

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias de la Salud**

**Prevalencia aparente de brucelosis bovina a través de un  
ELISA indirecto en leche en 40 fincas del cantón Eloy Alfaro,  
provincia de Esmeraldas**

**Proyecto de Investigación**

**Camilo González Lorza**

**Medicina Veterinaria**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Médico Veterinario

Quito, 22 de mayo de 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Prevalencia aparente de brucelosis bovina a través de un ELISA indirecto en  
leche en 40 fincas del cantón Eloy Alfaro, provincia de Esmeraldas**

**Camilo González Lorza**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Rommel Lenin Vinuesa Sierra, Dr.

Firma del profesor

---

Quito, 22 de mayo de 2018

## Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y apellidos: Camilo González Lorza

Código: 00116644

Cédula de Identidad: 1719644229

Lugar y fecha: Quito, 22 de mayo de 2018

## RESUMEN

La brucelosis bovina es una enfermedad causada principalmente por *Brucella abortus*, es una enfermedad zoonótica de reporte obligatorio ante la OIE que afecta al Ecuador de una manera directa a la Salud Pública. El Ecuador es un país que cuenta con gran desinformación en cuanto a la prevalencia de la enfermedad en las distintas provincias del país pese a la presentación del Programa de erradicación de Tuberculosis y Brucelosis planteado en el 2008. El presente estudio estableció la Prevalencia aparente de brucelosis bovina a través de un ELISA indirecto en leche en 40 fincas del cantón Eloy Alfaro, provincia de Esmeraldas. Las muestras fueron recogidas del tanque de leche. En el laboratorio fueron centrifugadas, y analizadas con el kit Brucellosis Antibody Test Kit (Tank Milk) de IDEXX. Se obtuvo una prevalencia positiva del 62.5%, negativa del 30% y sospechosa del 7.5%. Este muestreo da a entender que la frecuencia de fincas contaminadas en el sector privado podría ser elevado.

**Palabras claves:** Brucella | zoonosis | bovino | ELISA | prevalencia

## ABSTRACT

Bovine brucella is a disease principally caused by *Brucella abortus*, is a zoonotic disease of mandatory reporting to the OIE that affects Ecuador in a direct way to Public Health. Ecuador is a country that has great disinformation in terms of prevalence of the disease in the different provinces of the country despite the presentation of the Tuberculosis and Brucellosis Eradication Program proposed in 2008. The present study determined the apparent prevalence of bovine brucellosis through an indirect ELISA in milk in 40 farms on the Eloy Alfaro county, in the province of Esmeraldas. The samples where taken from the milk tank. In the lab they were centrifuged and analyzed with the Brucellosis Antibody Test Kit (Tank Milk) from IDEXX. A prevalence of 62.5% positives, 30% negatives and 7.5% suspicious were taken. This sampling implies that the frequency of contaminated farms in the private sector, may be high.

**Keywords:** Brucella | zoonotic | bovine | ELISA | prevalence

## TABLA DE CONTENIDO

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| <b>Introducción:</b> .....         | <b>10</b> |
| <b>Materiales y Métodos:</b> ..... | <b>12</b> |
| <b>Resultados:</b> .....           | <b>15</b> |
| <b>Discusión:</b> .....            | <b>15</b> |
| <b>Conclusiones:</b> .....         | <b>18</b> |
| <b>Bibliografía:</b> .....         | <b>20</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1 Prevalencia de Brucella abortus de 40 muestras de tanque de leche en el Cantón Eloy Alfaro de la provincia Esmeraldas. .... | 15 |
|---|----|

## ÍNDICE DE IMÁGENES

|  |    |
|--|----|
| Imagen 1 Ubicación geográfica de toma de las 40 muestras de leche..... | 14 |
|--|----|



**Prevalencia aparente de brucelosis bovina de 40 fincas en la región norte del cantón Eloy Alfaro, en la provincia de Esmeraldas a través de un ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).** Apparent prevalence of bovine brucellosis of 40 farms in the northern region of Eloy Alfaro county, in the province of Esmeraldas, through an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

**González, Camilo<sup>1</sup>; Vinueza, Lenin<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup> Estudiante de último año de la Escuela de Medicina Veterinaria, Colegio de Ciencias de la Salud, Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito 170901, Ecuador.

