



PREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A BRUCELOSIS BOVINA EN GANADERÍAS LECHERAS DE LA PROVINCIA DEL AZUAY-ECUADOR

PREVALENCE AND RISK FACTORS ASSOCIATED WITH BOVINE BRUCELLOSIS IN DAIRY FARMS IN THE PROVINCE OF AZUAY-ECUADOR

Omar Santiago Andrade Guzmán¹, Andrea Elizabeth Vintimilla Rojas¹,
Mateo Damián López Espinoza², Guillermo Emilio Guevara Riera³ y Sergio
Emiro Rivera Pirela⁴

¹Laboratorio de Microbiología, Carrera de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, calle Diego de Tapia y Av. 12 de Octubre, Cuenca-Ecuador.

²Laboratorio de Geomática, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, calle Diego de Tapia y Av. 12 de Octubre, Cuenca-Ecuador.

³Departamento de Estadística, Carrera de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, calle Diego de Tapia y Av. 12 de Octubre, Cuenca-Ecuador.

⁴Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia, Maracaibo-Venezuela.

*Autor para correspondencia: omar.andrade@ucuenca.edu.ec

Manuscrito recibido el 22 de septiembre de 2021. Aceptado, tras revisión, el 11 de abril de 2022. Publicado el 1 de septiembre de 2023.

Resumen

Se desconoce el estatus sanitario de ganaderías que no están dentro del programa oficial de control de Brucelosis en la provincia del Azuay, pudiendo existir zonas con mayor frecuencia de rebaños seropositivos. Este trabajo pretende determinar la prevalencia y factores de riesgo asociados a brucelosis bovina en predios lecheros. Se llevó a cabo un estudio epidemiológico en 436 fincas, para lo cual se tomaron muestras de leche de productores en centros de acopio, camiones recolectores y hatos. Se usó una encuesta georeferenciada a fin de recopilar información del manejo de las ganaderías. La leche se analizó mediante ELISA-indirecto, 37 fincas resultaron seropositivas, obteniendo una prevalencia de 8,5%. Los porcentajes de seropositividad fueron: Cuenca (14,84%), Girón (23,07%), Nabón (8,21%), Oña (11,53%), San Fernando (33,33%), Sevilla de Oro (7,14%), Sigsig (4,16%). Se realizaron las pruebas Rosa de Bengala y ELISA-competitivo a bovinos que aportaron al pool de leche en 34 ganaderías, estableciéndose una concordancia del 100% de ELISA-indirecto para detectar fincas seronegativas. En el análisis de regresión logística se determinó una asociación significativa ($P < 0,05$) entre la seropositividad y factores como: ubicación geográfica, extensión de la finca, sistema de explotación, presencia de otras especies domésticas, eliminación de restos placentarios, sistema de reproducción, teniendo una mayor probabilidad de seropositividad las ganaderías que presentaron abortos ($OR = 2,71$), problemas de celo ($OR = 2,09$), nacimiento de terneros débiles ($OR=3,24$) y manejo extensivo ($OR = 3,67$). Estos hallazgos constituyen evidencia serológica que *Brucella spp.* circula en ganaderías de la zona.

Palabras clave: Prevalencia, brucelosis, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, factores de riesgo.

Abstract

The health of herds that are not within the official Brucellosis control program in the province of Azuay is unknown, and there may be areas with a higher frequency of seropositive herds. This paper aims to determine the prevalence and risk factors associated with bovine brucellosis in dairy farms. An epidemiological study was carried out in 436 farms, for which milk samples were taken from producers in collection centers, collecting trucks and herds. A georeferenced survey was used to collect information on the management of the herds. The milk was analyzed by indirect-ELISA, and thirty-seven farms were seropositive, obtaining a prevalence of 8,5%. The percentages of seropositivity were: Cuenca (14.84%), Girón (23.07%), Nabón (8.21%), Oña (11.53%), San Fernando (33.33%), Sevilla de Oro (7.14%), Sigsig (4.16%). The Rose Bengal and competitive ELISA tests were performed on bovines that contributed to the milk pool in 34 herds, establishing a 100% concordance of indirect ELISA to detect seronegative farms. In the logistic regression analysis, a significant association ($P < 0,05$) was determined between seropositivity and factors such as: geographic location, extension of the farm, exploitation system, presence of other domestic species, elimination of placental remains, reproduction system, having a higher probability of seropositivity in herds that presented abortions ($OR = 2,71$), estrus problems ($OR = 2,09$), birth of weak calves ($OR = 3,24$) and extensive management ($OR = 3,67$). These findings constitute serological evidence that *Brucella spp.* circulates in farms in the area.

Keywords: Prevalence, brucellosis, enzyme linked immunosorbent assay, risk factors.

Forma sugerida de citar: Andrade Guzmán, O., Vintimilla Rojas, A., López Espinoza, M., Guevara Riera, G. y Rivera Pirela, S. (2023). Prevalencia y factores de riesgo asociados a brucelosis bovina en ganaderías lecheras de la provincia del Azuay-Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. Vol. 38(2):138-151. <http://doi.org/10.17163/lgr.n38.2023.10>.

IDs Orcid:

Omar Santiago Andrade Guzmán: <http://orcid.org/0000-0003-0045-7513>

Andrea Elizabeth Vintimilla Rojas: <http://orcid.org/0000-0002-4144-9205>

Mateo Damián López Espinoza: <http://orcid.org/0000-0002-6996-8701>

Guillermo Emilio Guevara Riera: <http://orcid.org/0000-0003-3832-9090>

Sergio Emiro Rivera Pirela: <http://orcid.org/0000-0001-9120-1497>

1 Introducción

La brucelosis es una enfermedad bacteriana zoonótica causada por varias especies del género *Brucella* spp. que infecta animales domésticos y de vida silvestre (Ledwaba y col., 2019), afectando al sistema reproductivo, ocasionando abortos, crías débiles y produciendo pérdidas económicas debido al sacrificio de animales infectados y el impedimento para el comercio (Assenga y col., 2015). Los síntomas de brucelosis en humanos son fiebre, fatiga, artralgia, dolor muscular y sudoración en ocasiones produciendo estados de incapacidad física (Zheng y col., 2018).

