

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias de la Salud

Identificación de la Presencia de *Brucella* en Cabras en la Zona Urbana de Quito

Carmen María Zabala Rodríguez

Gabriel Trueba, Ph.D, Director de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Medicina Veterinaria

Quito, Mayo 2013

**Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias de la Salud**

HOJA DE APROBACION DE TESIS

**Identificación de la Presencia de *Brucella* en Cabras en la Zona
Urbana de Quito**

Carmen María Zabala Rodríguez

Gabriel Trueba, Ph.D
Director de Tesis

.....

Richard Salazar, DMVZ
Miembro del Comité de Tesis

.....

María Inés Baquero, MSc
Miembro del Comité de Tesis

.....

Gabriela Chávez, DMVZ
Miembro del Comité de Tesis

.....

Luis Donoso, DVMZ
Decano de Escuela Medicina
Veterinaria

.....

Quito, Mayo 2013

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma:

Nombre: Carmen María Zabala Rodríguez

C. I.: 1711161578

Fecha: Mayo 2013

DEDICATORIA

Este es un tributo a mis padres por estar a mi lado siempre.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco por el financiamiento de este proyecto. Al Dr. Ramiro González por su apertura para la colecta de muestras en el Camal Metropolitano de Quito. Al Dr. Keith Poulsen de la Universidad de Wisconsin por el reactivo para Rosa de Bengala. A María Inés Baquero y Estefanía Bermeo por sus consejos técnicos. A Daysi Pinales por toda su ayuda. A mi familia por cada uno estar a mi lado y ayudarme a llevar a cabo este proyecto. A Felipe Brinkmann, gracias por tu apoyo y fuerza para llevarme a terminar mis metas.

RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad causada por una bacteria gram – negativa, *Brucella* sp. Esta bacteria tiene la facultad de infectar a una variedad de mamíferos. La infección puede causar aborto, orquitis, mastitis lo que determina en pérdidas económicas. La brucelosis es una enfermedad zoonótica conocida como fiebre ondulante en el humano, y es adquirida principalmente a través del consumo de lácteos no pasteurizados y carne cruda. El objetivo de esta investigación fue establecer la presencia de *Brucella* sp. ganglios linfáticos y suero de cabras faenadas en el Camal Metropolitano de Quito y en leche de cabra expedida en las calles de la ciudad. Se colectó un total de 300 muestras las cuales fueron analizadas serológicamente y molecularmente. Se obtuvo un 11.6% de positividad confirmando la presencia de *Brucella* sp. en las muestras analizadas. Este es el primer reporte de *Brucella* sp. en cabras ecuatorianas y evidencia un potencial riesgo de salud en la población que consume leche de estas características.

ABSTRACT

Brucellosis is a disease caused by a gram - negative bacteria called *Brucella sp.* This bacterium infects mammals that mainly cause abortion, orchitis, and mastitis. Brucellosis is also a zoonotic disease that causes undulant fever in humans and it is acquired mainly through consumption of unpasteurized milk and raw meat. The objective of this research was to investigate (molecularly and serologically) the presence of *Brucella sp.* in goat's lymph nodes, milk and sera. The lymph nodes and blood were collected from goats slaughtered at the local abattoir and in goat milk sold in the streets of Quito. The samples were collected from a total of 300 goats which were analyzed by PCR and Bengal Rose test. By combining molecular and serological results, we obtained 11.6% positivity confirming the presence of *Brucella sp.* in the goats sampled during this research. This is the first research of *Brucella sp.* in local goats, showing a potential health risk for individuals drinking unpasteurized goat milk in Ecuador.

Tabla de contenido

DEDICATORIA.....	5
AGRADECIMIENTOS.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
FIGURAS.....	10
TABLAS.....	10
1.INTRODUCCION.....	11
2. REVISION DE LITERATURA.....	13
2.1 Antecedentes.....	13
2.2 Etiología.....	14
2.3 Taxonomía.....	14
2.4 Virulencia.....	14
2.5 Patogenia.....	15
2.6 Sintomatología.....	15
2.7 Diagnóstico.....	16
2.7.1 Prueba serológicas.....	16
2.7.2 Pruebas microbiológicas.....	17
2.7.3 Pruebas moleculares.....	18
2.8 Tratamiento.....	19
2.9 Prevención.....	19
3. MATERIALES Y METODOS.....	20
3.1 Localidad de muestreo y método de colecta.....	20
3.2 Detección serológica por el método de Rosa de Bengala.....	20
3.3 Detección microbiológica por cultivo.....	21
3.4 Detección molecular.....	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
5. CONCLUSIONES.....	26
6. RECOMENDACIONES.....	27
7. FIGURA.....	28
8. ANEXOS.....	31
9. BIBLIOGRAFIA.....	32

FIGURAS

Figura 1.- Ubicación de las endotoxinas ubicadas en el lipopolisacárido en la membrana externa de *Brucella sp.*

Figura 2.- Distribución de las zonas donde se obtuvieron las muestras de leche en el Distrito Metropolitano de Quito

Figura 3.- Distribución de *Brucella melitensis* en el mundo en el año 2012 (WAHID-OIE)

TABLAS

Tabla 1.- Primers específicos para la amplificación *Brucella sp.* Y tamaño del fragmento.

Tabla 2.- Muestras analizadas para la presencia de *Brucella sp.* utilizando PCR y Rosa de Bengala en muestras de ganglios, leche cruda y suero.

Tabla 2.- Muestras de leche analizadas por Zonas en la ciudad de Quito.