<sup>2</sup> Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador. M.Sc Instituto de Medicina Tropical "Príncipe Leopoldo" Amberes Bélgica. Docente de la Escuela de Medicina Veterinaria, Colegio de Ciencias de la Salud, Universidad San Francisco de Quito USFQ, Quito 170901, Ecuador.

**Autor para correspondencia:** [camiloglorza@gmail.com](mailto:camiloglorza@gmail.com)

## Resumen

La brucelosis bovina es una enfermedad causada principalmente por *Brucella abortus*, es una enfermedad zoonótica de reporte obligatorio ante la OIE que afecta al Ecuador de una manera directa a la Salud Pública. El Ecuador es un país que cuenta con gran desinformación en cuanto a la prevalencia de la enfermedad en las distintas provincias del país pese a la presentación del Programa de erradicación de Tuberculosis y Brucelosis planteado en el 2008. El presente estudio estableció la Prevalencia aparente de brucelosis bovina a través de un ELISA indirecto en leche en 40 fincas del cantón Eloy Alfaro, provincia de Esmeraldas. Las muestras fueron recogidas del tanque de leche. En el laboratorio fueron centrifugadas, y analizadas con el kit Brucellosis Antibody Test Kit (Tank Milk) de IDEXX. Se obtuvo una prevalencia positiva del 62.5%, negativa del 30% y sospechosa del 7.5%. Este muestreo da a entender que la frecuencia de fincas contaminadas en el sector podría ser elevado.

**Palabras claves:** Brucella | zoonosis | bovino | ELISA | prevalencia

## Abstract

Bovine brucella is a disease principally caused by *Brucella abortus*, is a zoonotic disease of mandatory reporting to the OIE that affects Ecuador in a direct way to Public Health. Ecuador is a country that has great disinformation in terms of prevalence of the disease in the different provinces of the country despite the presentation of the Tuberculosis and Brucellosis Eradication Program proposed in 2008. The present study determined the apparent prevalence of bovine brucellosis through an indirect ELISA in milk in 40 farms on the Eloy Alfaro county, in the province of Esmeraldas. The sample where taken from the milk tank. In the lab they were centrifuged and analyzed with the Brucellosis Antibody Test Kit (Tank Milk) from IDEXX. A prevalence of 62,5% positives, 30% negatives and 7,5% suspicious were taken.

This sampling implies that the frequency of contaminated farms in the private sector, may be high.

**Keywords:** Brucella | zoonotic | bovine | ELISA | prevalence

## INTRODUCCIÓN:

*Brucella abortus* es una enfermedades de reporte obligatorio en la lista de la OIE, además se encuentra en la lista de enfermedades, infecciones e infestaciones en vigor del año 2017 (14). *Brucella abortus* es una enfermedad de carácter zoonótico, es decir, que puede ser transmitida de animales a humanos (3, 10).

Los signos clínicos de esta enfermedad pueden causar abortos e incluso llevar a la infertilidad del animal. Para el Ecuador este microorganismo significa una pérdida millonaria anual de aproximadamente 5'436.908 de dólares. A causa de ocurrencia de abortos, disminución de producción de leche y el reemplazo de hembras de vientre (2). Erradicar esta enfermedad es de gran importancia para el país desde un punto de vista industrial y epidemiológico. Por lo cual, se planteó el programa de eliminación de tuberculosis y brucelosis, cuyo único objetivo es lograr la disminución progresiva de bovinos infectados en las cinco regiones epidemiológicas del país en una primera fase, hasta disminuir los niveles de incidencia a condiciones operativas compatibles con su erradicación (1, 2).

