

**BRUCELOSIS CAPRINA EN CHACO: EPIDEMIOLOGIA DE LA  
ENFERMEDAD Y RESPUESTA INMUNE DE LA VACUNA *B. melitensis* REV-1**

**Nolly María Monzón**

**Tesis presentada a la Carrera de Doctorado en Ciencias Veterinarias como  
requisito para acceder al grado de**

**DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE  
EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Facultad de Ciencias Veterinarias  
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE**

**Corrientes, 7 de septiembre de 2022**

**BRUCELOSIS CAPRINA EN CHACO: EPIDEMIOLOGIA DE LA  
ENFERMEDAD Y RESPUESTA INMUNE DE LA VACUNA *B. melitensis* REV-1**

**Nolly María Monzón**

**Dirección: Carlos Alejandro Robles**

**Co-dirección: Diana Elina Martínez**

**Jurado de Tesis:**

**Dra. María Fabiana Cipolini Galarza**  
**Universidad Nacional del Nordeste - UNNE**

**Dr. José Luis Konrad**  
**Universidad Nacional del Nordeste - UNNE**

**Dra. María Graciela Draghi**  
**INTA – Mercedes (Corrientes)**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo lo dedico especialmente a mis hijos Juan Francisco, Carmelita y María Paz por haber sido la motivación más grande de superación personal y quienes con sus pocos años, aprendieron a acompañarme desde su inocencia, a través de risas, llantos y juegos, que muchas veces tuvieron que esperarme durante este largo camino. A mi esposo Cristian, quien me acompañó en este trayecto y fue incondicional en diferentes instancias de trabajo de campo e intelectual. A mis padres, Jorge y María Celia, que con su ejemplo me incentivaron, acompañaron y ayudaron, tanto con mis hijos como con los distintos obstáculos que se presentaron a lo largo del tiempo. A mis hermanas, Celi, Fer y Marel que siempre estuvieron para escucharme y darme las fuerzas necesarias para seguir adelante. En síntesis, esta dedicatoria es para mi familia, quienes nunca me dejaron bajar los brazos.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera empezar por agradecer a mi director Carlos Robles y mi co-directora Diana Martínez por haber estado conmigo durante todo el camino de preparación de este trabajo de investigación poniendo su mejor predisposición para analizar mis avances y sugerir mejoras que lograron desafiarme a generar nuevas ideas y profundizar aquellas existentes. A Roberto Jacobo por darme la oportunidad de trabajar en la Cátedra de Enfermedades Infecciosas dentro de la Facultad. A Fabiana Cipolini por sus consejos y acompañamiento. A Gaby Espasandín por haber sido una amiga y compañera de trabajo incondicional. A Rocío Sandobal por estar siempre al pie del cañón, dispuesta a trabajar de sol a sol. A Carlos Storani, Billy Cardozo, Matías Rouvier, Irina Martínez, José Cao, Enrique Yañez y Pascual Ligios quienes desde sus experiencias profesionales me enseñaron y ayudaron en distintas instancias del trabajo de campo. A todos los ayudantes alumnos de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas, que con buena predisposición participaron de las diferentes actividades durante el ensayo vacunal y trabajos en el Impenetrable Chaqueño. A Miriam Mortarini y Julio Mellano, quienes me invitaron a formar parte de un proyecto que cambió radicalmente el rumbo de mi vida académica. A Eduardo y Federico Lottero Lanari que prestaron el establecimiento rural para llevar adelante el ensayo vacunal durante un año, comprometiéndose con el cuidado de los animales de experimentación.

A Carlos Corsi, Ina Lozina, Puly Yulán, y Juan José Scheffer entre otros técnicos de terreno del Ministerio de Producción de la provincia del Chaco, por la colaboración para localizar pequeños productores y asistir con la toma de muestras de caprinos en el Impenetrable Chaqueño. A Alicia Acosta, Rodrigo Arzú y Nadia Robledo quienes asistieron con los análisis serológicos en el Laboratorio de Sanidad Animal perteneciente al Ministerio de Producción del Chaco.

A María Marta Chodilef y Alejandra Abdala del INTA Bariloche por colaborar con los diagnósticos serológicos y moleculares. A Belén Novoa del INTA Rafaela por la realización del diagnóstico serológico de Fijación de Complemento. A Fabiana Moreno por la realización del mapa de geolocalización de los establecimientos visitados en el Dpto. Gral Güemes. A Érika Sticotti y todo el grupo de Sanidad de Rumiantes de la Facultad de

Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Río Cuarto por la ayuda para la obtención de los cultivos bacteriológicos. A Gabriela Escobar y todo el staff del laboratorio de Brucelosis ANLIS Malbrán por el procesamiento de muestras. A Silvia Mazza, por la asistencia en los análisis estadísticos y sus consejos que fueron muy provechosos para avanzar en esta investigación. A Rubén Sadi, quien con mucha dedicación me transmitió múltiples conocimientos en torno al manejo del mundo administrativo. Sin él no hubiera sido posible llegar a esta instancia.

A mis amigas del alma: Inés, Jime, Tati, Flor y Ceci por haber estado siempre apoyándome desde su presencia y buen humor a través de innumerables reuniones que transformaron este arduo camino en momentos que afronté con mucho entusiasmo y positivismo.

Gracias a todas las personas que participaron de una u otra forma para permitirme llegar a esta instancia.

*If opportunity doesn't knock... build a door.*

*(Si la oportunidad no golpea a tu puerta... construye la puerta) Milton Berle*

## INDICE

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
ÍNDICE .....	iv
LISTADO DE TABLAS .....	vi
LISTADO DE FIGURAS .....	viii
ABREVIATURAS .....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Descripción del problema.....	1
1.2. Importancia del estudio .....	3
1.3. Hipótesis y objetivos .....	3
1.4. Estado del conocimiento.....	4
<b>II. METODOLOGÍA.....</b>	<b>20</b>
2.1. Técnicas para detección del agente .....	20
2.2. Técnicas para detección de respuesta humoral .....	22
2.3. Metodología específica .....	29
<b>III. RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
3.1. Evaluación de técnicas serológicas con muestras de campo.....	42
3.2. Estudio de la respuesta inmune con REV-1 .....	49
3.3. Prevalencia de brucelosis caprina en Chaco .....	64
3.4. Determinación de cepas actuantes.....	73
<b>IV. DISCUSIÓN .....</b>	<b>76</b>
4.1. Evaluación de técnicas serológicas con muestras de campo.....	76
4.2. Estudio de la respuesta inmune con REV-1 .....	78
4.3. Prevalencia de brucelosis caprina en Chaco .....	82
4.4. Determinación de cepas actuantes.....	89
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>92</b>

VI. PROPUESTAS .....	94
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	96
ANEXO I Encuesta epidemiológica.....	105

## LISTADO DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación de grupos experimentales para vacunación con REV-1
- Tabla 2.** Diseño experimental para determinación de prevalencia de brucelosis caprina
- Tabla 3.** Cantidad de establecimientos a muestrear para determinación de prevalencia de brucelosis caprina
- Tabla 4.** Total de encuestas epidemiológicas realizadas para identificación de posibles factores de riesgo
- Tabla 5.** Resultados serológicos de las técnicas de BPA, ELISAI y FPA sobre sueros de campo
- Tabla 6.** Tabla de contingencia de resultados serológicos de ELISAI y FPA en contraste con FC
- Tabla 7.** Resultados de Área bajo la curva ROC para las técnicas de BPA, ELISAI y FPA
- Tabla 8.** Resultados de parámetros para evaluación de desempeño de las técnicas BPA, ELISAI y FPA
- Tabla 9.** Resultados de estimación de Chi cuadrado ( $X^2$ ) sobre resultados de técnicas serológicas FPA, ELISAI versus FC
- Tabla 10.** Análisis de la Variancia para la técnica de ELISAI sobre sueros de caprinos vacunados
- Tabla 11.** Análisis de la Variancia para la técnica de ELISAb sobre sueros de caprinos vacunados
- Tabla 12.** Análisis de la Variancia para la técnica de FPA sobre sueros de caprinos vacunados