1. INTRODUCCION

La Brucelosis es una enfermedad de origen bacteriana de distribución mundial que afecta a una variedad de mamíferos, como: bovinos, ovinos, caprinos, suinos, caninos, equinos, mamíferos marinos y humanos (Coetzer y Tustin, 2004). Esta enfermedad es causada por una bacteria del género *Brucella*, las especies son: *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. melitensis*, *B. cetaceae*, *B. pinnipediae* (Nicoletti, 2010).

La especie caprina es afectada por *Brucella melitensis* y *Brucella abortus*, la brucelosis causa aborto, retención de placenta, orquitis, epididimitis, y artritis; las vías de transmisión de la bacteria son principalmente: semen, fetos abortados, leche y orina (CFSPH, 2007). A más de estas vías, se puede encontrar la bacteria en fómites como agua, alimento, y tejidos linfáticos (CFSPH, 2007). Se estima que anualmente las pérdidas económicas en el Ecuador por brucelosis bovina oscilan alrededor de \$3'000.000USD anuales (MAG – SESA, 1999).

La brucelosis es una enfermedad zoonótica (OIE, 2011), la especie de mayor patogenicidad al humano es *Brucella melitensis* que causa Fiebre de Malta. El contagio puede producirse por la ingesta de leche cruda, manipulación de secreciones y el manejo inadecuado en el laboratorio. (OIE, 2011).

En Perú y Colombia se ha determinado una prevalencia de *Brucella melitensis* del 6,6% (Taboada *et al*, 2005), y 4% respectivamente. (Tique *et al*, 2010). Los estudios que se han realizado de brucelosis han sido dirigidos a detectar únicamente la presencia de *Brucella abortus* y *Brucella ovis*, sin embargo, no se ha establecido la presencia de *Brucella melitensis* en el Ecuador.

Ecuador tiene 178,367 cabras, las cuales se encuentran en mayor cantidad en la Sierra (Haro, 2003), las explotaciones no son tecnificadas y son propicias para el apareamiento de la enfermedad (Peruláctea, 2007). Un estudio por Ron y Benitez (2005) determinaron 16% de prevalencia de *Brucella abortus* en animales de la provincia de Pichincha.

En el Ecuador existe el hábito de consumir leche de cabra sin pasteurizar en la que se ha detectado coliformes y *Salmonella*. (Lozada, 2008) No existen datos registrados sobre *Brucella* en el Ecuador en la especie caprina, por este motivo este estudio investigará la presencia de la bacteria en dicha especie con el apoyo del laboratorio de Microbiología de Universidad San Francisco de Quito y la Universidad de Wisconsin.

1.1 Objetivo Principal

Investigar la presencia de *Brucella* en tejidos, sangre y leche de cabra en Quito.

1.2 Objetivos Específicos

- Detectar la presencia de anticuerpos mediante la prueba de Rosa de Bengala
- Aislar y tipificar a la bacteria en un medio enriquecido de Brucella Agar
- Identificar los factores de riesgo de la bacteria en un hato caprino

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Antecedentes

La bacteria fue descubierta por Sir David Bruce en 1887, en tejidos esplénicos provenientes de pacientes provenientes de la Isla de Malta. El nombre *melitensis* se deriva del romano Melita que significa miel, y era el nombre como se le conocía a esta isla (Romero, 2007). Actualmente se han identificado tres biovars de la especie *Brucella melitensis* los cuales fueron nominados 1, 2, 3. (Bricker y Halling, 1994)

Bernhard Bang en 1885 descubrió al microorganismo responsable de abortos en la especie bovina, a este se lo llamo *Bacterius abortus*. Se identificó que la morfología de los microorganismos que causaban la fiebre de malta o abortus eran similares, y en 1920 Alice Evans se establece el nombre de *Brucella spp.* (Rodríguez y Ramírez, 2005)

Brucella melitensis de reporte obligatorio desde el año 2006, con aproximadamente 500,000 casos reportados mundialmente en humanos cada año (Seleem, *et al*, 2010). Se conoce que la bacteria se encuentra distribuida mundialmente, pero se la encuentra en países donde el manejo sanitario es mínimo al igual que el manejo de salud de los animales.

Es una enfermedad endémica y zoonótica en diferentes partes del mundo (figura 3), como Oriente Medio, Mediterráneo, África, China, India, Perú, Nueva Zelanda, Australia. Datos sobre *Brucella melitensis* en México no han sido reportados (OIE, 2004).

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) ha catalogado la Brucelosis como una enfermedad de reporte obligatorio, y la CDC Center for Disease Control and Prevention, caracteriza a esta bacteria como un arma biológica (CDC, 2012).

2.2 Etiología

Brucella es una bacteria cocobacilo gram negativo cortos de 0.6 – 1.5 μm de largo por 0.5 – 0.7 μm de ancho, son aerobios, inmóviles, no esporulados y no capsulados, de crecimiento intracelular. (Romero, 2007). Hasta el momento se han identificado al menos 6 especies patógenas de *Brucella*, las principales son: *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. melitensis*, *B. cetaceae*, *B. abortus* (Nicoletti, 2010).

2.3 Taxonomía

La clasificación taxonómica de *Brucella spp* está constituida de la siguiente manera (Fátima y Garrido, 2002):

Género: *Brucella*

Dominio: Bacteria

Clase: *Proteobacteria*

Subclase: *Alphaproteobacteria*

Grupo: *Rhizobiales*

Familia: *Brucellae*

2.4 Virulencia

Brucella en su membrana externa, su lipopolisacárido, está constituida por una membrana externa rica en fosfatidilcolina. La bacteria tiene la capacidad de sufrir una variación antigénica, pasando de una morfología lisa a una rugosa perdiendo su virulencia dando una menor respuesta de los anticuerpos específicos de la bacteria. Al estar en la cepa lisa se vuelven resistentes a la destrucción intracelular de los

polimorfonucleares. Es importante recalcar que *Brucella* no produce exotoxinas. (Koneman *et al*, 2008)

La endotoxina está formada por tres regiones ubicadas en el lipopolisacárido: lípido A, oligosacárido intermedio y polisacárido O (Castro y Gonzales, 2005). (Figura 1). Los antígenos responsables de la virulencia son: antígeno A, antígeno M y antígeno R (Romero, 2007).