Hasta la fecha se conocen 12 especies de las cuales *B. abortus* afecta a bovinos, *B. mellitensis* produce abortos en cabras, *B. suis* infecta a cerdos, *B. canis* es específica en caninos, *B. ovis* contagia a ovejas, *B. neotomae* se ha reportado en ratas (Suárez-Esquível y col., 2017); dos especies *B. pinnipedialis* y *B. ceti* fueron aisladas en mamíferos marinos (Kroese y col., 2018); *B. microti* se ha identificado en una variedad de animales como topillos, jabalíes; *B. papionis* se ha descrito como hospedador a los babuinos, *B. vulpis* en zorros rojos; *B. inopatia* se ha aislado en humanos aunque no se ha identificado el reservorio animal (Leclercq, Cloeckert y Zygmunt, 2020), la capacidad zoonótica se expresa con mayor fuerza en *B. mellitensis*, pero *B. abortus* también es responsable de la brucelosis en personas (Awah-Ndukum y col., 2018).

La transmisión a humanos ocurre por el consumo de leche, productos lácteos infectados, inhalación de partículas en aerosol y contacto directo con tejidos de animales enfermos (Dal y col., 2019). Las fuentes de infección para los animales incluyen materiales abortados, secreciones vaginales, leche, semen, consumo de agua, alimentos contaminados, y la infección en terneros puede darse a través del útero y por calostro (Ogugua y col., 2018). Una estrecha relación entre la fauna silvestre y el ganado brindarían oportunidades para la transmisión y la persistencia de la brucelosis en estas poblaciones (Godfroid y col., 2013). Algunos estudios sugieren que la bacteria puede circular entre varias especies silvestres susceptibles, manteniéndose así permanentemente en los ecosistemas (Aruho y col., 2021).

Las infecciones declaradas por la Organización

Internacional de Epizootias (OIE) como enfermedades zoonóticas ameritan medidas de prevención, diagnóstico y control. Por tal motivo es necesario identificar factores de riesgo asociados a la patogénesis de la infección por *Brucella* spp. en los diferentes sistemas de manejo de las ganaderías responsables de la propagación de la enfermedad, permitiendo así una gestión eficaz para su manejo y control (OIE, 2018).

La brucelosis es una de las zoonosis de mayor importancia, altamente difundida en Latinoamérica. Argentina reporta una prevalencia de 19,7% a nivel de rebaños (Aznar y col., 2015); Uruguay 0,02% (Baruch y col., 2020); Colombia 22% (Cárdenas, Melo y Casal, 2018). Es difícil establecer datos oficiales de prevalencia en Ecuador por haber sido sub-notificada ante la OIE. Sin embargo, se han reportado estudios sobre la presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp., que varían entre regiones, incluso dentro de ellas. Un estudio a nivel nacional en el año 1979 refiere una seroprevalencia en la región Sierra Norte de 1,97 a 10,62%, en región Costa 4,2 a 10,62% y en la región Sierra Sur de 1,3 a 2,6%. Otro estudio reporta una prevalencia del 6% (Salguero, 2011; Román-Cárdenas y Luna-Herrera, 2017). En los últimos años, algunos trabajos permiten actualizar el nivel de seroprevalencia de esta enfermedad, con una variabilidad significativa que va de 1,80-12% en todo el país (Zambrano, Pérez y Rodríguez, 2016).

Es necesario comprender la epidemiología de la brucelosis en otras regiones del país donde no se realiza vigilancia serológica como requisito, previo a implementar programas de control y determinar las zonas de mayor prevalencia de la enfermedad. Existen varias pruebas para el diagnóstico en sangre o leche. Actualmente, las prescritas para el comercio internacional de ganado son: Rosa de Bengala (RBT), Aglutinación en placa taponada (BPAT), ELISA-I (ELISA-indirecto), ELISA-C (ELISA-competitivo), Fijación del complemento (CFT) y Fluorescencia polarizada (FP) (Vhoko y col., 2018).

Un paso inicial hacia la formulación de programas apropiados de control de la brucelosis a nivel local sería la georeferenciación del estado de infección de algunas zonas lecheras que permita cuantificar la enfermedad a nivel de fincas y generar

evidencia epidemiológica de la endemidad de la bacteria.

El objetivo principal de este estudio fue estimar la prevalencia de Brucelosis bovina en ganaderías de la provincia del Azuay, mediante la técnica de ELISA-I en muestras de leche. Igualmente, evaluar los factores asociados que pudieran predisponer a la aparición de la enfermedad, tales como: presencia de abortos, incremento de intervalos entre partos, nacimiento de crías débiles, asistencia veterinaria, ausencia de vacunación, tamaño del rebaño, entre otros, relacionados con la patogénesis y signos de la brucelosis (Akinseye y col., 2016; Mugizi y col., 2015).

2 Materiales y Métodos

2.1 Área de estudio

Esta investigación se realizó en los cantones Cuenca, Santa Isabel, Gualaceo, Paute, Sigsig, Sevilla de Oro, Girón, San Fernando, Pucará, Oña, Nabón, El Pan y Chordeleg, pertenecientes a la provincia del Azuay, ubicada en la región austral del Ecuador, con una extensión aproximada de 8.639 km^2 . Existen dos zonas diferenciadas: el Este comprendido por los Andes orientales y el Oeste que constituye la región Costanera. El clima es variable debido a la altura, desde cálido hasta frío, por la presencia del macizo de los Andes y la vegetación subtropical. Al Occidente, la provincia se encuentra climatológicamente fragmentada en diversos sectores. Además, a causa de su ubicación, cada zona climática presenta sólo dos estaciones definidas: húmeda y seca. En el Occidente la temperatura oscila entre los 20°C y 33°C, mientras que en la zona andina, ésta suele estar entre los 10°C y 28°C (Cárdenas y Murillo, 2018).

2.2 Población en estudio

Consistió en unidades productivas agropecuarias (UPAS) dedicadas a la producción de leche sin importar el tamaño, las cuales, al momento del estudio incluían vacas en lactancia. La raza Holstein Friesen fue predominante (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2019). El tamaño de los rebaños varió desde 5 hasta 120 animales; el sistema de manejo abarcó un amplio rango, desde ganaderías extensas tecnificadas mayores a 50 has, medianas entre 5 a 50

has y fincas pequeñas con un manejo extensivo tradicional con poca tecnología, menores a 5 has. Para el propósito de esta investigación, las zonas de producción lechera se definieron por la mayor concentración de granjas que suministran esta materia prima (Ortega y col., 2017).

2.3 Diseño del estudio

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal comprendido entre los años 2019-2020. La unidad de análisis lo constituyen muestras de leche obtenidas en centros de acopio, vehículos de recolección y directamente en ganaderías. Para calcular el número de fincas a muestrear se usó el programa epidemiológico Win Epi (De Blas, Ruiz-Zarzuela y Vallejo, 2006). Se tomó como población total las 15 784 unidades de producción (UPAS), que constan en el programa de control y erradicación de Fiebre Aftosa en el Azuay (Agrocalidad, 2019), al no haber estudios previos en esta zona de la prevalencia de la brucelosis se partió de una prevalencia esperada del 50%, un error estimado del 5%, y un nivel de confianza de 95%. El programa arrojó una cifra de 376 fincas a muestrear, sin embargo, se tuvo acceso en total a 436 ganaderías.