- Tabla 13.** Establecimientos visitados y animales muestreados en el Dpto. Gral. Güemes-Chaco
- Tabla 14.** Variables analizadas estadísticamente para determinación de potenciales factores de riesgo o protección
- Tabla 15.** Datos de stock recopilados mediante encuestas epidemiológicas
- Tabla 16.** Resultados de Odds Ratio y  $X^2$  para variables analizadas estadísticamente
- Tabla 17.** Resultados de cultivos bacteriológicos
- Tabla 18 (A y B).** Resultados de tipificación tradicional sobre cultivos bacteriológicos

## LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.** Corrales de experimentación para vacunación con REV-1
- Figura 2.** Localización de CEDEPRO's
- Figura 3.** Análisis ROC BPA
- Figura 4.** Análisis ROC ELISAI
- Figura 5.** Análisis ROC FPA
- Figura 6.** Curva de anticuerpos obtenida por la técnica de ELISAI
- Figura 7A.** Curva de anticuerpos obtenida por la técnica de ELISAI en hembras
- Figura 7B.** Curva de anticuerpos obtenida por la técnica de ELISAI en machos
- Figura 8.** Curva de anticuerpos obtenida por la técnica de ELISAb
- Figura 9A.** Curva de anticuerpos obtenida por la técnica de ELISAb en hembras
- Figura 9B.** Curva de anticuerpos obtenida por la técnica de ELISAb en machos
- Figura 10.** Curva de anticuerpos obtenida por la técnica de FPA
- Figura 11A.** Curva de anticuerpos obtenida por la técnica de FPA en hembras
- Figura 11B.** Curva de anticuerpos obtenida por la técnica de FPA en machos
- Figura 12.** Georreferenciación de establecimientos positivos y negativos a brucelosis del Dpto. Gral. Güemes
- Figura 13.** Resultados de prevalencias interprediales del Dpto. Gral. Güemes
- Figura 14.** Resultados de prevalencias intraprediales del Dpto. Gral. Güemes
- Figura 15.** Potencial factor de riesgo
- Figura 16.** Potencial factor de riesgo
- Figura 17.** Potencial factor de riesgo

## ABREVIATURAS

- AUC:** Área debajo de la curva
- BPA:** Antígeno bufferado en placa
- CJ:** Conjuntival
- ELISAb:** Enzimoimmunoensayo de bloqueo
- ELISAi:** Enzimoimmunoensayo indirecto
- FC:** Fijación de Complemento
- FPA:** Fluorescencia Polarizada
- mP:** Unidades de milipolarización
- OR:** Odds ratio
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- PI:** porcentaje de inhibición
- PP:** porcentaje de positividad
- ROC:** Receiver Operating Characteristic
- SC:** Subcutáneo
- TE:** Testigo

## RESUMEN

La brucelosis caprina es una enfermedad infecciosa crónica producida por la bacteria *B. melitensis*. Los huéspedes naturales son los pequeños rumiantes y constituye una importante zoonosis. La producción caprina en la región del NEA es llevada a cabo por pequeños productores en condiciones de subsistencia, sumado a condiciones geográficas agrestes que sólo permiten este tipo de producción. La presencia de caprinos enfermos no sólo genera pérdidas a la producción sino que implica una fuente de contagio para las familias rurales. El objetivo del presente trabajo fue generar información epidemiológica y de diagnóstico sobre la brucelosis caprina (*B. melitensis*) en la región del NEA y evaluar el comportamiento de la vacuna REV-1. Se analizó el desempeño de las técnicas serológicas de Aglutinación rápida en placa (BPA) ELISA indirecto (ELISAI) y Fluorescencia polarizada (FPA) utilizando la Fijación del complemento como técnica *Gold Standard*. Se trabajó con sueros de caprinos no vacunados, provenientes de establecimientos ganaderos de la región chaqueña del Impenetrable, y cuyos resultados de Sensibilidad (*Se*), Especificidad (*Es*) y valor  $\kappa$  fueron los siguientes: BPA (*Se* 100%, *Es* 77,04%,  $\kappa$  0,688); ELISAI (*Se* 98,5%, *Es* 93,3%,  $\kappa$  0,880) y FPA (*Se* 98,5%, *Es* 88,9%,  $\kappa$  0,829). Las técnicas de BPA y ELISAI demostraron desempeños óptimos y acorde con lo estandarizado, no así en el caso del FPA. También se evaluó experimentalmente la curva de anticuerpos generada por la vacuna *B. melitensis* REV-1 inoculada por vía conjuntival y subcutánea utilizándose las técnicas de ELISA indirecto, ELISA de bloqueo y FPA, los cuales detectaron la presencia de anticuerpos, pero sólo el ELISAI evidenció un comportamiento uniforme y acorde a lo reportado previamente. Se determinaron las prevalencias inter e intrapredios en las localidades de El Espinillo (1,56/0,21%), Miraflores (27,54/4,64%), Fuerte Esperanza (7,69/0,77%), Nueva Pompeya (54,55/10,02%) y Sauzalito (44,62/5,39%) del Dpto. General Güemes-Chaco (26,61/4,16%), y la identificación de potenciales factores de riesgo asociados a la presencia de la enfermedad a través de una encuesta epidemiológica como ser: existencia de abortos (OR=3,27), no destrucción de placentas postaborto (OR=1,66), problemas de parasitosis (OR=1,97) entre otros, Mediante un muestreo dirigido en 7 establecimientos de la localidad de Miraflores con alta prevalencia serológica de la

enfermedad, se logró a partir de 8 cultivos positivos el aislamiento y tipificación de *B. melitensis* biovar 1.

**Palabras claves:** *B. melitensis*, cabras, impenetrable chaqueño, serología, REV I

## ABSTRACT

### CAPRINE BRUCELLOSIS IN CHACO: DISEASE EPIDEMIOLOGY AND IMMUNE RESPONSE OF *B. MELITENSIS* REV-1 VACCINE

Caprine brucellosis is an infectious and zoonotic disease caused by *B. melitensis*. Natural hosts are small ruminants. Goat farming in the Argentine Northeastern region is carried out by small scale farmers, who are susceptible to infection by *B. melitensis* sick animals. The main goal of this work is to produce epidemiologic and diagnostic information on caprine brucellosis and to assess the performance of REV-1 vaccine. The complement fixation test was used as *Gold Standard* for BPA, iELISA and FPA effectiveness on unvaccinated goat serum. Sensitivity (*Se*), Specificity (*Sp*) and  $\kappa$  for each serological technique were as follows: BPA (*Se* 100%, *Sp* 77,04%,  $\kappa$  0,688); iELISA (*Se* 98,5%, *Sp* 93,3%,  $\kappa$  0,880) and FPA (*Se* 98,5%, *Sp* 88,9%,  $\kappa$  0,829). REV-1 developed immune response after conjunctival and subcutaneous inoculation, as shown by iELISA, bELISA and FPA. Disease prevalence was determined in 5 villages of General Güemes-Chaco county, showing 26.61% among farms and 4.16% through animals. Potential risk factors were identified by an epidemiological survey, evidencing OR=3.27 for abortions, OR=1.66 for non-disposed fetal membranes and OR=1.97 for parasitosis. Isolation and typification of *B. melitensis* biovar 1 was achieved through 8 positive cultures from 7 farms in the village of Miraflores-Chaco.