2.5 Patogenia

El ingreso de la bacteria a los animales se produce por el contacto con secreciones, consumo de leche, ingesta de la placenta, y también la bacteria tiene la capacidad de viajar en el ambiente como fómites encontrando en el agua y alimento. (CFSPH, 2007)

Una vez que ingresa la bacteria, son fagocitados por los polimorfonucleares PMN y viajan por vía sanguínea hacia los ganglios retrofaríngeos y mandibulares donde son liberados y comienzan a reproducirse. (Konemann *et al*, 2008) Posterior a esto viajan por la vía linfática y sanguínea hacia el resto de los ganglios para su eliminación (p.e: ganglio mamario, ganglio inguinal) (Romero, 2007).

2.6 Sintomatología

La cabra infectada presenta abortos en el último tercio de la gestación; retención placentaria; parición de crías débiles, y mastitis. En los machos puede causar: epididimitis; orquitis y artritis. Las lesiones macroscópicas se pueden clasificar en: edema; presencia de necrosis en la placenta y un exudado café- rojizo en el endometrio (Coetzer, 2004). La importancia de determinar la presencia de brucelosis en un hato está dada por un manejo delicado para su erradicación ya que su tratamiento es eliminar a

los positivos y llevar un buen manejo sanitario y de vacunas para controlar el ingreso del mismo.

Las especies que son portadoras de *Brucella melitensis* y que pueden transmitir la enfermedad a los humanos son caprinos, ovinos, bovinos y caninos (Godfroid, Nielsen y Saegerman, 2010). La brucelosis hacia en humanos ocurre por contacto directo con las secreciones, manipulación de abortos; o consumo de leche sin pasteurizar. La brucelosis tradicionalmente ha sido considerada una enfermedad ocupacional, ya que, puede afectar a veterinarios, granjeros, personal, laboratoristas y consumidores; razón por la cual la OIE categoriza a esta enfermedad como altamente contagiosa (OIE, 2004).

La enfermedad en el humano se la conoce como fiebre de Malta, y sus síntomas son episodios de fiebre intermitente, cefalea, debilidad y escalofríos.

2.7 Diagnóstico

Las técnicas de diagnóstico utilizadas para la detección de brucelosis se utilizan diferenciando en pruebas serológicas, moleculares y microbiológicas.

2.7.1 Prueba serológicas

Entre las pruebas rápidas de campo están las pruebas serológicas de Rosa de Bengala, Ring Test y ELISA. La prueba de Rosa de Bengala está compuesta por la presencia de un antígeno de la especie de *Brucella melitensis* teñido con Rosa de Bengala. (Arias y Cárdenas, 2008) Este reactivo se combina con suero del paciente, y se evalúa la presencia de aglutinación. Al observar aglutinación se puede identificar la existencia de anticuerpos frente al antígeno específico de *Brucella*. (Arias y Cárdenas, 2008). La prueba de Ring Test no se la recomienda para ganado rumiante pequeño,

pero si para ganado bovino. (OIE, 2004). Finalmente podemos utilizar la prueba de ELISA (enzimo-inmuno ensayos) en donde se utiliza antígeno ubicado en el lipopolisacarido de la cepa lisa de *Brucella*. Se describe que la sensibilidad de esta prueba es similar o mejor que la de Rosa de Bengala, pero con el mismo inconveniente que no podemos diferenciar si el animal es positivo por enfermedad o por la presencia de anticuerpos por vacunación (OIE, 2004).

2.7.2 Pruebas microbiológicas

Se recomienda tomar muestras de placenta, útero, feto, leche, semen, y ganglios. (Godfroid, Nielsen y Saegerman, 2010) *Brucella* necesita de un medio selectivo y enriquecido como son los de Thayer Martin y Farrell. La diferencia entre éstos radica en la administración de antibióticos para controlar el crecimiento de bacterias no deseadas que pueden inhibir el crecimiento de *Brucella* (Marin, Alabart y Blasco, 1996).

Un estudio por Marin, Alabart y Blasco (1996) comparan los antibióticos utilizados tanto en el medio selectivo de Farrell y el de Thayer Martin para tener una correlación de cuales favorecen el crecimiento de las cepas deseadas. Para el caso de *Brucella melitensis* la bacitracina y acidonalidixico disminuían su crecimiento, contrario a la vancomicina y polimixina B.

El medio de cultivo de *Brucella* es enriquecido con proteínas y fuentes de energía para favorecer el crecimiento de la bacteria deseada. A este medio de cultivo se le añaden los antibióticos específicos, controlando el crecimiento de microorganismos fastidiosos para la *Brucella*. (BD, 2003)

Brucella es una bacteria de crecimiento lento y requiere CO₂, se puede observar crecimiento desde el 2 día y puede extenderse hasta 15 días. Se recomienda realizar pruebas complementarias para una colonia sospechosa; estas pruebas consisten en una

tinción Gram para identificar su morfología; cocobacilo gram negativo, (Godfroid, Nielsen y Saegerman, 2010) continuando con una prueba específica para *Brucella* la Tinción Modificada de ZiehlNeelsen; esta prueba tiñe de color rosa a las cepas de *Brucella*(OIE, 2009). En complemento a esto existen pruebas metabólicas características de cada especie como son catalasa, oxidasa, urea; para el caso específico de *Brucella melitensis* esta tiene una reacción positiva a cada una de las pruebas (Godfroid, Nielsen y Saegerman, 2010).