Para determinar el número de UPAS a estudiar en cada cantón se utilizó un muestreo proporcional, la selección de las fincas se realizó de manera aleatoria, según la accesibilidad a la zona, distancia, tiempo para llegar a las ganaderías, disponibilidad de recursos, predisposición de los productores, centros de acopio y transportistas con mayor factibilidad de participar en esta investigación. Se realizó una encuesta georeferenciada a cada propietario utilizando el software Survey 123 ArcGis, instalados en dispositivos móviles. Ninguna de las ganaderías reportó contar con un programa de vacunación contra brucelosis.

2.4 Encuesta georeferenciada

Se realizó una encuesta georeferenciada cuyas preguntas se elaboraron para obtener información sobre la condición sanitaria de los animales, y el manejo de las fincas en base a literatura existente (Cárdenas y col., 2019) con el objetivo de determinar los posibles factores de riesgo de sufrir brucelosis tomando en cuenta: el manejo reproductivo, reemplazo de animales, procedencia de agua de bebida,

presencia de animales domésticos susceptibles, sistema de explotación, conocimiento de la enfermedad, problemas reproductivos, presencia de abortos, manejo de desechos después del parto o abortos

(Cárdenas y col., 2019). El consentimiento informado para la administración del cuestionario y la recolección de muestras se obtuvo verbalmente de los propietarios antes del muestreo y la entrevista.

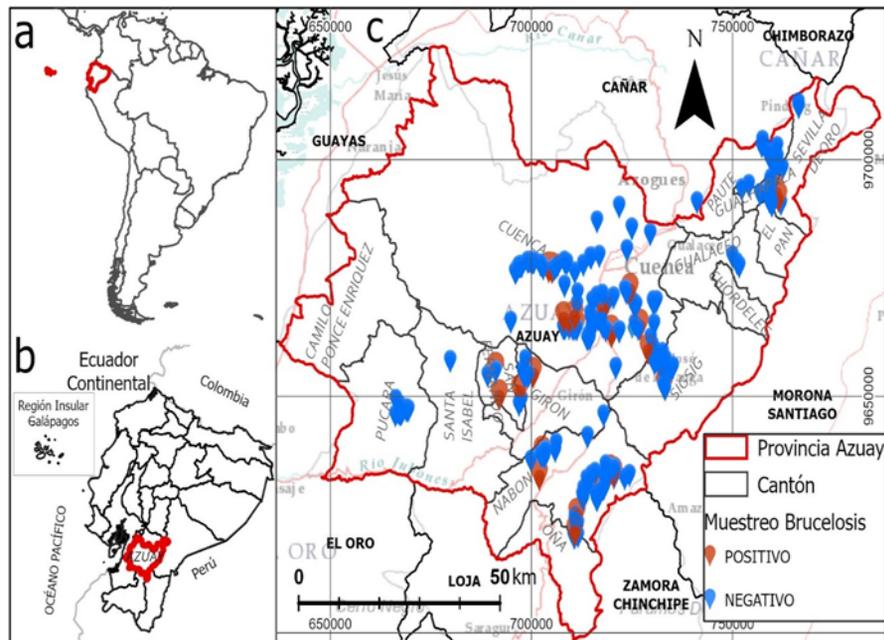


Figura 1. Ubicación del Ecuador en Sur América b) Ubicación del proyecto a nivel Nacional c) Distribución de cantones con ganaderías seropositivas en la provincia del Azuay.

2.5 Análisis de muestras de leche mediante ELISA indirecto

Las muestras fueron tomadas en envases estériles en una cantidad de 100 ml. Los envases fueron transportados refrigerados al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, donde fueron almacenados a -20°C . Para identificar la presencia de anticuerpos a *Brucella spp.* se usó el kit de ELISA-I (Innovate Diagnostic, Francia), para ello previamente se centrifugaron las muestras de leche a 8 000 rpm durante 10 minutos para separar el lacto suero de la grasa. Se utilizó una placa con 96 pocillos impregnada con el LPS de *Brucella abortus*; se distribuyeron 100 μl de control negativo y control positivo por duplicado y posteriormente se agregaron 100 μl de las muestras en los pocillos restantes. Se selló la placa y se incubó a 21°C durante 45 minutos, posteriormente se enjuagó cada pocillo con 300 μl de solución de lavado por tres veces. Se agre-

garon 100 μl de conjugado (anti IgG de rumiante marcado con una peroxidasa), se incubó a 21°C durante 30 minutos, se repitió el proceso de lavado y posteriormente se adicionaron 100 μl de solución de revelado (tetrametilbencidina) a todos los pozos, se volvió a incubar la placa durante 15 minutos a una temperatura de 21°C y finalmente se añadieron 100 μl de solución de parada para detener la reacción.

Los valores de densidad óptica (DO) de las muestras (m) y controles se leyeron a 450 nm (longitud de onda), mediante un lector de placas ELISA (Biotek 800TS, USA). Se usaron controles positivos (cp) y controles negativos (cn) para validar la prueba. Se calculó el porcentaje de inhibición (PI) utilizando la Ecuación 1. Una muestra se consideró como positiva cuando su PI fue mayor a 50%.

$$PI = \frac{DO_m - DO_{cn}}{DO_{cp} - DO_{cn}} \times 100 \quad (1)$$

2.6 Serología para identificación de animales seropositivos

Se tuvo acceso a 34 ganaderías para realizar las pruebas RBT y ELISA-C a todas las vacas que aportaron al pool de leche, para confirmar individualmente la presencia de animales seropositivos. Para ello se tomaron 9 ml de sangre de la región coccígea en tubos al vacío sin anticoagulante, los cuales fueron transportados al laboratorio a una temperatura de 8°C. Se realizó la centrifugación a 8 000 rpm (Dynac, Clay Adams, USA), durante 10 minutos, para extraer el suero sanguíneo a ser almacenado en tubos eppendorf y congelado a -20°C.

2.7 Rosa de Bengala

A los sueros extraídos de sangre periférica obtenida sin anticoagulante se les realizó la prueba RBT (Innovate Diagnostics, Francia), según el manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Se utilizó una placa de vidrio cuadrada, se mezclaron 40 μ l del reactivo con la misma cantidad de suero a analizar, se agitó la lámina ligeramente durante 4 minutos. La aparición de aglutinación dentro de un minuto se puntuó como 4+ (++++), entre 1 y 4 min se puntuó 1+ a 3+ (+, ++ y ++++) según los diferentes grados de aglutinación, la ausencia de aglutinación en 4 minutos se consideró negativa.