**Keywords.** *B. melitensis*, goats, Impenetrable Chaco, serology, REV I

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Descripción del problema

*Brucella melitensis* es el agente causal de la brucelosis caprina. Afecta principalmente a caprinos y ovinos, sexualmente maduros, quienes actúan como huéspedes naturales de la enfermedad; sin embargo al ser la bacteria más inespecífica de su género, es capaz de infectar otras especies animales incluido el hombre. Los principales signos clínicos son el aborto en el último tercio de la gestación y retención placentaria en hembras, nacimiento de cabritos débiles o natimortos y alteraciones reproductivas como orquitis, epididimitis y consecuente producción de semen de mala calidad en machos (Alton, 1990; OIE, 2016).

La presencia de caprinos infectados con *Brucella melitensis* en los hatos implica un alto riesgo de infección para las familias que se dedican a este tipo de producción por encontrarse en contacto con los animales enfermos, así como también es riesgoso para las poblaciones vecinas por consumo de leche y quesos no pasteurizados (Ministerio de Salud de la Nación, 2013).

A nivel país, más precisamente en el Noroeste Argentino (NEA), la producción de ganado caprino es básicamente llevada adelante por pequeños productores, de bajo nivel educativo y en condiciones de subsistencia, lo cual a su vez coincide con escenarios geográficos agrestes que no permiten otra actividad económica rentable que la caprina, por lo tanto este tipo de ganado se convierte en una herramienta productiva capaz de adaptarse a cualquier terreno sin mayores requerimientos (Ministerio de Agricultura de la Nación, 2011).

En los últimos años se han realizado numerosos muestreos y relevamientos serológicos en caprinos en distintas regiones de la Argentina, con el fin de caracterizar la distribución y prevalencia de la enfermedad y promover el control de la misma. Las provincias de Mendoza, San Juan, Salta, Catamarca y Formosa están catalogadas como de alta prevalencia de brucelosis caprina, mientras que las

provincias patagónicas, han sido declaradas libres de *Brucella melitensis* a partir de 2017 (Robles *et al.*, 2014; SENASA, 2017).

En el año 2016, Russo *et al.*, realizaron un relevamiento sanitario que abarcó toda la provincia de Formosa y determinaron prevalencias de altas en el oeste, medias en el centro y bajas en la región este de la provincia, sin embargo en el NEA no se dispone de suficientes datos como para establecer políticas de control sanitario para los hatos de la región (Robles *et al.*, 2014).

En el Chaco es escasa la información disponible sobre esta enfermedad.

En 1981 Bakos y Duarte de Storni publicaron a través del Laboratorio Central de Salud Pública del Chaco sobre casos de brucelosis en caprinos con un 28,8% de reactores a Huddleson  $>1/100$  en 125 cabras provenientes del departamento General Güemes.

Miranda *et al.* (1999) procesaron muestras de caprinos de ocho hatos hallando dos muestras positivas (0, 5% con BPA, SAT y 2ME), pertenecientes a uno de los hatos muestreados.

El laboratorio de Sanidad Animal del INTA EEA Colonia Benítez analizó 271 sueros caprinos entre 1997 y 2012 provenientes de 7 departamentos (Almirante Brown, Primero de Mayo, Veinticinco de Mayo, Bermejo, General Donovan, Maipú y Quitilipi) resultando todas negativas a BPA (Stahringer, Rodolfo, comunicación personal, 2013).

El SENASA mediante la Resolución N°372-E/2017, instituye el control obligatorio de la brucelosis caprina en todo el país. Dicha resolución establece un marco legal para el control de la enfermedad, habilitando el uso de varias técnicas diagnósticas y de la vacuna *B. melitensis* REV-1. A su vez, establece la necesidad de generar datos epidemiológicos acerca de la enfermedad en las regiones donde los datos son insuficientes.

En cuanto a las técnicas serológicas disponibles, si bien han sido validadas para su uso en caprinos, la OIE recomienda estandarizar el uso de este tipo de diagnósticos en cada región donde serán utilizados de manera rutinaria.



## **1.2. Importancia del estudio**

Este trabajo de investigación permitió analizar los desempeños de las técnicas serológicas aprobadas por SENASA sobre sueros de caprinos no vacunados provenientes de la región del Impenetrable Chaqueño, así como también sobre sueros de animales vacunados experimentalmente por distintas vías de inoculación con *B. melitensis* REV-1. También fue posible establecer la prevalencia de brucelosis caprina y cepas actuantes en cinco localidades del Departamento General Güemes de la provincia del Chaco sumado a la identificación de factores de riesgo que predisponen a la existencia de la enfermedad en la región.

## **1.3 Hipótesis y objetivos**

### **1.3.1. Hipótesis de trabajo**

La brucelosis caprina está presente en hatos del NEA Argentino y de acuerdo al sistema de producción familiar predominante se espera elevada difusión y prevalencia de la enfermedad.

### **1.3.2. Objetivos**

#### **1.3.2.1. General**

Generar información epidemiológica y de diagnóstico sobre la brucelosis caprina (*Brucella melitensis*) en la región NEA y evaluar el comportamiento de la vacuna REV-1.

#### **1.3.2.2. Particulares**

**1.2.2.2.1.** Evaluar técnicas serológicas para medir y discriminar anticuerpos en sangre en animales infectados naturalmente.

**1.2.2.2.2.** Estudiar la respuesta inmune humoral de la vacuna *Brucella melitensis* REV-1 en cabras utilizando diferentes vías de administración.

**1.2.2.2.3.** Determinar la prevalencia de brucelosis caprina y los factores de riesgo asociados a la presencia de la enfermedad en el Departamento General Güemes de la provincia del Chaco.

**1.2.2.2.4.** Determinar las cepas de *Brucella melitensis* actuantes en hatos infectados del NEA.

## **1.4. Estado del conocimiento**

### **1.4.1. La brucelosis como zoonosis**

La brucelosis es una de las enfermedades zoonóticas de mayor prevalencia en el mundo (Alton, 1990; Boschiroli, 2001). Si bien son tres las especies de *Brucella* que afectan predominantemente al ser humano -*B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*-, en Argentina en el periodo 1994-2006 predominaban las infecciones por *B. melitensis* seguida por *B. suis* y *abortus* (Lucero *et al.*, 2008), mientras que en México prevalecen las infecciones por *B. melitensis* (Díaz Aparicio, 2013). Aunque la brucelosis bovina (*B. abortus*) es la más expandida en el mundo, *B. melitensis* es la más patógena para el hombre (Corbel, 1997; Seleem *et al.*, 2010).

La incidencia de brucelosis provocada por *B. melitensis* es muy alta en algunas partes de Latinoamérica, Oriente Medio, región Mediterránea, Asia Central y África subsahariana (FAO, 2010; Garin-Bastuji *et al.*, 2006). Estas regiones contienen alrededor del 70% del ganado caprino existente a nivel mundial, susceptible al agente, según la FAO (2006). Maudlin y Weber, catalogaron a la enfermedad dentro del grupo de las siete “Zoonosis más descuidadas” siendo una amenaza para la salud humana y causa continua de perpetuación de pobreza (2006).