2.7.3 Pruebas moleculares

Estas pruebas ayudan a identificar la presencia de la bacteria y tipificar al biovar presente; a esta prueba se la conoce como PCR (reacción de la cadena de polimerasa). La PCR fue inventada en 1970 por KaryMullis y colaboradores como una amplificación in vitro de genes mamíferos. (Sambrock y Russell, 2001). Esta prueba es llevada a cabo en un termociclador, donde existe una variación de temperaturas simulando la replicación y amplificación de ADN en las células.

La prueba de PCR está constituida por 3 partes. La primera es la preparación de la reacción; la segunda parte es la del PCR, la cual se hace en un termociclador; y la tercera es visualizar la amplificación del gen por medio de la electroforesis. La preparación de PCR requiere de ciertos componentes que varían en sus concentraciones para cada bacteria y especie. (Sambrock y Russell, 2001)

Una vez formada la reacción con cada componente, se coloca a la muestra en un termociclador, el cual es una maquina que maneja diversas temperaturas. En esta parte se produce la amplificación de una secuencia deseada. El PCR es un proceso compuesto de 3 elementos:

- Denaturación: Aquí la temperatura del termociclador sube hasta provocar que las cadenas de ADN se separen la una de la otra.

- Alineamiento: La temperatura del termociclador baja y los oligonucleotidos identifican la secuencia complementaria en el ADN y se une para replicarse
- Extensión: en este paso la taq polimerasa, dNTP's y cationes se unen para sintetizar la nueva cadena de ADN.

Es muy importante que la secuencia de oligonucleótidos sea específica para el microorganismo deseado, para evitar así la presencia de bandas inespecíficas y posibles resultados falsos positivos. (Sambrock y Russell, 2001) La electroforesis ayuda para separar, purificar e identificar los fragmentos de ADN. (Sambrock y Russell, 2001)

Todas las pruebas expuestas son importantes, y cada una acerca hacia una respuesta más confiable sobre la situación del hato, sea para la identificación de una enfermedad, control o erradicación de la misma.

2.8 Tratamiento

Una vez diagnosticada la enfermedad, el tratamiento se basa en antibióticos como tetraciclina, estreptomina (Romero, 2007) intercalando por largo tiempo (Franco *et al*, 2007). Si la infección no es diagnosticada y medicada, esta puede llegar a afectar al hígado y al bazo (Nicoletti, 2010).

En animales no existe un tratamiento, una vez que ingresa la bacteria al hato se procede a su eliminación y posterior prevención de la enfermedad. (OIE; 2011)

2.9 Prevención

La prevención de *Brucella* en los hatos caprinos es por una mejora en el manejo sanitario y con la implementación de la vacuna *Rev 1*, específica para *Brucella melitensis*. (Fátima y Garrido, 2002)

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localidad de muestreo y método de colecta.

Las muestras recolectadas entre el 1 de Julio del 2011 hasta el 10 de Septiembre del 2011, se recolectó un total de 300 animales: 100 de leche, 100 de suero y 100 de ganglios linfáticos (retrofaríngeo e inguinal).

Todas las muestras fueron tomadas en el Distrito Metropolitano de Quito. Las 100 muestras de sangre y 100 de ganglios linfáticos fueron colectadas del Camal Metropolitano de Quito los días lunes y miércoles mediante una selección aleatoria de 25 muestras en 8 visitas.

Cien muestras de leche fueron tomadas en las calles de la ciudad de Quito: Se dividió a la ciudad en 4 zonas para tener un muestreo general, en cada una se recolectó un total de 25 unidades. Las zonas establecidas fueron las siguiente: Zona 1 Sur de Quito, Calle Quitumbe, Av. Moran Valverde, Barrio el Pintado Calle Atahualpa y Mariscal Sucre, Mariscal Sucre y Guaynafalcon, Mariscal Sucre y Alonso De Angulo, Barrio Ferroviaria, Moraspungo, Panamericana Sur, Calle Maldonado; Zona 2 Noroeste, Autopista Manuel Córdova Galarza, Barrio San Mateo, Oyacoto, Calderón: Mercado de Calderón; Zona 3 Norte, Av. Eloy Alfaro [frente a la embajada Americana], Av. Amazonas y Calle Ñaquito, Barrio Comité del Pueblo Av. Francisco De la Torre, Mercado Central de Cotocollao; Zona 4 Este, Mercado Central Sangolquí, Conocoto: Plaza Central de Conocoto, Amaguaña: Mercado Central de Amaguaña. (Figura 2).

3.2 Detección serológica por el método de Rosa de Bengala

Las muestras de suero fueron analizadas utilizando la prueba de Rosa de Bengala (Samartino, 2002). En un tubo tapa roja sin anticoagulante se recolectó 9ml de sangre yugular en el degüelle. Las muestras se colocaban verticales para promover la

separación del suero. En el laboratorio se centrifugaban las muestras a 2000rpm por 5 minutos para separar los glóbulos rojos del suero. A continuación se procedía a enumerar las placas y se colocaba 25µl del reactivo Rosa de Bengala (AcrosOrganics, New Jersey, EE.UU) con 75µl de suero. Para ver los resultados se colocaba a la placa sobre una superficie blanca a los 4 minutos, y se observa si existía aglutinación.

3.3 Detección microbiológica por cultivo

En el faenamiento se procedía a disectar los ganglios retrofaríngeo e inguinal y se colocaba en una funda sellada WhirlPack. Las muestras eran transportadas al laboratorio en cooler a 4°C.