El último muestreo realizado en el Ecuador fue en el 1979 por el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. En este diagnóstico se muestrearon 49.205 bovinos, obteniéndose una prevalencia del 1,54% con 759 animales positivos. Desde ese entonces, se han ido realizando pocos estudios en distintas provincias del Ecuador, pero ninguno muestra la realidad general del país (2). El último censo realizado por el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) indica que hay aproximadamente 4,19 millones de cabezas de ganado vacuno, de las cuales 28,504 se utilizan para ordeño en la provincia de Esmeraldas. Este ordeño da como resultado 100,556L diarios con una

media de 3,2L por vaca. La magnitud o el impacto que esta enfermedad causa en los bovinos, al ser una enfermedad zoonótica, puede afectar de una manera directa a la población. Según datos del INEC, en el 2016, aproximadamente 896.170 mil vacas fueron utilizadas para ordeño en el país, de las cuales el total de su producción se dividía para distintos fines. El 72.56% se vendía en líquido, el 16.57% era procesada en los terrenos, el 8.40% era destinada para consumo en los terrenos, el 1.97% era utilizada para alimentación al balde y por último el 0.49% era destinada para otros fines (8). Esmeraldas, al ser una de las provincias con menor estudio en esta enfermedad, debería ser tomada como un recurso de investigación y aplicación de protocolos para el manejo de Brucella, debido a que tiene una alta producción láctea según los datos (7).

Según el Ministerio de Salud Pública en los años 2015, 2016 y 2017, se encontró respectivamente 13 casos de Brucella en humanos a nivel nacional (5 en Pichincha, 2 en Chimborazo, 2 en Loja, 1 en Carchi, 1 en Cotopaxi, 1 en Esmeraldas y 1 en Imbabura), 6 casos (4 en Pichincha, 1 en Imbabura, 1 en Sucumbíos) y por último hubo únicamente un reporte en la provincia de Pichincha (11, 12, 13). Para la certificación de un predio libre de Brucelosis es necesario un tiempo de espera de aproximadamente 120 días. Esto ocurre debido a que en primera instancia se debe de solicitar el inicio de proceso de muestreos, una vez realizado el muestreo de todo el hato, se corren todas las muestras. Si las muestras salieron negativas, se corre un segundo muestreo después de 120 días. Una vez que el segundo muestreo da resultados negativos, se procede a la certificación de predio libre de Brucelosis por 365 días. Si en el primer muestreo las pruebas salieron positivas al patógeno, se procede a realizar dos muestreos más con un intervalo de espera de 120 días entre cada uno, es decir 240 días (1).

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia aparente de brucelosis bovina en una muestra de 40 fincas en la región norte del cantón Eloy Alfaro, en la provincia de Esmeraldas a través de un ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Algunos estudios como el realizado por carbonero en el 2017, muestra una prevalencia de positividad del 17% tomando en cuenta 2666 muestras recolectadas en 8 provincias del país (3). De esta manera el presente proyecto planteado en Eloy Alfaro aportara a la investigación en definir un estado zoonosario actual del país.

### **MATERIALES Y MÉTODOS:**

Este estudio fue llevado a cabo desde Mayo del 2017 hasta Diciembre del 2017 en la región norte (Imagen 1) de Esmeraldas donde se marcaron las siguientes coordenadas en UTM “Universal Transversal de Mercator” (desde la zona 17 dentro del hemisferio norte 720493.4 – 119650.3 hasta 692614.1 – 110869.7), la cría de ganado de carne (*Bos indicus*) es una de las fuentes económicas más importantes de la zona. Un total de 40 fincas fueron muestreadas sin tomar en cuenta el volumen de producción. Únicamente se tomó la muestra del tanque de leche que abarcaba toda la producción diaria, para de esta manera determinar la prevalencia de *B. abortus* en el hato. Las mismas fueron tomadas con un cucharón plástico y protección de un overol, guantes y mascarilla. Entre la recolección de cada muestra el cucharón siempre fue desinfectado con agua y alcohol para poder disminuir todos los problemas al momento de la lectura de las muestras. Después de ser recogidas, se las colocaba en frascos plásticos y estériles de orina de hasta 120ml, los cuales eran etiquetados para inmediatamente colocarlos en refrigeración. Las muestras fueron almacenadas en termo en un rango de temperatura,