En el humano, *B. melitensis* causa una enfermedad febril aguda (fiebre ondulante) que puede progresar hasta una forma crónica y producir graves complicaciones que afectan al músculo esquelético, sistema cardiovascular y sistema nervioso central (Dalrymple-Champneys, 1950a). A menudo la infección se debe a una exposición ocupacional (Solera, 2010) y se adquiere, fundamentalmente, por vía oral, respiratoria o conjuntival, aunque, para el público en general, la ingestión de productos lácteos constituye el principal riesgo (OIE, 2016; 2018).

### 1.4.2. Agente causal

Las bacterias que integran el género *Brucella*, pertenecen al phylum de las Proteobacterias, clase  $\alpha$ -proteobacterias (Baldi *et al.*, 2007). A su vez, dentro del género existen diez especies: *B. abortus* (afecta mayormente bovinos), *B. melitensis* (ovinos y caprinos), *B. suis* (cerdos), *B. neotomae* (ratas del desierto), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (caninos), *B. ceti* (cetáceos) y *B. pinnipedialis* (pinnípedos), *B. microti* (aislada de *Microtus arvalis* o topillo campesino), y la recientemente descubierta *B. inopinata*, (aislada de un implante mamario que produjo infección en una mujer de mediana edad) (Verger *et al.*, 1987; Foster *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008b; Scholz *et al.*, 2010; Blasco y Molina-Flores, 2011). Dentro de las especies mencionadas, se pueden diferenciar biovariedades, en el caso de *B. melitensis* se distinguen los biovares 1, 2 y 3. Estos microorganismos son cocobacilos gramnegativos que miden  $0,5-0,7\mu\text{m} \times 0,6-1,5\mu\text{m}$ , aerobios estrictos, inmóviles, sin cápsula y no esporulados. Generalmente se los encuentra aislados, pero a veces pueden aparecer en pares o pequeños grupos, aunque en condiciones disgenéticas -frente a antibióticos o agentes químicos- pueden ubicarse en forma de L, como esferoplastos de  $1-15\mu\text{m}$  hasta cuerpos de  $50\mu\text{m}$  (Baldi *et al.*, 2007).

Su envoltura celular está compuesta por una membrana interna, una membrana externa y un espacio periplasmático intermedio que contiene enzimas, proteínas y el peptidoglucano responsable de la ósmosis y forma de la bacteria. En la membrana externa se encuentra el principal antígeno, el lipopolisacárido (LPS), como así también fosfolípidos y proteínas. Las cepas de *Brucella* se clasifican, en “lisas” (“smooth”, S) o “rugosas” (“rough”, R), según el aspecto que posean las colonias obtenidas luego del cultivo. El LPS está conformado por el lípido A, un oligosacárido intermedio o núcleo y un polisacárido O (PSO) este último, sólo presente en las *brucellas* lisas. El PSO es la porción más distal y expuesta del LPS-S y contiene a los antígenos A y M, los cuales según el tipo de unión que posean a lo largo del PSO, determinan el biovar de *Brucella*, el cual depende en su mayoría de la configuración de los epítopes A o M. Otros componentes existentes en la membrana celular son, las

proteínas de membrana externa (OMP), componentes periplasmáticos y los antígenos citosolubles (Baldi *et al.*, 2007; Corbel, 1997).

El genoma de *Brucella melitensis* 16M fue secuenciado y contiene un total de 3.294.931 pb, distribuidas a lo largo de dos cromosomas circulares, donde el cromosoma I está compuesto por 2.117.144 pb, y el cromosoma II por 1.177.787 pb. Posteriormente la secuenciación permitió conocer la existencia de genes que garantizan la supervivencia de la bacteria, tales como aquellos relacionados con el metabolismo, secreción, adhesión, transporte y componentes de la membrana celular, así como también se detectó la capacidad de *B. melitensis* de adaptarse a condiciones aeróbicas como anaeróbicas, entre otras particularidades (Del Vecchio *et al.*, 2002).

### **1.4.3. Patogenia**

Cuando la *Brucella* ingresa al organismo, entra en contacto con el sistema inmune de la submucosa, generándose una reacción inflamatoria aguda, donde la bacteria puede ser rechazada o, mediante el drenaje linfático, alcanzar los ganglios linfáticos locales a los 4 a 10 días post infección. Generalmente la vía de entrada más común es la digestiva, por lo tanto los ganglios de cuello y cabeza son los primeros en infectarse. Las *Brucellas* que no son destruidas en los ganglios, establecen la infección persistente con posibilidad de dispersarse a todo el organismo a través de la sangre. Cuando entran en la etapa de bacteriemia, colonizan los leucocitos y usan a los macrófagos y a los neutrófilos para evitar acciones bactericidas por parte del sistema inmune (Alton, 1990).

En los casos en que *B. melitensis* infecta una cabra preñada, una de las posibilidades es que se dirija a la placenta, se multiplique activamente en el retículo endoplásmico de los trofoblastos corioalantoideos, produciendo placentitis y necrosis con el consecuente aborto de la cabra (Blood y Radostits, 1992; Crespo León, 1994).

Una vez ocurrido el aborto, la infección uterina continúa por unos cinco meses más, y en el caso de las glándulas mamarias, éstas pueden permanecer infectadas durante años. El aborto es el signo más evidente de la enfermedad, que en algunos casos hasta puede registrarse en forma de “tormenta de abortos” cuando la enfermedad

ingresa por primera vez en un predio. En brotes naturales se pueden observar otros signos como fiebre, depresión, pérdida de peso, diarrea, mastitis, claudicaciones, higromas y, en machos se puede observar orquitis y epididimitis (Blood y Radostits, 1992; OIE, 2016).

#### **1.4.4. Epidemiología de la enfermedad en caprinos y factores de riesgo asociados**

La epidemiología de la enfermedad es variable a nivel mundial. En el caso de los pequeños rumiantes, se puede mencionar como principal fuente de contagio de *B. melitensis*, la ingestión de forrajes y agua contaminados por fetos abortados, envolturas fetales y secreciones vaginales. Estos productos pueden contener entre  $10^{10}$  a  $10^{13}$  bacterias/gramo (Crespo León, 1994). La infección de cabritos puede ocurrir dentro del útero así como también durante el amamantamiento (Acha y Szyfres, 1986).

##### **1.4.4.1. Prevalencia de *B. melitensis* a nivel mundial**

En países desarrollados, la prevalencia de brucelosis es baja o ha sido erradicada debido a programas de control y vacunación de animales susceptibles (Coelho *et al.*, 2015).

De acuerdo a los registros de OIE (2016), no se han detectado casos de brucelosis en países como Australia, Estados Unidos. Sin embargo, en Asia, Oriente Medio, África y en algunos países de Sudamérica como México, Perú y Argentina, la enfermedad es endémica (Coelho *et al.*, 2015; Rossetti *et al.*, 2017).

##### **1.4.4.2. Prevalencia de *B. melitensis* en Argentina**

De acuerdo a datos de SIGSA, en el mes de marzo de 2020 el total de existencias caprinas alcanzó los 4.695.830 cabezas, y más precisamente en el Chaco se concentran 586.565 animales y en Formosa 246.679, abarcando las categorías de chivos, cabras, cabritos, capones y cabrillas/chivitos. En la provincia del Chaco, los departamentos que más animales congregan son: General Güemes (221.366) y Almirante Brown (75.504).