Las muestras de leche fueron tomadas directamente en tubos Falcom de 50ml y se centrifugó por 17 minutos a 6000rpm.

En el laboratorio se maceraron los ganglios y se estría en un medio selectivo sólido a base de Agar Base y se le añaden antibióticos como vancomicina y discos de polimixina B.

Se colocaban a las cajas petri en un medio con CO₂, a 37°C por 7 días. Desde el 3 día se revisaba si había crecimiento de colonias pequeñas translúcidas.

Toda colonia que crecía se hacía pruebas bioquímicas, al ser positivas se procedía con tinción gram, si se observaba en el microscopio cocobacilos gram negativo se procedía a hacer una tinción modificada de ZiehlNielsen.

3.4 Detección molecular

Extracción de ADN. La extracción de ADN a partir de los tejidos y de las muestras de leche fue realizada utilizando CTAB (Merck, Darmstadt, Germany) con el

procedimiento previamente utilizado por Baquero *et al.* [30]. La extracción de ADN a partir de las muestras de sangre se utilizó un kit de promega.

Brevemente se maceraron a los ganglios con 1000 μ L de PBS 1X (137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4 , 1.4 mM KH_2PO_4 , pH 7) se procedía a centrifugar por 5 minutos a 3000 rpm. Se colocó 700 μ L de CTAB (CTAB 2% p/v, ClNa 1.4M, EDTA 20 mM, HCl 100 Mm, pH 8) en la muestra, luego se incubó la muestra a 65°C durante dos horas a los ganglios y por media hora la muestra de sangre. Una vez concluido, se añadió 700 μ L de una relación 24:1 de cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugó a 15 115 \times g. Al sobrenadante se adicionó 1000 μ L de etanol absoluto y 50 μ L de acetato de sodio (3M, pH 5) e incubó a -20°C durante 24 horas. Finalmente, el precipitado de ADN fue lavado con etanol 70%. Las muestras fueron resuspendidas en buffer TE (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH 8) y conservada a -20°C. Para la extracción de ADN en leche se utilizaba un volumen de 500 μ L de muestra y se continúa con el mismo protocolo.

PCR. Para descartar la presencia de compuestos inhibitorios y como control de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se amplificaron las muestras con cebadores para beta-actina (Arias y Cárdenas, 2007). Una vez confirmada la primera amplificación para todas las muestras, se procedió con el PCR para detección de *Brucellasp.* (Bricker y Shirley, 1994). La tabla 1 muestra las secuencias de los cebadores utilizados con sus respectivos tamaños de amplicón. Para el set de primers se utilizó: 1.5mM de MgCl_2 , 1X Buffer, 0.2mM dNTP's, 0.4 μ M de cada primer, 2X BSA, 0.5U Taq.

El protocolo para la PCR utilizada fue: denaturación inicial 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 58.1°C por 1 minuto y una extensión a 72°C por un minuto y finalmente una extensión final a 72°C

por 5 minutos. El control positivo utilizado fue la vacuna Rev 1. Los resultados de los dos PCR fueron visualizados utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Los resultados positivos fueron confirmados con secuenciamiento de 4 amplicones obtenidos con los cebadores para *Brucellasp*. El secuenciamiento fue realizado en los laboratorios FUNCTIONAL BIOSCIENCES (Madison, Wisconsin EEUU), las secuencias obtenidas se alinearon con el programa MEGA 5.1 para luego ser comparadas con secuencias del GenBank utilizando BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis serológico y molecular de las 300 muestras de cabra en leche, ganglio y suero mostró un 11.6% de positividad para *Brucellasp.* Los resultados de la PCR en los ganglios obtenidos de cabras faenadas en el Camal Metropolitano de Quito dieron un 8% de positividad mientras que las muestras de suero (prueba Rosa de Bengala) arrojaron un 17.8% de positividad. Las 100 muestras de leche de cabra recolectada en las calles de la ciudad de Quito y analizadas mediante PCR, evidenciaron un 9% de positividad para *Brucellasp.* (tabla 2), dos de las cuatro zonas analizadas fueron positivas (tabla 3). Investigaciones previas han demostrado la presencia de este patógeno en bovinos ecuatorianos con una positividad del 16% para *Brucellaabortus*(Ron y Benitez, 2005), sin embargo no existían datos reportados en caprinos.

Brucellamelitensis ha sido reportada desde hace varios años en países vecinos (Taboada *et al*, 2005). Perú reportó en el 2003 una seroprevalencia de 5,7% en cabras (Taboada *et al*, 2005) , Argentina 4% (Samartino, 2002). Es importante mencionar que existe una alta migración de cabras desde países fronterizos, esto se evidencia al encontrar en el Camal Metropolitano de Quito animales provenientes de Piura, Perú.

Las muestras de sangre analizadas por el método de Rosa de Bengala mostraron aglutinación en 18 muestras, es decir un 18% de positividad. Estas muestras luego fueron corridas por PCR pero no se obtuvo amplificación, esta causa puede haberse dado ya que la prueba serológica mide la presencia de anticuerpos a un antígeno específico en la sangre mas no la presencia de la bacteria con el ADN como la hace la PCR.