2.8 ELISA-C como prueba confirmatoria

Se utilizó el kit ELISA-C (Svanova, Suecia) para confirmar la presencia de animales seropositivos a *Brucella spp.* El ensayo se realizó adicionando 45 μ l de solución de dilución en todos los pocillos para luego incorporar 5 μ l de controles positivos, débiles y negativos por duplicado, así como 5 μ l de solución de dilución como control de conjugado; posteriormente se añadieron 5 μ l de las muestras. Seguidamente se agregaron 50 μ l de la solución anticuerpos monoclonales de ratón (mAb) prediluidos, específicos de un epítipo común del O-polisacárido liso de molécula de LPS, tanto en los pocillos controles y muestras. Se selló la placa y se agitó durante 5 minutos, ulteriormente se incubó durante 30 minutos a 20°C. Culminada la incubación, se enjuagó la placa 4 veces con la solución PBS-Tween Buffer, inmediatamente se añadieron 100 μ l en cada pocillo de solución de conjugado (anticuerpo de cabra contra IgG de ratón unido a peroxidasa de rábano

picante, HRP) y se incubó a 20°C durante 30 minutos.

Se repitió el proceso de lavado y posterior a esto se agregaron 100 μ l de sustrato (peroxidasa de hidrógeno y el cromógeno ABTS). Se incubó a 20°C durante 10 minutos y la reacción se detuvo adicionando 50 μ l de la solución de parada (H2SO4) (Viveros, 2019). La microplaca se leyó a 450 nm con un espectrofotómetro (Biotek 800TS, USA), calculándose para cada muestra el porcentaje de inhibición (PI) de acuerdo a la Ecuación 2.

$$PI = \frac{DO_m - DO_{cn}}{DO_{cp} - DO_{cn}} \times 10 \quad (2)$$

Donde DO_m , DO_{cp} , DO_{cn} son las lecturas de las densidades ópticas para las muestras, el control positivo y el control negativo, respectivamente. Las muestras se clasificaron como positivas si los títulos de anticuerpos registraban un $PI \geq 30\%$, definido por el proveedor. Además, el hecho de que $DO_{cp} > 0,350$ y $DO_{cp}/DO_{cn} > 3$, confirmó que la prueba funcionó correctamente.

2.9 Análisis estadístico

Los análisis se realizaron utilizando el software Infostat versión 2020 (Di Rienzo y col., 2020). Se calculó la frecuencia absoluta y relativa de fincas seropositivas a anticuerpos en muestras de leche contra la infección por *Brucella spp.* Se utilizó la prueba Chi-cuadrado para analizar si existía asociación entre cada uno de los factores de riesgo y la seropositividad, y se investigó la influencia de los factores mediante el modelo de regresión logística. Se realizaron cuadros de doble entrada para efectuar los cálculos de Odds Ratio a fin de estimar el riesgo relativo de que ocurra un evento. El intervalo de confianza fue 95% para el logaritmo de la razón de probabilidades como 1,96 errores estándar a ambos lados de la estimación, además del valor P en cada caso, el cual establece la significación estadística cuando $P \leq 0,05$.

3 Resultados

3.1 Seroprevalencia de brucelosis bovina a nivel de fincas

Se encontraron anticuerpos a *Brucella spp.* en 37 muestras de leche de un total de 436 fincas analiza-

das (Figura 1), arrojando una prevalencia del 8,5%. El porcentaje de seropositividad más bajo se presentó en el cantón Sigsig, con 4,16% y el más alto en San Fernando con 33,33%. No se encontró seropositividad en las muestras procedentes de los otros seis cantones, por lo que se registran sin valores los intervalos de confianza (-) (Tabla 1).

3.2 Confirmación de animales seropositivos en fincas positivas y negativas a ELISA-I en leche

Se realizó en 34 fincas las pruebas serológicas con RBT y ELISA -C a las vacas que aportaron al pool de leche para comprobar la presencia de animales seropositivos, coincidiendo en un 100% el diagnóstico negativo con ELISA-I en muestras de leche de 20 fincas al no detectar animales seropositivos, y en 14 ganaderías cuyas muestras de leche resultaron positivas, solo 12 de estas presentaron vacas con anticuerpos (Tabla 2).

4 Factores de riesgo para la presencia de la infección

La regresión logística reveló que los abortos, la ubicación geográfica, extensión de la finca, el sistema de explotación, la presencia de otras especies domésticas en la finca, problemas de celo, eliminación de restos placentarios, el nacimiento de terneros débiles y el sistema de reproducción se asociaron de manera significativa con la seropositividad a brucelosis ($P < 0,05$), siendo los rebaños que presentaron abortos los que mostraron mayores riesgos de contraer la enfermedad ($OR = 2,71$). Así también, las ganaderías cuyos animales presentaron problemas de repetición de celo tendrían mayor probabilidad de infectarse ($OR = 2,09$). El nacimiento de terneros débiles igualmente fue un factor asociado a una mayor predisposición ($OR = 3,24$).

La asociación con factores tales como la asistencia veterinaria, existencia de un área de parición, las fuentes de agua, animales de reemplazo, raza, y la presencia de retención placentaria no mostraron diferencia significativas ($P < 0,05$) (Tabla 3).

Tabla 1. Porcentaje de ganaderías seropositivas a brucelosis según cantones.

Cantón	Fincas analizadas	Fincas seropositivas	% Positividad	95 % IC Límite inferior	95 % IC Límite superior
Cuenca	128	19,00	14,84	8,65	20,95
El Pan	49	0,00	0,00	-	-
Girón	13	3,00	23,07	0,19	46,00
Guachapala	15	0,00	0,00	-	-
Gualaceo	4,00	0,00	0,00	-	-
Nabón	73	6,00	8,21	1,90	14,50
Oña	26	3,00	11,53	0,00	23,00
Paute	19	0,00	0,00	-	-
Pucará	26	0,00	0,00	-	-
San Fernando	6,00	2,00	33,33	0,00	71,00
Santa Isabel	1,00	0,00	0,00	-	-
Sevilla de Oro	28	2,00	7,14	0,00	16,00
Sigsig	48	2,00	4,16	0,00	9,00
TOTAL	436	37,00	8,50	5,00	10,00

5 Discusión

La presencia de anticuerpos a *Brucella spp.* en muestras de leche mediante ELISA-I y confirmado con la existencia de animales seropositivos en RBT y ELISA-C sugiere una alta exposición de los hatos ganaderos del Azuay a la bacteria, lo cual ha sido descrito previamente, acompañado de la identificación de cepas de *Brucella abortus* en bovinos, así como en humanos, en varias regiones de Ecuador (Ron-Román y col., 2014; Rodríguez-Hidalgo y col., 2015).