En Argentina, la distribución de la brucelosis caprina es heterogénea. Robles *et al.* (2014) establecieron en el país regiones de 1) Alta prevalencia (>2,5% intrapredial): Centro-Norte (este de Salta, y oeste de Formosa), NOA Sur (La Rioja, y Catamarca), Cuyo: Mendoza y sur San Juan. 2) Baja y Media Prevalencia (<2,5%): Córdoba, Tucumán, Santiago del Estero y San Luis, oeste de Chaco. 3) Regiones sin evidencia de presencia de reactores serológicos: Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz, Tierra del Fuego, Quebrada de Humahuaca, Valles Áridos de Salta, algunas zonas de Catamarca, Tucumán, Buenos Aires, La Pampa, Entre Ríos y Corrientes. En el año 2017 el SENASA declaró la región patagónica libre de *B. melitensis* en ovinos y caprinos (Resol. N°857-E).

En la región del NEA, y más precisamente en la provincia de Formosa, Russo *et al.* (2016) determinaron la prevalencia de la enfermedad global (2%) y la intrapredial entre el 1 a 40%. Detectaron hatos positivos en las regiones este (3,6%), centro (12%) y oeste (36%) de la provincia, y en base a estos resultados pudieron establecer que la brucelosis caprina es endémica en las regiones centro y oeste de la provincia. Asimismo Martínez *et al.* (2018), durante 3 años, estudiaron en 40 establecimientos pecuarios (también de la provincia de Formosa), la prevalencia y factores de riesgo asociados a brucelosis en bovinos, bubalinos, caprinos y ovinos. Los hallazgos fueron: prevalencia de hatos caprinos positivos del 40,9%, y prevalencia individual de 7,9%.

#### **1.4.4.3. Factores de riesgo**

La identificación de los factores de riesgo que perpetúan la infección tanto en los animales como en el ambiente, constituye una herramienta importante en los programas de control de la enfermedad (Coelho *et al.*, 2015).

Para que *B. melitensis* invada un organismo y desarrolle la enfermedad, deben existir factores predisponentes o de riesgo. Estos pueden ser inherentes al huésped, al agente infeccioso o estar relacionados a medidas de manejo y/o condiciones ambientales (Coelho *et al.*, 2015).

Dentro de los factores relacionados al individuo, los animales adultos son más propensos a infectarse que los jóvenes, dado que la susceptibilidad aumenta luego de alcanzar la madurez sexual. Por otra parte también se plantea que los animales adultos al estar en contacto más tiempo con otros animales enfermos o con el ambiente contaminado, son más susceptibles de enfermar (Megersa *et al.*, 2011). En el caso de las hembras, estas son más sensibles que los machos, y en caso de preñez aumenta el riesgo, sobre todo si está en estado avanzado debido al tropismo de *Brucella* hacia los tejidos fetales donde se produce eritritiol (Coelho *et al.*, 2015). Los animales enfermos, estresados y malnutridos, son más sensibles a enfermar (Robles, 2009).

Respecto a factores dependientes del agente infectante se puede nombrar: dosis mínima infectante, patogenicidad y virulencia (Robles, 2009).

En cuanto a condiciones de manejo, en hatos con alta densidad de animales y movimiento o intercambio fluido de animales (entre establecimientos), se incrementan las probabilidades de contagio (Robles, 2009), las bajas frecuencias de prácticas de desinfección, ausencia de controles reproductivos y sanitarios, pastoreo en áreas comunes (Reviriego *et al.*, 2000) elevan las posibilidades de contagio. En los hatos pequeños la baja prevalencia de la enfermedad podría estar relacionada con un manejo controlado de los animales y correcta implementación de medidas de control y desinfección de los corrales (Coelho *et al.*, 2015).

El caso de la no eliminación de productos de partos y abortos, así como también la de animales enfermos, son considerados factores de riesgo (Moreno *et al.*, 2002) debido a que actúan como fuente de contaminación por excelencia, para otros animales y para el ambiente circundante.

La falta de conocimientos por parte de los productores respecto a la presencia de *B. melitensis*, constituye un factor de riesgo importante para el control de la enfermedad.

En el humano, el manejo inadecuado de animales enfermos o asistencia en los partos de cabras infectadas sin las medidas de bioseguridad correspondientes, junto al consumo de leche proveniente de cabras enfermas, constituye un factor de riesgo para las familias productoras (Coelho *et al.*, 2015).

### 1.4.5. Diagnóstico de brucelosis caprina

El diagnóstico clínico de la enfermedad en las hembras caprinas se basa en la detección de abortos y hallazgo de lesiones necróticas a nivel de los cotiledones placentarios, presencia de natimortos y en el caso de machos, orquitis (Alton, 1990).

Los métodos diagnósticos de laboratorio pueden tener distintos fines: para realizar un screening, para confirmar un diagnóstico presuntivo; determinar presencia o prevalencia en hatos o regiones; certificaciones; y en los países donde se ha erradicado la enfermedad, son utilizados para vigilancia epidemiológica y evitar reintroducción de la enfermedad a través de animales y/o productos (Godfroid *et al.*, 2010).

Entre los diagnósticos de laboratorio se pueden mencionar los que apuntan a aislar el agente etiológico o detectar su DNA como los cultivos bacteriológicos o Técnicas Moleculares y los que apuntan a detectar una respuesta inmune al agente etiológico como las técnicas serológicas y pruebas alérgicas (Garin-Bastuji *et al.*, 2006).

#### 1.4.5.1. Diagnósticos directos

**1.4.5.1.1. Cultivo:** es la técnica “*Gold Standard*” (OIE, 2016; Alton *et al.*, 1988). De acuerdo a lo establecido por la OIE (2016), para dictaminar inequívocamente un resultado positivo de infección por *Brucella*, debe existir una combinación de pruebas relacionadas a características de crecimiento en cultivo bacteriológico, comportamiento serológico en el animal y métodos moleculares confirmatorios.

En cabras y ovejas, luego de producido el aborto y durante varias semanas, la excreción de *B. melitensis* en descargas vaginales y glándula mamaria es elevada, por lo tanto se recomienda la toma de muestras de hisopados vaginales y leche para luego realizar los cultivos bacteriológicos (Alton, 1990; Marín *et al.*, 1996).



Según Marín *et al.* (1996), el bazo y los linfonódulos prefemoral, ilíaco y supramamarios, son los lugares de elección para obtención de muestras post mortem.

Los medios de cultivo disponibles para lograr el crecimiento y desarrollo de *Brucella* son varios, entre ellos se pueden nombrar: el medio selectivo de Farrell, desarrollado originalmente para *B. abortus* (Farrell, 1974); el medio de cultivo Thayer-Martin modificado para *Brucella ovis* (Thayer y Martin, 1966). Ambos contienen mezclas de antibióticos con el objeto de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram negativas. También se cuenta con el medio selectivo de cultivo CITA (De Miguel *et al.*, 2011). De los tres medios de cultivos mencionados, este último ha demostrado mayor sensibilidad respecto a los dos primeros para el aislamiento de todas las especies de *Brucella* lisas y posee además la capacidad de inhibir gran cantidad de contaminantes provenientes de las muestras. También se pueden utilizar medios de cultivos comerciales (agar *Brucella* comercial) o recurrir a la preparación de agar sangre (Alton, 1990; OIE 2016; Marín *et al.*, 1996).

*B. melitensis* puede ser aislada en condiciones de aerobiosis y a 37°C, sin requerimientos de CO<sub>2</sub> o suero para su crecimiento (Alton *et al.*, 1988; Garin-Bastuji y Blasco, 2004; Garin-Bastuji *et al.*, 2006). Aunque el cultivo bacteriológico es un método específico, su sensibilidad depende de otros factores como ser: la viabilidad y cantidad de bacteria en la muestra, tipo de muestra, cantidad de muestras recolectadas por animal y contaminación de la muestra (Marín *et al.*, 1996; Hornitzky y Searson, 1986).