Para hacer la prueba de Rosa de Bengala en caprinos con el antígeno de brucelosis bovina, la OIE recomienda que se utilice una relación 1:3 suero y reactivo para

evidenciar de mejor forma la aglutinación (OIE, 2004), a esto se lo conoce como efecto Prozona. Este efecto lo que causa es al disminuir la concentración de anticuerpo la precipitación es más rápida y más intensa (Fuentes *et al*, 1998)

Al medio de cultivo Agar Brucella se añadió vancomicina en una concentración de 20µg/ml para evitar el crecimiento de colonias gram positivas. Al ver que las muestras estaban contaminadas por colonias distintas a las de *Brucella* se procedió a implementar discos de polimixina B en la última estriación. Se hizo pruebas bioquímicas complementarias, como son las pruebas de catalasa y oxidasa (Alton G, *et al*, 1988). Al tener positividad en las dos pruebas bioquímicas se hacia las pruebas de tinción gram y la tinción modificada de ZiehlNeelsen. En este método diagnóstico no pudimos aislar a la bacteria.

Aunque el alcance de este estudio no fue identificar la especie de *Brucella* circulante, existe una alta probabilidad de que sea *B. melitensis*. Esta especie bacteriana se encuentra generalmente asociada a caprinos y ovinos (OIE, 2009). En humanos, este patógeno produce la denominada fiebre de malta (CFSPH, 2007) que puede causar cefaleas, fiebre intermitente, anorexia, dolores óseos y llegar a afectar órganos específicos como corazón, hígado, y bazo (Argos, 2009)

5. CONCLUSIONES

Este es el primer estudio que detecta la presencia de *Brucella* sp. en leche caprina expendida en las calles del distrito metropolitano de Quito. Este hallazgo alerta del riesgo que implica el consumo de este producto.

La producción de la especie caprina en el Ecuador ha ido creciendo en los últimos años, al igual que su consumo. La ingesta de leche cruda de cabra es muy común en nuestro país debido a que se le atribuye una variedad de propiedades curativas. Los resultados del presente estudio encontraron una positividad de 9% en la leche de estas cabras, lo cual demuestra que la práctica popular mencionada es un factor de riesgo para adquirir brucelosis y por tanto constituye un problema de salud para la población. Es importante instruir a los pequeños ganaderos y vendedores de leche cruda en las calles de Quito para que aseguren a sus clientes con un producto saludable e inocuo para el consumo humano. La brucelosis es fácilmente prevenible si se adoptan medidas como son la aplicación de la vacuna y mejoras sanitarias.

Es importante recalcar que este estudio se hizo con un muestreo aleatorio, es decir que no se buscaban animales con sintomatología como mastitis, orquitis, aborto, entre otras. Este hallazgo es importante porque la gente que consume la leche sin pasteurizar esta ingiriendo un alimento no apto para la salud. Esto debe ser controlado y modificado, se conoce que el consumo de leche cruda de cabra en el Ecuador tiene un antecedente cultural, por lo que, se debe instaurar un control minucioso identificando el agente causal específico y posteriormente la vacunación de los animales.

6. RECOMENDACIONES

- Hacer un muestreo representativo para el Ecuador, para de esa manera poder determinar el estado real de la enfermedad en el país.
- Hacer PCR específico para *Brucellamelitensis* para de esta manera conocer si son animales infectados por la bacteria o son portadores de una vacuna
- Se debe hacer un seguimiento de este estudio ya que se debe reportar a los animales enfermos a la entidad de la OIE
- Implementar medidas de control para las cabras en el Ecuador.

7. FIGURA

Figura 1: Ubicación de las endotoxinas ubicadas en el lipopolisacárido en la membrana externa de *Brucellasp.*

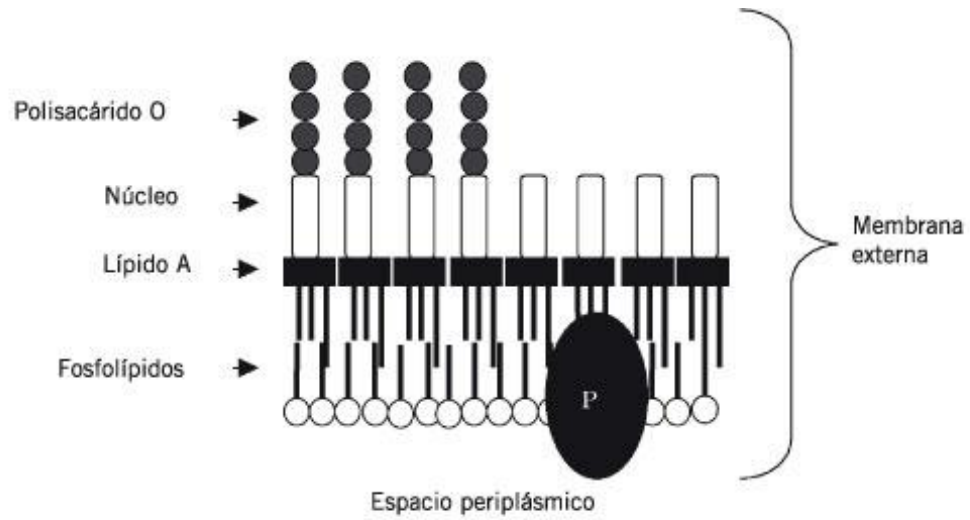


Figura 2: Distribución de las zonas donde se obtuvieron las muestras de leche en el Distrito Metropolitano de Quito.