La excelente correlación entre las pruebas ELISA-I en leche, RBT y ELISA-C en suero sanguíneo indican una alta sensibilidad de ELISA-I para diagnosticar fincas positivas a brucelosis con 100% de especificidad. Solo en dos fincas positivas en leche con ELISA-I no se encontraron animales positivos a RBT o ELISA-C, posiblemente debido al movimiento de estos al rejo de secado o descarte por problemas reproductivos al momento del muestreo individual, o a la negativa de algunos propietarios para la toma de muestras en hembras gestantes. Una reacción cruzada antigénica con otras infecciones bacterianas (*Yersinia spp.*, *Salmonella spp.*, *Streptococcus spp.*, *E. coli*) podrían conducir a resultados falsos positivos en el diagnóstico serológico (Bonfini y col., 2018), aunque según Nielsen y col. (2004), eso es poco probable debido a la alta especificidad de las pruebas serológicas para brucelosis en leche.

La prevalencia de la brucelosis puede variar de-

pendiendo de las zonas de estudio, influenciada por diferentes prácticas de manejo, procedencia de animales de reemplazo, sistema de explotación, mayor permanencia de la bacteria por variaciones en el clima, entre otros factores. *Brucella spp.* es muy susceptible a la luz solar y al calor, sobreviviendo unas pocas horas en los meses cálidos y secos, mientras que en verano pueden sobrevivir en suelo húmedo durante aproximadamente 7 días (Matope y col., 2010), pudiendo prevalecer en áreas endémicas por la amplia gama de hospedadores susceptible, capaces de transmitir la enfermedad (Ducrotoy y col., 2017; Musallam y col., 2019).

En cantones con mayor prevalencia de fincas afectadas, tales como: San Fernando, Girón, Cuenca, la brucelosis podría deberse al sistema de manejo, principalmente debido a la mezcla de animales procedentes de diferentes rebaños dentro de la misma zona geográfica (Craighead y col., 2018), por ser lugares con mayor cantidad de ganaderías lecheras y poseer un importante comercio de bovinos. En las encuestas epidemiológicas, la mayoría de productores manifestaron desconocer los síntomas de la enfermedad, hubo ausencia de monitoreo serológico mediante análisis de laboratorio y nulo descarte de animales infectados que comúnmente son comercializados, diseminando así la enfermedad. En zonas detectadas con baja prevalencia como los cantones Paute, El Pan, Guachapala, Gualaceo, Pucará, Santa Isabel, existen bajas tasas de transmisión posiblemente debido a factores agroecológicos que restringen el contacto entre los rebaños.

Tabla 2. Resultados con ELISA-I, RBT, y ELISA-C en 34 ganaderías según su ubicación geográfica.

Cantón	Animales seropositivos					Animales seropositivos				
	Fincas positivas en leche	Fincas con animales seropositivos	Animales muestreados	RBT	ELISA-C	Fincas negativas en leche	Fincas con animales seropositivos	Animales muestreados	RBT	ELISA-C
Cuenca	6	6	236	29	28	10	0	239	0	0
Santa Isabel	–	–	–	–	–	1	0	24	0	0
Girón	2	2	145	31	31	2	0	41	0	0
Sevilla de Oro	–	–	–	–	–	2	0	36	0	0
Oña	1	1	31	1	1	3	0	64	0	0
San Fernando	2	2	50	3	3	–	–	–	–	–
Nabón	1	–	18	0	0	1	0	14	0	0
Sigsig	2	1	16	1	1	–	–	–	–	–
TOTAL	14	12	496	65	64	20	0	418	0	0

Los valores de prevalencia obtenidos en este estudio (8,5%) son menores a los encontrados por Mainato y Vallecillo (2017), en la provincia vecina

del Cañar (13,63%), donde refieren una mayor presencia de fincas seropositivas en los cantones de Biblián y Cañar. Un estudio epidemiológico de Bru-

celosis a nivel nacional (Carbonero y col., 2018) incluye a la provincia del Azuay con una prevalencia a nivel de rebaño menor al 10%; Pichincha 37,5%; Santo Domingo 26,8%; Tungurahua 25,3% y Zamora con 4,8%. Por otro lado, Poulsen y col. (2014), en un estudio para determinar la prevalencia en dos provincias del Norte del Ecuador, refieren un valor de 7,2%. Estas variaciones a nivel país podrían deberse a las técnicas de muestreo, interpretación de las pruebas, reactivos utilizados, número de animales muestreados.

Dentro de los factores de riesgo, el tamaño de la finca fue un factor significativo asociado a una mayor seroprevalencia a brucelosis, debido probablemente a problemas de higiene, producto de una alta densidad animal en sistemas de producción extensiva. Berhe, Belihu y Asfaw (2007), manifiestan un riesgo de seropositividad de 8,5 y 4,3 veces mayor en hatos grandes y medianos, respectivamente, en comparación con rebaños pequeños, ya que en estos disminuye el riesgo de contacto con animales de otras manadas. Del mismo modo McDermott y Arimi (2002) declaran que, en sistemas extensivos, el tamaño de los rebaños, el mestizaje común con otros animales y el encuentro en puntos comunes de pastoreo y abrevadero incrementan el riesgo de contagio de la enfermedad.

Un historial de abortos o mortinatos se asoció con la seropositividad a brucelosis. Los fetos abortados y secreciones uterinas proporcionan un suministro constante de la bacteria manteniendo la transmisión de nuevas infecciones (Sanchez y col., 2020). También se reveló una asociación con problemas de celo en los animales, lo cual coincide con varios autores (Asgedom, Damena y Duguma, 2016), quienes identificaron también un aumento en el número de servicios por parto cuando el ganado presentaba problemas reproductivos debidos a la brucelosis, que afecta al tracto genital, conduciendo a una infección uterina y una tasa pobre en concepción.

En relación al sistema de explotación, existen resultados similares a los reportados en este trabajo, donde el manejo tradicional facilitaría la propagación de la enfermedad debido al poco control de movimiento de los animales (Fero y col., 2020). Sin embargo, Kumar y col. (2016), mencionan que la transmisión horizontal de la enfermedad en gran-

jas organizadas se relacionaría con el hacinamiento, alta densidad de animales y malas prácticas higiénicas como la eliminación inadecuada de fetos abortados, membranas fetales, secreciones vaginales, que ayudan a la propagación de la infección.