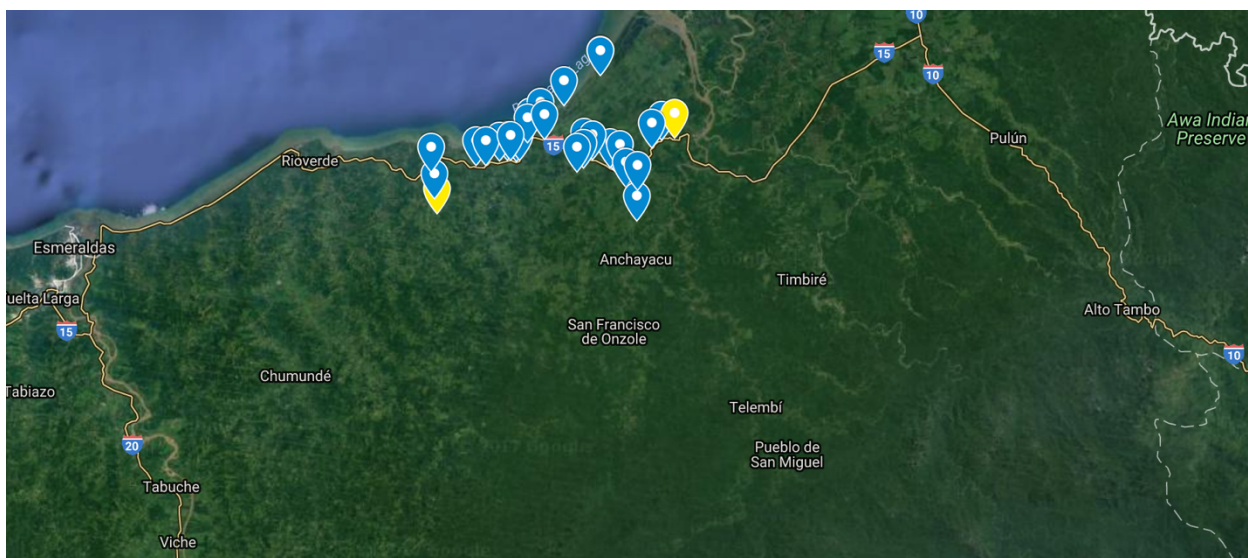
-4 a  $-3^{\circ}\text{C}$  mientras se recolectaban las muestras en los distintos hatos. Es importante mencionar que las muestras fueron recogidas en horarios de 3:00am y 11:00am.

Posterior a la recolección, las muestras fueron trasladadas al laboratorio laboratorio del Hospital Docente y Especialidades Veterinarias de la Universidad San Francisco (HEDV). Una vez descongeladas y centrifugadas a 3500rpm por 15min, estas fueron analizadas a través de un ELISA indirecto. Se utilizó el kit Brucellosis Antibody Test Kit (Tank Milk) de IDEXX. Este ELISA es un inmunoensayo enzimático para la detección de anticuerpos contra *B. abortus* en el plasma o suero del individuo. El kit abarca hasta 96 cámaras donde 93 se puede utilizar para realizar el examen, debido a que las 3 primeras cámaras son para los controles positivos y negativos. Este kit utiliza agentes reactivos (soluciones stop, sustratos, etc) que pueden ser utilizados con otros kits para enfermedades abortivas (6).

En este equipo hay una placa de microtitulación que viene recubierta con el antígeno inactivado. Las diluciones de las muestras de suero centrifugado de leche fueron incubadas dentro de esta placa. Cualquier anticuerpo específico para *Brucella abortus* que se encontró dentro de los pocillos, se unió al antígeno. De esta manera se creó el complejo antígeno/anticuerpo en la superficie, posteriormente se agregó un conjugado IgG anti-rumiante que se unió al anticuerpo del animal, el cual ya está adherido al antígeno formando el complejo. El conjugado que rompe la unión, se removió con la solución de lavado para luego añadir el sustrato TMB en todos los pocillos. Es importante mencionar que el grado de coloración que se genera (la densidad óptica es medida a 450nm) es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos para el

patógeno presente en la muestra. La densidad óptica tomada en estas muestras es comparada con la densidad óptica para realizar un diagnóstico (7).