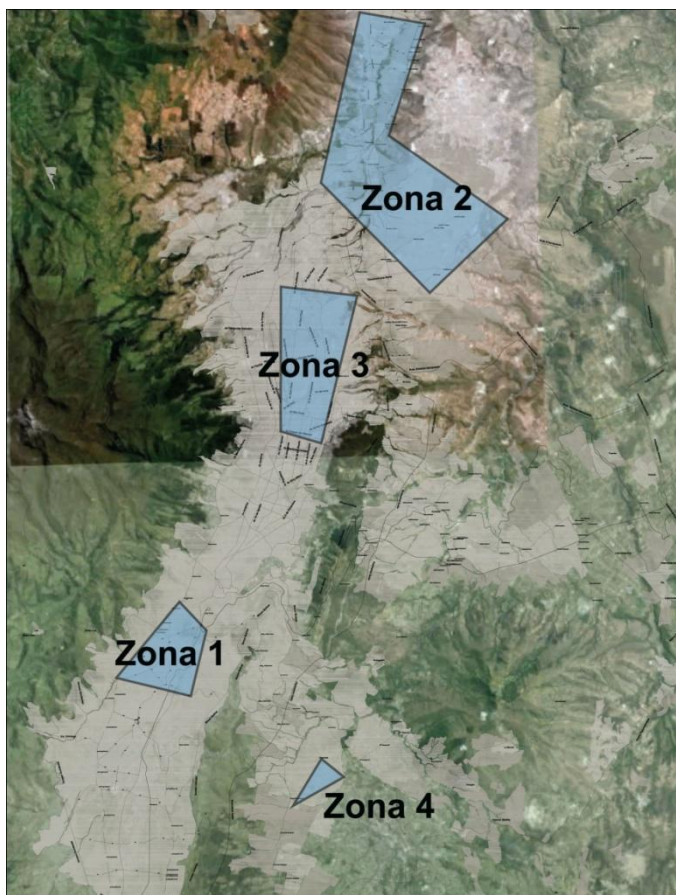
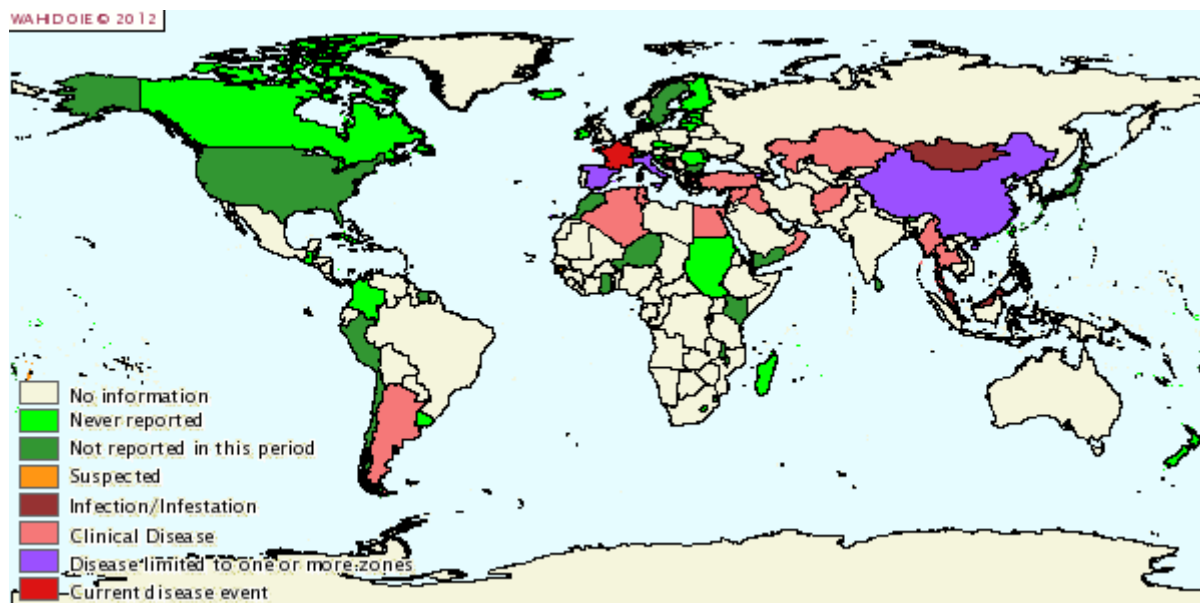


Figura 3: Distribución de *Brucellamelitensis* en el mundo en el año 2012 (WAHID – OIE)



8. ANEXOS

Tabla 1. Primers específicos para la amplificación *Brucellasp.* y tamaño del fragmento.

Primer	Secuencia	Tamaño del Fragmento amplificado
M20404 [17]	5'CAATCTCGGAACTGGCCATCTCGAACGGTAT3' 5'ATGTTATAGATGAGGTCGTCCGGCTGCTTGG3'	220 bp

Tabla 2. Muestras analizadas para la presencia de *Brucellasp.* utilizando PCR y Rosa de Bengala en muestras de ganglios, leche cruda y suero.

Tipo de muestra	Método de detección	No. de muestras analizadas	Muestras positivas	% de positividad
Ganglio	PCR	100	8	8%
Leche cruda	PCR	100	9	9%
Suero	Rosa de bengala	101	18	17.8%

Tabla 3. Muestras de leche analizadas por Zonas en la ciudad de Quito

Zona	Muestras	Positivos	% Positivismo
Zona 1	25	2	2%
Zona 2	25	7	7%
Zona 3	25	0	0%
Zona 4	25	0	0%
TOTAL	100	9	9%