Posterior a la obtención de cultivos, se debe realizar la tipificación tradicional de las cepas con cepas patrones en laboratorios de referencia. La misma se fundamenta en una serie de pruebas bioquímicas cuyos resultados dependerán de la cepa y biovar aislado. Entre las características de crecimiento de *B. melitensis* se puede nombrar la ausencia de producción de H<sub>2</sub>S, crecimiento positivo en medios de cultivos básicos con agregados de tionina, fucsina, safranina O, pironina y verde de malaquita; en medios de cultivos con antibióticos la adición de penicilina

produce una reacción positiva, y en el caso de uso de estreptomicina, la reacción es negativa. Por otra parte, también se lleva a cabo la prueba de la ureasa o prueba de Bauer, en la cual, *B. melitensis* reacciona de forma positiva. Asimismo para la evaluación de la aglutinación, a partir de la adición de los sueros monoespecífico anti-*B. abortus*, suero anti *Brucella* R, y suero monoespecífico anti-*B. melitensis*, en caso de tratarse de *B. melitensis* sólo se evidencia reacción cuando se confronta con suero monoespecífico anti-*B. melitensis*. Para el análisis de la fagotipificación, se adicionan a los medios de cultivos los fagos Tbilisi (TB), Weybridge (Wb) y RC (propagado en R-*Brucella*); en el caso de tratarse de *B. melitensis*, la misma produce una reacción positiva débil frente al fago WB, sin embargo su reacción es negativa para los fagos Tb y RC (Alton, 1990; OIE, 2018, 2016).

#### **1.4.5.1.2. Técnicas Moleculares**

Son técnicas que se basan en la detección del ADN bacteriano, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Éstas pueden tener distintos diseños dependiendo del objetivo: identificación (detectan secuencias específicas de *Brucella* según especie o variedad) o tipificación molecular. Si bien la técnica “*Gold Standard*” es el aislamiento de la *Brucella*, dada sus complicaciones (viabilidad de la bacteria, cantidad de bacteria/muestra, instalaciones de laboratorio específicas y personal capacitado, entre otras (Marín *et al.*, 1996, Yu y Nielsen, 2010), una interesante alternativa para el diagnóstico, es la PCR. A partir de una pequeña cantidad de muestras biológicas, las distintas variedades de PCR se convierten en importantes herramientas en programas de control y estudios epidemiológicos, por otorgar resultados en poco tiempo (Yu y Nielsen, 2010).

Para la extracción de ADN, lo cual constituye el primer paso para la realización de cualquier protocolo de PCR, existen variedad de kits comerciales. Las muestras que deben ser procesadas previamente para obtener el ADN son: muestras de leche, sangre entera, tejidos de fetos abortados o natimortos, suero, semen, líquidos corporales y quesos. En el caso de cultivos bacteriológicos, los mismos pueden ser utilizados directamente (Yu y Nielsen, 2010).

Con respecto a los pares de primers a utilizar, eso dependerá de la especie de *Brucella* que se quiera identificar (Yu y Nielsen, 2010).

Existen variedad de pruebas de PCR como ser PCR múltiples tales como: AMOS PCR (Bricker y Halling, 1994) capaz de identificar *B. abortus*, *suis*, *ovis* y *melitensis*; otra PCR múltiple, es aquella que utiliza el análisis multi-locus de número variable de repeticiones en tándem (MLVA) para identificación y tipificación de *B. melitensis* (Rees *et al.*, 2009); “Bruce-ladder”, es una PCR múltiple que permite la identificación en un solo test de especies marinas y terrestres pertenecientes al género *Brucella*, así como también identifica cepas vacunales (Yu y Nielsen, 2010).

Otra opción diagnóstica es la PCR en tiempo real o Real-Time PCR, que presenta como ventajas su rápida ejecución, no requiere de análisis electroforético y disminuye la presencia de contaminantes que perjudiquen la prueba (Redkar *et al.*, 2001; Kattar *et al.*, 2007).

También entre las técnicas moleculares se puede nombrar la tipificación génica de *Brucella*, como ser el método HOOF-Print que identifica alelos luego de que la muestra ha sido previamente analizada para establecer especie y biovar (Yu y Nielsen, 2010).

En Argentina, el desarrollo de la técnica de PCR dúplex por Álvarez *et al.* (2017) posibilita la diferenciación entre *B. melitensis* y cepa vacunal REV-1, mediante la utilización de sólo dos pares de primers, así como también permite la diferenciación entre *B. melitensis* y *B. ovis*, esto último representa una herramienta valiosa y útil en regiones donde cohabitan pequeños rumiantes. Por otra parte, la técnica habilita la posibilidad de realización de un diagnóstico rápido a partir de cultivos bacteriológicos o a partir de muestras biológicas, como ser contenido de abomaso y pulmones de fetos abortados.

**1.4.5.2. Diagnósticos indirectos:** Se pueden describir técnicas para medir inmunidad celular y humoral.

#### **1.4.5.2.1. Inmunidad celular**

Para probar existencia de inmunidad celular, se utilizan pruebas alérgicas, que producen una respuesta de hipersensibilidad. Se utiliza como antígeno un extracto proteico de una cepa rugosa de *Brucella* spp (Brucellina), luego de la inoculación intradérmica en el párpado inferior, se mide el aumento de espesor de la piel y cualquier reacción visible o palpable que provoque el engrosamiento del párpado es considerado positivo (OIE, 2004). Esta prueba se utiliza para diferenciar entre infectados y falsos positivos serológicos, pero no permite diferenciar animales infectados de vacunados. En el caso de pequeños rumiantes, la Prueba de la Brucellina tiene alta sensibilidad frente a infecciones por *B. melitensis*, y ante ausencia de vacunación, se considera como un prueba diagnóstica específica (OIE, 2016).

#### **1.4.5.4.4. Inmunidad humoral**

Algunos programas de control de la brucelosis, tienen su fundamento en diagnósticos serológicos de la enfermedad y el descarte de los animales positivos, y por lo tanto la precisión de los mismos es indispensable para tener éxito durante la ejecución de los mismos (Nielsen *et al.*, 2005a). Consecuentemente, resultados falsos positivos castigarían animales sanos, caso contrario, presencia de animales falsos negativos, perdurarían en los hatos preservando la infección dentro del establecimiento, ambos contextos tienen efectos indeseables en las campañas de control (Nielsen *et al.*, 2005a).

Las pruebas serológicas tienen su fundamento en la detección de anticuerpos frente a determinados epítopes de *Brucella*. Es particularmente relevante el problema de especificidad de las pruebas serológicas, ya que, debido a programas de vacunación reglamentaria, los animales testeados pueden presentar anticuerpos

anti-vacuna, o en otras ocasiones, haber tenido contacto con *Yersinia enterocolitica* O:9, por lo cual se generarán reacciones cruzadas, alterando el verdadero resultado (OIE, 2016; Garin-Bastuji *et al.*, 2006).

Las pruebas serológicas son variadas y se clasifican según el tipo de reacción que ocurre cuando se confronta un suero problema y el antígeno específico. Y de acuerdo a sus características de *Sensibilidad* o *Especificidad*, actúan como pruebas de screening o tamizaje y pruebas complementarias o confirmatorias (OIE, 2016, 2018).