Para realizar los cálculos de este kit se obtuvo el valor medio de la densidad óptica de las muestras duplicadas. Se debe de obtener la densidad óptica del Control Positivo (CPx) al igual que la densidad óptica de las muestras (Muestra  $A_{450}$ ) deben corregirse restando el valor de la densidad óptica del Control Negativo (CNx). La muestra utilizada fue  $M/P\% = 100 \times \frac{\text{Muestra } A_{450} - \text{CNx}}{\text{CPx} - \text{CNx}}$ . Para esta fórmula se utilizó la tabla de interpretación de muestras individuales o mezclas de leche de hasta 125 vacas. En donde se determina que la muestra es negativa cuando  $M/P\% \leq 45\%$ , es positiva cuando  $45\% < M/P\% < 55\%$  y es sospechosa cuando  $M/P\% \geq 55\%$ . Tomando en cuenta estos rangos, se obtuvo una prevalencia aparente positiva del 62.5%. Es recomendado que siempre que una mezcla de sueros resulte positiva se debe de analizar las muestras que componen la mezcla de manera individual para disminuir el margen de error (7).



**Imagen 1** Ubicación geográfica de toma de las 40 muestras de leche.

Las marcas amarillas indican la colecta de las muestras 36 (zona 17 dentro del hemisferio norte 720493.4 – 119650.3) y 41 (zona 17 dentro del hemisferio norte 692614.1 – 110869.7).

## RESULTADOS:

|                   |           | Prevalencia   |
|-------------------|-----------|---------------|
| <i>B. abortus</i> | N         | (%)           |
| Positivos         | 25        | 62.5          |
| Negativos         | 12        | 30            |
| Sospechosos       | 3         | 7.50          |
| <b>TOTAL</b>      | <b>40</b> | <b>100.00</b> |

**Tabla 1** Prevalencia de *Brucella abortus* de 40 muestras de tanque de leche en el Cantón Eloy Alfaro de la provincia Esmeraldas.

De un total de 40 muestras analizadas, se determinó que la prevalencia de positividad de *B. abortus* fue mayor al 50%, mientras que hubo una negatividad del 30%.

## DISCUSIÓN:

Los resultados obtenidos muestran una frecuencia de la fincas contaminadas del 62.5%, demostrando un valor mas elevado que el presentado por Carbonero y Rodriguez. Esto se debe a que hay muchos factores que pudieron haber intervenido en la recolección de estos datos. En el estudio de carbonero únicamente se tomó en cuenta las provincias de Azuay, Chimborazo, Cotopaxi, Manabí, Pichincha, Santo Domingo, Tungurahua y Zamora Chinchipe con un total de 2666 muestras. En el estudio de Rodríguez se tomaron 656 muestras de Santo Domingo en donde los diagnósticos fueron llevados a cabo con

Rosa de Bengala y prueba de aglutinación en placa. Mientras que este estudio se tomó únicamente en cuenta 40 muestras del Cantón Eloy Alfaro (Zona de riesgo 1). Esta diferencia de prevalencias se puede deber a distintos métodos de colecta de muestra, factores ambientales, mantención de la cadena de frío, población animal tomada en cuenta, distintos métodos diagnósticos, etc (3, 16).

Según los resultados recogidos en la zona norte del cantón Eloy Alfaro de la provincia de Esmeraldas, se insinúa que la Brucelosis bovina es una enfermedad endémica del Ecuador que no se está controlando con los métodos necesarios. El Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina que indica las actividades a seguir para disminuir la prevalencia de *Brucella abortus* hasta alcanzar los niveles compatibles con su erradicación no está funcionando de manera adecuada. Los datos recogidos y analizados son del año 2017, en donde se obtuvo una prevalencia positiva mayor del 50% en una población de 40 muestras (Tabla 1). Como se mencionó anteriormente, *Brucella* es una enfermedad de reporte obligatorio ante la OIE debido a que es una enfermedad zoonótica que puede afectar a la población humana (14).