9. BIBLIOGRAFIA

1. Coetzer J, Tustin R. Infectious Diseases of Livestock. Segunda edición. Volumen 3. South Africa: Oxford University Press. 2004.
2. Nicoletti P. Brucellosis: past, present and future. Biol. Med. Sci. 2010;31: 21-32.
3. Brucellosis: Undulant Fever, Malta Fever, Mediterranean fever, epizootic abortion, enzootic abortion, contagious abortion, Bang's Disease. CFSPH. Julio 2007: 1- 13.
4. OIE. Brucellosis. 2011-03-31. http://www.oie.int/fileadmifn/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BCLS-EN.pdf
5. Ron J, Benitez W. Brucelosis Bovina. Mundo Veterinario. Revista del Colegio de Médicos Veterinarios de Pichincha. 2005; 5: 10 – 11.
6. Arcos, G. La Caprinotecnia. Vademecum Veterinario. Ecuador: Edifarm.2009
7. Haro R. I Informe sobre recursos zoogeneticos Ecuador. Ministerio de Agricultura y Ganaderia. 2003. <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/genetics/documents/Interlak/en/countryreports/Ecuador.pdf>
8. Taboada N, Campos M, Leiva R, Gómez J, Mancilla C, Salazar M. Seroprevalencia de brucelosis en ganado caprino en hatos del Callao, Perú, 2003. RevPeruMedExp Salud Publica. 2005;22: 139 – 144.
9. Tique V, Daza E, Alvarez J, Mattar S. Seroprevalencia de *Brucella abortus* y ocurrencia de *Brucella melitensis* en ovinos y caprinos de Cesar y Sucre. Act&Div. Cient. 2010;13: 133 – 139.
10. Leche de Cabra en Quito (video recording). La Televisión (NJ): Lozada, G. 2008.
11. Morera M, Acosta M. Prueba de Rosa de Bengala y/o Tarjeta en el Diagnóstico de Brucelosis Bovina. Senasa .(On Line). 2011; Disponible: URL:<http://www.senasa.gob.pe/RepositorioAPS/0/4/JER/INFOINTER/Prueba%20de%20Rosa%20de%20%20Bengala.pdf>

12. Radostitis OM, Arundel JH, Gay CC. Veterinary Medicine. 9^{ena} edición. Elsevier. USA. 1999.
13. Marín CM, Alabart JL, Blasco JM. Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis*, and *B. ovis*. J Clin Microbiol. 1996;34:426 – 428
14. Gordon RC, Darla JW. Essentials of Veterinary bacteriorology and mycology. 6ta edición. Wiley – Blackwell. 2004.
15. Alvarez L, Duran M, Gómez B, Garrido F, Yustes C, Vendrell J, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF, Vela AI, Latre MV. Determinación de los tejidos y medios de elección para la confirmación microbiológica de los resultados serológicos de las campañas de control de *Brucella melitensis* en el ganado ovino. Arch Med Vet. 2010;42:43-49
16. Romero R. Microbiología y Parasitología Humana. 3era edición. México: Editorial Panamericana, 2007.
17. Bricker B, Shirley H. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv 1 by PCR. J. CLIN. MICROBIOL. 1994; 32: 2660 – 2666.
18. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004. Brucelosis Caprina y Ovina. Francia: OIE, 2004.
19. Glynn M, Lynn T. Brucellosis. JAVMA. 2008; 233: 900-908.

20. Animal Disease FactSheets. Ovine and Caprine Brucellosis: *Brucellamelitensis*. USA(Iowa): CFSPH, 2007.
21. Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Croat Med J.* 2010; 51: 296 – 305
22. Franco M, Mulder M, Gilman R, Smits H. Human Brucellosis. *Lancet Infect Dis.* 2007; 12: 775 – 786.
23. Arias Y, Cárdenas B. Diagnostico de Brucelosis en ovinos con antígeno Rosa de Bengala al 3 y 8%. *Rev. Unell. Cienc. Tec.* 2007; 25: 40 – 43
24. Marin C, Alabart J, Blasco J. Effect of antibiotics Contained in Two *Brucella* Selective Media on Growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis*, and *B. ovis*. *J. CLIN. MICROBIOL.* 1996; 34: 426-428.
25. Instrucciones de uso- medios en placa listos para usar. BD *Brucella* Agar with 5% Horse Blood. Francia: BD Diagnostic Systems. 2003.
26. OIE. 2009. OIE Terrestrial Manual: Caprine and Ovine Brucellosis [excluding *Brucella ovis*] Chapter 2.7.2..
27. Sambrock J, Russell. *Molecular Cloning*. 3era edición. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
28. Samartino, L. “Brucellosis in Argentina”, *Veterinary Microbiology*. 2002, 90: 71 – 80
29. Arcos, G. 2009. “La Caprinotecnia. *Vademécum Veterinario*”, Edifarm. Ecuador.

30. Castro H, Gonzalez S, Prat M. “Brucelosis: una revisión práctica”, Acta bioquim. Clin. Latinoam. 2005, 39: 203 – 216.
31. Fuentes, X. Castiñeiras, M. Queraltó, J, “Bioquímica Clínica y Patología Molecular” 2nda edición. Reverté, S.A. Barcelona. 1998.
32. Alton, G. Jones, L. Angus, R. Verger, J. “Techniques for the brucellosis laboratory” INRA. Paris. 1988
33. MAG-SESA, 1999. Prevención y control de la brucelosis bovina en Ecuador. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria
\$\$\$\$
34. Košneman I, Allen, Janda, Winn, Procop, Schreckenber, Woods. “Diagnóstico Microbiológico”. Sexta Edición. Argentina. Editorial Panamericana. 2008.
35. Seleem, MN. Boyle, MN. Sriranganathan N. “Brucellosis: a re- emerging zoonosis” Vet Microbiol. 2010: 140; 392 – 398
36. Ceenter for Disease Control and Prevention. “Brucellosis” November, 2012.
<http://www.cdc.gov/brucellosis/exposure/areas.html>
37. WAHID. 2012. Disease Distribution maps.
http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap
38. Rodriguez, Y. Ramirez, W. Antúnez, G. Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. Rev. Redvet. 2005: 9; 1-9
39. Fátima, M. Garrido, A. Género Brucella: Manual de Microbiología Veterinaria. Madrid, España. Mc Graw Hill Interamericana. 2002