La regresión logística asoció la eliminación inadecuada de la placenta y fetos como un factor predisponente para la transmisión de la infección, esto debido a que millones de Brucellas se excretan durante el parto normal o abortos de vacas infectadas, las cuales, teniendo un medio adecuado de temperatura, luz solar y pH, pueden mantener la infectividad durante varios meses (Sussex, 2016). De igual manera, John y col. (2010), indican que los propietarios de hatos que eliminaban de manera inadecuada residuos biológicos luego de partos, abortos o retenciones placentarias fueron más propensos a tener al menos un animal seropositivo cuando se comparó con aquellos que eliminaron correctamente estos materiales.

Si bien en este trabajo, la asociación con la introducción de animales con estatus sanitario desconocido en el rejo no tuvo un efecto significativo, el porcentaje de animales positivos aumenta cuando se introducen animales de otras fincas. Kanouté y col. (2017) determinan una mayor probabilidad de observar rebaños positivos a *Brucella* cuando ingresan semovientes sin análisis en áreas endémicas. Destacan la necesidad monitorear a los bovinos antes de ingresar a la granja, e igualmente promover el reemplazo con animales provenientes de fincas libres de brucelosis.

Según la encuesta epidemiológica en la mayoría de las zonas evaluadas los productores desconocían la existencia de programas preventivos de inmunización contra brucelosis, por lo cual se puede inferir que la presencia de animales seropositivos se debió al contacto con Brucellas de campo y no a reacciones post vacunales. Dorneles, Sriranganathan y Lage (2015) señalan que la vacunación es una estrategia determinante para programas de control y erradicación de brucelosis. De igual forma, Pascual y col. (2018), manifiestan que los programas de erradicación deben incluir pruebas de diagnóstico, descarte de animales infectados y la incorporación de la vacunación, la cual ha demostrado reducir infecciones y abortos en los animales.

Tabla 3. Factores de riesgo asociados a brucelosis bovina.

Factor	Variable	N° fincas positivas	Seropositividad ELISA-I%	Odd ratio	95% IC	Valor P
Abortos	Si	58(10)	17,24	2,71	1,25 - 5,86	0,001
	No	378(27)	7,14	0,37	0,17 - 0,80	
Cantón	Cuenca	127(19)	14,96			0,001
	El Pan	49(0)	0			
	Girón	13(3)	23,07			
	Guachapala	15(0)	0			
	Gualaceo	4(0)	0			
	Nabón	73(6)	8,21			
	Oña	26(3)	11,53	-	-	
	Paute	19(0)	0			
	Pucará	26(0)	0			
	San Fernando	6(2)	33,33			
	Santa Isabel	1(0)	0			
	Sevilla de Oro	28(2)	7,14			
Extensión de la finca	Sigsig	46(2)	4,34			0,0043
	Grande	208(25)	12,01			
	Grande 2	44(6)	13,64	-	-	
	Mediana	78(0)	0			
Sistema de explotación	Pequeña	106(6)	5,66			0,0003
	Extensivo	196(27)	13,78	3,67	1,76 - 7,69	
Presencia de especies domésticas	Soguelo	240(10)	4,17	0,27	0,13 - 0,57	0,01
	Can, ovi, equi	256(17)	6,64			
	Por, equi, ovi	19(2)	11,11			
	Can, por, equi, ovi	48(3)	6,25	-	-	
Problemas de celo	Otros	49(7)	14,29			0,03
	No tienen otras especies	64(7)	10,9			
Eliminación de restos placentarios	Si	95(13)	13,68	2,09	1,03 - 4,25	0,03
	No	341(24)	7,04	0,48	0,24 - 0,97	
	Entierra, basura, quema	103(15)	14,56			
Nacimiento de terneros débiles	Consume mismo animal / otros animales	164(12)	7,32	-	-	0,0034
	Deja en el lugar	169(10)	5,92			
	Si	45(9)	20	3,24	1,44 - 7,28	
Sistema de reproducción	No	391(28)	7,16	0,31	0,14 - 0,69	0,0001
	MN (toro propio/prestado)	333(20)	6			
	IA	78(16)	20,51	-	-	
Asistencia veterinaria	MN / IA	25(1)	4			0,48
	Si	140(10)	7,14	1,3	0,62 - 2,74	
Área de parición	No	296(27)	9,12	0,77	0,37 - 1,61	0,26
	Corrales	13(0)	7,69	-	-	
Fuentes de agua	Potrero	423(37)	8,74			0,14
	Acequia, río, pozo	398(37)	9,3			
	Agua potable	27(0)	0	-	-	
Animales de reemplazo	AP, río, acequias, pozo	11(0)	0			0,18
	Propios de la finca	352(25)	7,1			
	PR y fincas cercanas	60(9)	15	-	-	
	Fuera de provincia	6(1)	16,67			
Raza	PR y fuera de provincia	18(2)	11,11			0,5
	Holstein	321(24)	7,48			
	Mestiza	69(7)	10,14	-	-	
	Brown Swiss	20(2)	10			
Retención placentaria	Jersey	26(4)	15,38			0,43
	Si	74(8)	10,81	1,39	0,62 - 3,12	
	No	362(29)	8,01	0,72	0,32 - 1,61	

CAN= caninos; OVI= ovinos; POR= porcinos; EQUI= equinos; MN= monta natural; IA= Inseminación artificial; AP= agua potable; PR= propios de la finca.

Olsen y Stoffregen (2005) han comprobado que, el porcentaje de reactores en rebaños infectados es menor en los animales vacunados en comparación con animales no vacunados. Según sus datos, al usar dosis completa de la cepa 19 en terneros y al evaluar la protección en bovinos de hasta 9 años de edad estimaron que aproximadamente 65-75% de todos los animales vacunados estaban completamente protegidos durante su vida útil productiva. Sin duda, la alta prevalencia de brucelosis detectada en la zona está relacionada, además, con la ausencia de vacunación.

El sistema de reproducción también puede influir en la infección por *Brucella spp.* sobre todo a través del contacto sexual con rebaños vecinos o mediante el intercambio de toros provenientes de granjas infectadas (Nardi y col., 2017). La raza y las fuentes de agua no demostraron en este estudio ser factores que predisponen a la infección. Aunque otros factores de manejo no considerados pudieran influir, nuestros hallazgos concuerdan con la epidemiología general de la brucelosis bovina observadas en otras partes del mundo (Franc, Häsler y Arenas-Gamboa, 2018; Hull y Schumaker, 2018), entendiéndose que la alta prevalencia de esta enfermedad representa un importante problema de salud pública y animal en Ecuador.