Según estudios locales del 2010, las poblaciones más grandes e importantes de la zona donde fueron recolectadas las muestras son La Tola y Borbón con un número aproximado de 12062 habitantes (9). Al indicar que esta zona se encuentra positiva a Brucelosis, se puede asumir que el consumo y la venta de leche en esta región es de gran impacto desde el punto de vista de salud pública, debido a que la gran mayoría de la leche recolectada en las zonas aledañas es utilizada para consumo o fabricación de subproductos como el queso para la venta.



Los resultados presentados podrían indicar que el Programa de erradicación no fue acogido en la zona, la falta de educación por parte de los profesionales hacia los pequeños ganaderos y emprendedores de la zona puede ser una de las principales causantes en cuanto al desconocimiento.

Utilizar el kit Brucellosis Antibody Test Kit (Tank Milk) de IDEXX fue de gran ayuda debido a que este test tiene una sensibilidad alta demostrando la presencia de la enfermedad en los hatos muestreados, mientras que su especificidad de igual manera es alta debido a que no tiene reacciones cruzadas con otras enfermedades. La alta sensibilidad del kit nos indica que dentro de todo el tanque de leche puede haber un animal o más que están infectados dentro de todo el hato, pero no nos indica cual es el animal que está causando la positividad 15. Se recomienda en casos de utilizar un ensayo ELISA, como lo fue en este estudio, realizar un screening de todo el hato por animal para de esta manera aislar a los positivos y tomar las medidas necesarias. Aislado los positivos se mantendrán los negativos sanos y se eliminarán los reservorios de la enfermedad.

Las principales ventajas de la metodología del ELISA en leche son; la obtención de la muestra no es invasiva, lo que evita las infecciones. La muestra puede ser congelada hasta su procesamiento debido a que su conservación no es crítica y no requiere el uso de conservantes. Mientras que el anillo en leche pese a ser una herramienta diagnóstica de buen uso, ha demostrado con el tiempo que puede arrojar resultados falsos negativos. Estos falsos negativos pueden ser generados por el factor de altas diluciones en grandes hatos, malas condiciones de almacenamiento o conservación de la muestra y reacciones

cruzadas como ocurre con la mastitis, dando resultados falsos positivos. El estudio de Rivera demuestra la ventaja diagnóstica del ELISA indirecto en leche sobre el Ring Test con una sensibilidad del 99,6% y una especificidad del 99.1% (15).

Una pregunta que siempre ha surgido en el estudio es saber si la vacuna pudo haber causado problemas de titulación ya que los trabajadores y propietarios de las fincas involucradas en el estudio no tenían ningún tipo de manejo o prevención en cuanto a la enfermedad mencionada. Únicamente hubo 4 fincas que tenían cierto tipo de control con la vacuna RB51. Estudios demuestran que esta vacuna es mucho más segura que la Cepa 19, debido a que no causa problemas de titulación en las lecturas serológicas. Hay estudios que han tomado muestras después de vacunar con RB51 para aplicar pruebas diagnósticas como Rosa de Bengala, Fijación de Complemento y Elisa Competitivo demostrando que esta vacuna no interfiere con la lectura de las muestras (3, 15). El estudio de estas tres pruebas fue realizado en 100 vacas mayores a 18 meses, en donde los resultados en todos los bovinos resultó negativo (4).

#### **CONCLUSIONES:**

- El ELISA indirecto en leche fue exitosamente establecido como una herramienta diagnóstica de *Brucella abortus* en este estudio.
- El ELISA en leche me permite diagnosticar la presencia de la enfermedad en el hato, pero no me permite identificar la presencia de la misma en los animales.
- El ELISA indirecto en leche tiene una especificidad y sensibilidad mas alta que el Anillo en Leche.