Entre los diagnósticos donde la reacción Ag-Ac se evidencia mediante aglutinación, se pueden mencionar: el Antígeno Bufferado en Placa (BPA), Rosa de Bengala o Card test, Aglutinación lenta en tubo (SAT), Aglutinación lenta en tubo con 2-mercaptoetanol (2ME), Prueba de Rivanol y Prueba del Anillo de leche (OIE, 2016, 2018).

Los diagnósticos donde ocurre precipitación como parte de la reacción Ag-Ac, se pueden mencionar: la Inmunodifusión en Gel de Agar (AGID) y la Inmunodifusión radial (IDR).

Dentro de los tests que involucran ensayos de unión primaria, existen: el Radioinmunoensayo (RIA), Enzimoinmunoensayos (ELISA) indirecto o de competición y la Fluorescencia polarizada (FPA) (Nielsen, 2002; Yu y Nielsen, 2010; Garin-Bastuji *et al.*, 2006).

De acuerdo a OIE (2018), las pruebas prescritas para diagnóstico de brucelosis en caprinos son el BPA y FC. En Argentina, los diagnósticos aprobados por SENASA para pequeños rumiantes son: la Aglutinación rápida en placa con Antígeno Bufferado (BPA) y Rosa de Bengala (RBT), Aglutinación lenta en tubo (SAT), Aglutinación lenta en tubo con 2-mercaptoetanol (2ME), Enzimoinmunoensayos indirecto y de competición, Fluorescencia polarizada (FPA) y Fijación de Complemento (FC), siendo esta última la técnica de referencia internacional (Nicola *et al.*, 2019).

Como se mencionó anteriormente, las técnicas de aglutinación como el Rosa de Bengala o Card Test (Nicoletti, 1989) y BPA (Angus y Barton, 1984), son

pruebas apropiadas para screening o tamizaje de forma individual, ya que presentan alta sensibilidad pero sus resultados son cualitativos (positivo/negativo). En caso de resultados positivos, estos deben re-testearse con pruebas confirmatorias o complementarias (Nielsen, 2002; Yu y Nielsen, 2010).

Respecto a las técnicas de nueva generación, se pueden nombrar a los Enzimoimmunoensayos (ELISA), los cuales a su vez pueden ser categorizados en Indirectos (ELISAI) y de Bloqueo (ELISAb) (Godfroid *et al.*, 2010). En el caso de la técnica de ELISAI la misma fue desarrollada por Carlsson *et al.* (1976) para llevar adelante el diagnóstico de brucelosis en humanos. El formato más frecuente es aquel basado en la utilización del lipopolisacárido liso-SLPS como antígeno, adherido a la placa de poliestireno y conjugados anti-inmunoglobulina bovina. Los resultados son expresados como porcentaje de positividad (PP) del suero problema, respecto al control positivo fuerte (Nielsen, 2002; Saegerman *et al.*, 2004).

El ELISA de Bloqueo (ELISAb), tiene como base técnica la utilización de una placa de poliestireno que tiene fijado el LPS de *Brucella abortus* (antígeno), cuando se adiciona un suero problema en la placa, en caso de contener anticuerpos específicos éstos se unirán al antígeno de la placa, posteriormente se realizan lavados y por último se adiciona un anticuerpo monoclonal específico del LPS (epítotope C) conjugado con peroxidasa. Si las muestras resultaran positivas, la presencia de anticuerpos bloquearía la unión del anticuerpo monoclonal específico y por lo tanto la reacción sería positiva. En caso que la muestra problema no contenga anticuerpos, el anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa se unirá al antígeno de la placa. La adición de un sustrato permite la revelación del resultado a través de una reacción colorimétrica por presencia de peroxidasa. La presencia o ausencia de color es indicativo de resultados negativos o positivos respectivamente. Asimismo, los resultados obtenidos se expresan como Porcentaje de Inhibición (PI) (INgezim Brucella Compac 2.0™).

En 1996, Nielsen *et al.* desarrollaron el test de Fluorescencia Polarizada (FPA), técnica que permite diferenciar anticuerpos vacunales de los de infección (Nielsen y Gall, 2001; OIE, 2016). La fundamentación de la técnica radica en que

una molécula en solución, gira aleatoriamente a un ritmo inversamente proporcional a su tamaño, es decir moléculas pequeñas lo hacen rápidamente y moléculas grandes, lentamente. El tiempo de rotación puede ser calculado utilizando mediciones verticales y horizontales de incidencia de la luz polarizada (Nielsen *et al.*, 1996). Utiliza como antígeno una pequeña fracción molecular (22kDa) del polisacárido de cadena O de *B. abortus* 1119-3 conjugado con isotiocianato de fluoresceína, el cual una vez adicionado a la muestra problema, es incubado durante dos minutos, para luego proceder a la lectura final. Los resultados son expresados en unidades de milipolarización (mP) (Nielsen *et al.*, 1996).

En cuanto al diagnóstico por Fijación del Complemento (FC) desarrollado por Hill (1963), su fundamento reside en que si existen anticuerpos en el suero problema y se unen al antígeno, ocurrirá la activación del complemento. Luego se adiciona un indicador conformado por eritrocitos ovinos sensibilizados con anticuerpos de conejo. Si el suero problema contiene anticuerpos, el complemento no podrá actuar y no habrá lisis de los eritrocitos. Alternativamente, en caso de ausencia de anticuerpos en la muestra, el complemento disponible producirá la lisis de los anticuerpos de conejo y por lo tanto de los eritrocitos, liberando hemoglobina, lo cual puede ser apreciado mediante espectrofotómetro o visualmente (Nielsen, 2002).

#### **1.4.6. Control y erradicación de la brucelosis caprina**

No existen países europeos que hayan podido erradicar la Brucelosis caprina, sin embargo Francia y España han logrado erradicarlas en algunas regiones. Durante el año 2000 se cofinanciaron programas de erradicación de brucelosis en caprinos y ovinos, los cuales fueron implementados en Portugal, Italia, Grecia, Francia y España (en las regiones de Castilla y León se vacunaron todas las majadas y hatos con la vacuna *B. melitensis* REV-1, y los animales que resultaban positivos a la serología eran sacrificados; la prevalencia interpredial inicial fue de 33,5% y la intrapredial de 1,7%, posteriormente a la vacunación los resultados de prevalencias inter e intraprediales fueron de 20,7% y 0,9% respectivamente (Lopes *et al.*, 2010; Reviriego *et al.*, 2000).

Para el control de la enfermedad y según el escenario epidemiológico hallado, las herramientas pueden ser diagnóstico serológico y posterior sacrificio de animales positivos sumado a la implementación de la vacuna REV-1 o la vacunación masiva del hato (Blasco y Molina-Flores, 2011; OIE, 2016, 2018)

El control de la enfermedad en animales implica grandes esfuerzos, como adecuación de laboratorios y capacitación de personal para toma de muestras y realización de técnicas diagnósticas, aplicación de vacunas en animales y lo más importante, la participación y compromiso de todas las partes afectadas por esta enfermedad (Seleem *et al.*, 2010).