6 Conclusiones

Este estudio proporciona evidencia serológica de la presencia de brucelosis en hatos lecheros con diferentes niveles de seropositividad en la provincia del Azuay, con una prevalencia elevada (8,5%), asociada a factores de riesgo involucrados en la patogénesis de la enfermedad y responsables de su propagación. La prueba ELISA-I en leche es una herramienta diagnóstica útil para identificar ganaderías positivas a brucelosis con altísima especificidad, reduciendo el tiempo de muestreo y costo, y pudiendo analizar eficazmente un número mayor de fincas a la vez. Es necesario realizar serovigilancia en las ganaderías a fin de comprender la distribución espacial de la enfermedad en el país, previo a implementar programas de control y sensibilizar a la población sobre la transmisión zoonótica de la brucelosis.

Aprobación ética

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la práctica experimental y los estándares internacionales para el bienestar animal.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado gracias a la XVIII convocatoria de proyectos de investigación, realizado por la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca, Ecuador.

Referencias

- Agrocalidad (2019). *Programa de Erradicación de Fiebre Aftosa, I Fase*. Inf. téc. Jefatura de Sanidad Agropecuaria Azuay.
- Akinseye, V. y col. (2016). «Sero-epidemiological survey and risk factors associated with bovine brucellosis among slaughtered cattle in Nigeria». En: *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 83.1, 1-7. Online: <https://bit.ly/3LQAZG2>.
- Aruho, R. y col. (2021). «A serological survey of brucellosis in wildlife in four major National Parks of Uganda». En: *BMC Veterinary Research* 17.1, 1-10. Online: <https://bit.ly/40bOWTr>.
- Asgedom, H., D. Damena y R. Duguma (2016). «Seroprevalence of bovine brucellosis and associated risk factors in and around Alage district, Ethiopia». En: *Springerplus* 5, 1-8. Online: <https://bit.ly/3FOELvP>.
- Assenga, J. y col. (2015). «Epidemiology of *Brucella* infection in the human, livestock and wildlife interface in the Katavi-Rukwa ecosystem, Tanzania». En: *BMC veterinary research* 11, 1-11. Online: <https://bit.ly/3nlZRLu>.
- Awah-Ndukum, J. y col. (2018). «Seroprevalence and Associated Risk Factors of Brucellosis among Indigenous Cattle in the Adamawa and North Regions of Cameroon». En: *Veterinary Medicine International*.
- Aznar, M. y col. (2015). «Prevalence and spatial distribution of bovine brucellosis in San Luis and La Pampa, Argentina». En: *BMC Veterinary Research* 11.1, 1-7. Online: <https://bit.ly/40bRa5f>.

- Baruch, J. y col. (2020). «Analytic Sensitivity of an ELISA Test on Pooled Sera Samples for Detection of Bovine Brucellosis in Eradication Stages in Uruguay». En: *Frontiers in Veterinary Science* 7, 178. Online: <https://bit.ly/3FIQpIM>.
- Berhe, G., K. Belihu e Y. Asfaw (2007). «Seroepidemiological investigation of bovine brucellosis in the extensive cattle production system of Tigray region of Ethiopia». En: *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 5.2, 65. Online: <https://bit.ly/40cJyzq>.
- Bonfini, B. y col. (2018). «Cross-reactivity in serological tests for brucellosis: a comparison of immune response of *Escherichia coli* O157: H7 and *Yersinia enterocolitica* O: 9 vs *Brucella* spp». En: *Vet Ital* 54.2, 107-114. Online: <https://bit.ly/3G5RKcK>.
- Carbonero, A. y col. (2018). «Seroprevalence and risk factors associated with *Brucella* seropositivity in dairy and mixed cattle herds from Ecuador». En: *Tropical animal health and production* 50, 197-203. Online: <https://bit.ly/40vkZ0C>.
- Cárdenas, C. y M. Murillo (2018). «Calidad Bacteriológica de la leche cruda en ganaderías de la provincia del Azuay». Tesis de mtría. Universidad de Cuenca.
- Cárdenas, L., O. Melo y J. Casal (2018). «Evolution of bovine brucellosis in Colombia over a 7-year period (2006-2012)». En: *Tropical animal health and production* 50, 19-27. Online: <https://bit.ly/3G42KXT>.
- Cárdenas, L. y col. (2019). «Risk factors for new bovine brucellosis infections in Colombian herds». En: *BMC Veterinary Research* 15, 1-8. Online: <https://bit.ly/3Ky3QOd>.
- Craighead, L. y col. (2018). «Brucellosis in West and Central Africa: A review of the current situation in a changing landscape of dairy cattle systems». En: *Acta tropica* 179, 96-108. Online: <https://bit.ly/40F6RC1>.
- Dal, T. y col. (2019). «Comparison of multiplex real-time polymerase chain reaction with serological tests and culture for diagnosing human brucellosis». En: *Journal of Infection and Public Health* 12.3, 337-342. Online: <https://bit.ly/3UcbvFt>.
- De Blas, I, I Ruiz-Zarzuela y A Vallejo (2006). «WinEpi: Working in epidemiology. An online epidemiological tool». En: *ISVEE 11: Proceedings of the 11th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics*.
- Di Rienzo, J.A. y col. (2020). *InfoStat versión 2020*. Inf. téc. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Online: <http://www.infostat.com.ar>.
- Dorneles, E., N. Sriranganathan y A. Lage (2015). «Recent advances in *Brucella abortus* vaccines». En: *Veterinary research* 46.1, 1-10. Online: <https://bit.ly/3U6W6GI>.
- Ducrotoy, M. y col. (2017). «Brucellosis in Sub-Saharan Africa: Current challenges for management, diagnosis and control». En: *Acta tropica* 165, 179-193. Online: <https://bit.ly/3MhYWGx>.
- Fero, E. y col. (2020). «The seroprevalence of brucellosis and molecular characterization of *Brucella* species circulating in the beef cattle herds in Albania». En: *PloS one* 15.3, e0229741. Online: <https://bit.ly/40IYntH>.
- Franc K.and Krecek, R., B. Häsler y A. Arenas-Gamboa (2018). «Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action». En: *BMC public health* 18.1, 1-9. Online: <https://bit.ly/40NZ19y>.
- Godfroid, J. y col. (2013). «Brucellosis in terrestrial wildlife». En: *Revue Scientifique et Technique. Office International des Epizooties* 32.1, 27-42. Online: <https://bit.ly/3UbHCoC>.
- Hull, N. y B. Schumaker (2018). «Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine». En: *Infection ecology & epidemiology* 8.1, 1500846. Online: <https://bit.ly/3Zlbytu>.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (2019). *Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua ESPAC-2019*.
- John, K. y col. (2010). «Quantifying risk factors for human brucellosis in rural northern Tanzania». En: *PloS one* 5.4, e9968. Online: <https://bit.ly/3UdPwxU>.
- Kanouté, Y. y col. (2017). «Epidemiology of brucellosis, Q fever and Rift Valley fever at the human and livestock interface in northern Côte d'Ivoire». En: *Acta tropica* 165, 66-75. Online: <https://bit.ly/435rxVy>.
- Kroese, M. y col. (2018). «*Brucella pinnipedialis* in grey seals (*Halichoerus grypus*) and harbor seals (*Phoca vitulina*) in the Netherlands». En: *Journal of wildlife diseases* 54.3, 439-449. Online: <https://bit.ly/411IDTr>.
- Kumar, A. y col. (2016). «Seroprevalence and risk factors associated with bovine brucellosis in western Uttar Pradesh, India». En: *Indian jour-*