- Los resultados obtenidos de la zona sugieren que los hatos infectados por *B. abortus* continúan alcanzando niveles que requieren la ejecución del programa de control debido.
- Se diagnosticó un 62.5% de positividad de *Brucella abortus* en una población total de 40 fincas, mediante el uso del kit Brucellosis Antibody Test Kit (Tank Milk) de IDEXX (ELISA).
- Esta condición representa un riesgo sanitario para la sociedad debido a que la enfermedad se puede distribuir de una manera muy fácil y afectar a la población humana por los hábitos de consumo de productos de la leche sin pasteurizar

**BIBLIOGRAFÍA:**

1. Agrocalidad. Instructivo Para Los Procesos De Certificación Y Recertificación De Predios Libres De Brucelosis Y Tuberculosis Bovina. Agrocalidad. 2016;34.
2. Agrocalidad. Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina. [Internet].; 2009. Disponible en: <http://www.agrocalidad.gob.ec/wpcontent/uploads/pdf/sanidad-animal/02-control-zoosanitario/Resolución%20025.pdf>.
3. Carbonero A, Guzmán LT, García-Bocanegra I, Borge C, Adaszek L, Arenas A, et al. Seroprevalence and risk factors associated with *Brucella* seropositivity in dairy and mixed cattle herds from Ecuador. *Trop Anim Health Prod. Tropical Animal Health and Production*; 2018;50(1):197–203.
4. Diptee MD, Adesiyun AA, Asgarali Z, Campbell M, Adone R. Serologic responses, biosafety and clearance of four dosages of *Brucella abortus* strain RB51 in 6-10 months old water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Vet Immunol Immunopathol*. 2006;109(1–2):43–55.
5. Gall D, Nielsen K. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Sci tech*. 2004;23(3):989-1002.
6. IDEXX. Brucellosis Serum X2 Ab Test. [Internet].; 2015. Disponible en: <https://www.idexx.com/livestock-poultry/ruminant/b-abortus.html>.
7. IDEXX. Kit para la detección de Anticuerpos frente a *Brucella abortus* en leche de bovino. [Internet].; 2015. Disponible en: <http://www.dimune.com/assets/06-40709-06-insert-brucellosis-milk-x2.pdf>.
8. INEC. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua. [Internet].; 2017. Disponible en: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/encuesta-de-superficie-y-produccion-agropecuaria-continua-bbd/>

9. INEC. Población por área, según provincia, cantón y parroquia de empadronamiento. [Internet].; 2016. Disponible en:  
<http://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-de-poblacion-y-vivienda/>
10. Jaramillo V, Yépez C. Determinación de seroprevalencia de brucelosis bovina en la provincia de Pastaza y posibles factores de riesgo asociados con la enfermedad. [Internet]. Quito: UCE; 2013. Disponible en:  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/3127>.
11. Ministerio de Salud Pública. GACETA EPIDEMIOLOGICA SEMANAL No. 39. Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. [Internet].; 2017. Disponible en: <http://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2013/02/Gaceta-General-SE39.pdf>
12. Ministerio de Salud Pública. GACETA EPIDEMIOLOGICA SEMANAL No. 52. Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. [Internet].; 2016. Disponible en: <http://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2013/02/GACETAGENERAL-SE52.pdf>.
13. Ministerio de Salud Pública. GACETA EPIDEMIOLOGICA SEMANAL No. 53. Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. [Internet].; 2016. Disponible en:  
<http://instituciones.msp.gob.ec/images/Documentos/gaceta/GACETA%20SE%2053.pdf>
14. OIE. Lista única de enfermedades de declaración obligatoria a la OIE para animales terrestres y acuáticos. [Internet].; 2017. Disponible en:  
<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2017/>.
15. Rivera DY, Rueda OE, Calderon CP, Mariño OC, Gall D, Nielsen K. Evaluación comparativa del método inmunoenzimático indirecto en leche para la detección de bovinos infectados con *Brucella abortus*, en hatos del departamento de Cundinamarca, Colombia. Rev sci tech Off int Epiz [Internet]. 2003;22(3):1065–75. Disponible en:  
<http://boutique.oie.int/extrait/26riveraes.pdf>

16. Rodriguez R, Contreras J, Benítez W, Guerrero K, Salcán H, Minda E, Ron L. Circulating Strains of *Brucella abortus* in Cattle in Santo Domingo De Los Tsachilas Province - Ecuador. Rev Public Health [Internet]. 2015; 45(3):1-5. Disponible en: <http://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4354208/>