Immunol Immunopathol 66:309-320.

104. Whatmore AM. (2009). Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect Genet Evol 9:1168-1184.

105. World Health Organisation, Food and Agriculture Organization of the United Nations and Wold Organization for Animal Health (2006). Brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7. Geneva: World Health Organization.

106. Yang Y, Wang L, Yin J et al. (2011). Immunoproteomic analysis of Brucella melitensis and identification of a new immunogenic candidate protein for the development of brucellosis subunit vaccine. Mol Immunol 49:175-184.

107. Zhan Y y Cheers C. (1993). Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. Infect Immun 61:4899-4901.

108. Zinsstag J, Roth F, Orkhon D et al. (2005). A model of animal – human brucelosis transmission in Mongolia. Prev Vet Med 69:77-95.

Anexo 1. Condiciones de las instalaciones para la crianza de caprinos

Anexo 2. Extraccion de muestas de sangre de caprinos

Anexo 3. Prueba de rosa de bengala: Equipos, materiales y reactivos

Anexo 4. Prueba de rosa de bengla: análisis de las muestras de sueros sanguíneos

Anexo 5. Prueba de rosa de bengala: resultados