- nal of animal sciences 86.2, 131-135. Online: <https://bit.ly/3zxcMx9>.
- Leclercq, S., A. Cloeckert y M. Zygmunt (2020). «Taxonomic organization of the family Brucellaceae based on a phylogenomic approach». En: *Frontiers in Microbiology* 10, 3083. Online: <https://bit.ly/3GiJaXY>.
- Ledwaba, M. y col. (2019). «Molecular characterization of Brucella species from Zimbabwe». En: *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13.5, e0007311. Online: <https://bit.ly/3MsDoXE>.
- Mainato, S. y A. Vallecillo (2017). «Seroprevalencia de la brucelosis bovina en la provincia del Cañar, Ecuador». En: *Maskana* 8, 25-28. Online: <https://bit.ly/3KdWuye>.
- Matope, G. y col. (2010). «Herd-level factors for Brucella seropositivity in cattle reared in smallholder dairy farms of Zimbabwe». En: *Preventive Veterinary Medicine* 94.3-4, 213-221. Online: <https://bit.ly/3KyFrIy>.
- McDermott, J. y S. Arimi (2002). «Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact». En: *Veterinary microbiology* 90.1-4, 111-134. Online: <https://bit.ly/3zFy63q>.
- Mugizi D. and Boqvist, S. y col. (2015). «Prevalence of and factors associated with Brucella seropositivity in cattle in urban and peri-urban Gulu and Soroti towns of Uganda». En: *Journal of Veterinary Medical Science* 77.5, 557-564. Online: <https://bit.ly/40LTbVU>.
- Musallam, I. y col. (2019). «Brucellosis in dairy herds: A public health concern in the milk supply chains of West and Central Africa». En: *Acta tropica* 197, 105042. Online: <https://bit.ly/3KCjfNN>.
- Nardi, G. y col. (2017). «Performance of microbiological, serological, molecular, and modified seminal plasma methods in the diagnosis of Brucella abortus in semen and serum of bovine bulls». En: *Biologicals* 48, 6-9. Online: <https://bit.ly/40IGM5i>.
- Nielsen, K. y col. (2004). «Serological relationship between cattle exposed to Brucella abortus, Yersinia enterocolitica O: 9 and Escherichia coli O157: H7». En: *Veterinary microbiology* 100.1-2, 25-30. Online: <https://bit.ly/418YWwR>.
- OIE (2018). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organization for Animal Health.
- Ogugua, A. y col. (2018). «Prevalence and risk factors associated with bovine brucellosis in herds under extensive production system in south-western Nigeria». En: *Tropical animal health and production* 50, 1573-1582. Online: <https://bit.ly/416zU1a>.
- Olsen, S. y W. Stoffregen (2005). «Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock». En: *Expert review of vaccines* 4.6, 915-928. Online: <https://bit.ly/3MjqATs>.
- Ortega, V. y col. (2017). «Caracterización productiva de las ganaderías en los cantones occidentales de la provincia del Azuay». En: *Maskana* 8, 145-147. Online: <https://bit.ly/4182Gic>.
- Pascual, D. y col. (2018). «Alternative strategies for vaccination to brucellosis». En: *Microbes and infection* 20.9-10, 599-605. Online: <https://bit.ly/3Ke4XS1>.
- Poulsen, K. y col. (2014). «Brucellosis in dairy cattle and goats in northern Ecuador». En: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 90.4, 712. Online: <https://bit.ly/414gha4>.
- Rodríguez-Hidalgo, R. y col. (2015). «Circulating strains of Brucella abortus in cattle in Santo Domingo de los Tsáchilas Province–Ecuador». En: *Frontiers in Public Health* 3, 45. Online: <https://bit.ly/3m8noQb>.
- Román-Cárdenas, F. y J. Luna-Herrera (2017). «Revisión actualizada de la epidemiología de Brucellosis (Brucella abortus, Brucella mellitensis, Brucella suis, Brucella canis) en el Ecuador y el mundo». En: *Centro de Biotecnología* 6.1, 82-93. Online: <https://bit.ly/3ZGYWTy>.
- Ron-Román, J. y col. (2014). «Human brucellosis in northwest Ecuador: typifying Brucella spp., seroprevalence, and associated risk factors». En: *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 14.2, 124-133. Online: <https://bit.ly/3KjgKyf>.
- Salguero, A. (2011). «Determinación De La Prevalencia Serológica De Brucelosis En Bovinos De Las Provincias De Carchi, Esmeraldas E Imbabura Y Análisis De Factores De Riesgo». Tesis de maestría. Universidad Central del Ecuador.
- Sanchez, J. y col. (2020). «Seroprevalence of abortus diseases that commit the bovine reproductive efficiency in two dairy areas of chiapas». En: *ESPACIO I+D, INOVACIÓN MÁS DESARROLLO* 10.
- Suárez-Esquivel, M. y col. (2017). «Brucella neotomae infection in humans, Costa Rica». En: *Emerging Infectious Diseases* 23.6, 997-1000. Online: <https://bit.ly/3UiJITS>.

- Sussex, West (2016). *Veterinary Microbiology*. World Organization for Animal Health.
- Vhoko, K. y col. (2018). «Estimating the prevalence of Brucellosis in cattle in Zimbabwe from samples submitted to the Central Veterinary Laboratory between 2010 and 2014». En: *Vet Ital* 54.1, 21-27. Online:<https://n9.cl/q8pak>.
- Viveros, J. (2019). «Prevalencia y factores de riesgo de la brucelosis bovina en ganaderías de Imbabura que proveen leche a Floralp S.A.» Tesis de maestría. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Zambrano, M., M. Pérez y X. Rodríguez (2016). «Brucelosis Bovina en la Provincia Manabí, Ecuador: Estudio de los Factores de Riesgo». En: *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 27.3, 607-617. Online:<https://n9.cl/3wzbe>.
- Zheng, R. y col. (2018). «A systematic review and meta-analysis of epidemiology and clinical manifestations of human brucellosis in China». En: *BioMed research international* 2018. Online:<https://bit.ly/3KGWeJG>.