Para aplicar planes de control y erradicación, se deben conocer los tipos de producción animal, los hábitos y costumbres de la zona; entablar convenios o acuerdos con la administración local para llevar adelante los planes de control; formación de recursos humanos para colaborar en los planes (toma de muestras, vacunación, realización de diagnósticos serológicos); denuncia de casos positivos tanto en animales como en humanos; campañas de concientización para productores y público en general. Una vez especificados estos elementos, habrá que definir la estrategia de control, ya sea de diagnóstico y descarte de positivos o el uso de vacunas y de qué manera (vacunación selectiva a algunas categorías o masiva a toda la majada/hato) (Blasco, 1997; Blasco y Molina-Flores, 2011)

Para el control de *B. melitensis* en ovinos y caprinos se cuenta con una vacuna viva, efectiva, atenuada denominada *Brucella melitensis* REV-1 (Elberg y Faunce, 1957), la cual es la única aprobada y recomendada por OIE (2016, 2018) para prevención de la enfermedad en pequeños rumiantes. Se presenta como una suspensión liofilizada *B. melitensis* REV-1 atenuada (OIE, 2018; Blasco, 1997; Alton, 1990). Es sensible a la estreptomycin, y en cultivos bacteriológicos presenta características de crecimiento que difieren de la cepa salvaje y que simplifican su identificación, como ser tamaño de las colonias, resistencia a antibióticos, sensibilidad en tinciones entre otras (Alton, 1990).

La misma puede ser aplicada a las categorías jóvenes, de 3-5 meses de edad por vía conjuntival o subcutánea. La dosis estándar debe estar comprendida entre  $0,5 \times 10^9$  a  $2 \times 10^9$  organismos viables. Se recomienda vacunar hasta los 5 meses de edad, para evitar interferencias con la serología diagnóstica (OIE, 2016) o en forma masiva a todos los



animales del hato cuando la prevalencia es alta o si se quiere inmunizar a todo el hato de manera inmediata.

En el caso de ser aplicada a dosis completa por vía subcutánea en hembras adultas preñadas, puede provocar abortos, por lo que se recurre a la utilización de la vía conjuntival para disminuir las tasas de abortos, así como también disminuir la interferencia inmunológica en diagnósticos serológicos de rutina por la existencia de anticuerpos vacunales circulantes (Blasco, 1997).

En la actualidad, la existencia de brucelosis caprina continua representando un riesgo para la salud pública y animal (Rossetti *et al.*, 2017), por ello la importancia del diagnóstico, control e implementación de medidas de manejo sanitario en animales, que aspiran a la disminución de la enfermedad (Blasco, 1997).

Este trabajo de investigación pretende demostrar a lo largo de los siguientes capítulos el comportamiento de técnicas serológicas con sueros provenientes de animales de campo; el comportamiento de la respuesta inmune en animales vacunados por diferentes vías de inoculación; la determinación de la prevalencia de brucelosis caprina en cinco localidades del Departamento General Güemes de la provincia del Chaco junto a la identificación de factores de riesgo que predisponen a la existencia y permanencia de la enfermedad en la región; y por último, la confirmación de las cepas actuantes de *B. melitensis* en la región mencionada.

## II. METODOLOGÍA

En el presente capítulo se describen las técnicas de laboratorio implementadas durante el desarrollo de este trabajo de investigación y que fueron comunes tanto a los ensayos de vacunación como para el relevamiento a campo, seguidamente se presentan las metodologías específicas para cumplimiento de cada objetivo.

### 2.1. Técnicas para detección del agente

#### 2.1.1. Cultivo y tipificación

Para el análisis bacteriológico, se recurrió al laboratorio perteneciente a la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba (UNRC). En el laboratorio de bacteriología, se trabajó en campana de flujo laminar y se utilizaron muestras de hisopados vaginales y leche refrigeradas, así como también muestras de sangre con anticoagulante (citrato al 3,8%).

Estas muestras fueron sembradas y distribuidas en las placas con ansas, y en el caso de las muestras de sangre, con una micropipeta de 20 microlitros se tomó una alícuota para poder asegurar la extracción del buffy coat. Para la siembra se utilizó un medio de cultivo comercial deshidratado, el *Brucella Agar* (Neogen® Culture Media) con un adicional de suero fetal bovino al 17%. La incubación se realizó a 37°C en microaerofilia y con controles a las 24, 36 y 48 hs. posteriores a la siembra; en el caso de las muestras que resultaron negativas los controles continuaron hasta los 7 días posteriores. Una vez obtenidas las colonias y de acuerdo a sus características macroscópicas, se procedió a las coloraciones con las técnicas de Köster y Gram (Alton y Jones, 1976; OIE, 2016), para determinar las características microscópicas de las mismas.

Las cepas obtenidas por cultivo fueron analizadas mediante tipificación tradicional en el laboratorio de referencia del Instituto ANLIS Dr. C. G. Malbrán en la ciudad de Buenos Aires, para confirmación de género, especie y biovar.

La tipificación tradicional consistió en la ejecución de las pruebas de crecimiento en CO<sub>2</sub>, la de crecimiento en suero, de producción de anhídrido sulfuroso y de presencia de

ureasa. Para ello se incluyeron como controles las cepas de referencia: *B. abortus* biovar 1, 544; *B. melitensis* biovar 1, 16M; *B. suis* biovar 1, 1330 (Alton, 1990).

Para la prueba de CO<sub>2</sub>, las cepas se sembraron por duplicado en medios de cultivos especiales, se incubaron a 37°C en atmósfera normal y enriquecida con 5-10% de CO<sub>2</sub>, a fin de poder diferenciar de aquellas cepas CO<sub>2</sub> dependientes. La lectura se realizó a las 48 hs. (Alton, 1990; OIE, 2016).

En cuanto a la evaluación del requerimiento de suero, algunas cepas (*B. abortus* biovar 2 y *B. ovis*) deben contar con el agregado de 3-6% de suero equino o de conejo para crecer, debido a que son muy sensibles a factores inhibidores de peptonas presentes en los medios de cultivo. Por ello la utilización del suero, que interviene neutralizando componentes inhibidores así también como nutriente. Para esta instancia, las cepas se sembraron por duplicado en medios de cultivos básicos y medios de cultivos básicos con suero. Se incubaron a 37°C en atmósfera con 5-10% de CO<sub>2</sub>. La lectura se llevó a cabo a las 48hs (Alton, 1990; OIE, 2016).

Respecto a la producción de anhídrido sulfuroso, algunas cepas de *Brucella* producen S<sub>2</sub>H a partir de aminoácidos azufrados presentes en el medio de cultivo. A fin de poder detectarlo, se colocaron en las bocas de los tubos que contenían las cepas sembradas, tiras de papel de filtro embebidas en una solución saturada de acetato de plomo. Las tiras fueron reemplazadas por nuevas, una vez al día durante cuatro días (Alton, 1990; OIE, 2016).

Para la prueba de la ureasa se aplicó el método de Bauer, el cual utiliza sustrato libre de sustancias promotoras de crecimiento para el desdoblamiento de la urea y como indicador el rojo fenol. Se incubó en baño de agua a 37°C y las lecturas fueron a los 15, 30, 60 y 90 minutos (Alton, 1990; OIE, 2016).

Para diferenciar las cepas de *Brucella*, también se evaluó la habilidad de crecimiento en medios de cultivo con bacteriostáticos, medios de cultivo con alcohol polihidroxilado y con antibióticos. En los medios de cultivo básicos se agregaron: timina, fucsina básica, safranina O, pironina, verde de malaquita, penicilina y estreptomicina (Alton, 1990; OIE, 2016).

Para la fagotipificación se utilizaron los fagos Tbilisi (TB), Weybridge (Wb) y RC (propagado en *R-Brucella*) (Alton, 1990; OIE, 2016).

## **2.2. Técnicas para detección de la respuesta inmune humoral**

### **2.2.1. Antígeno Bufferado en Placa (BPA)**

Se recurrió a la técnica cualitativa de BPA para el tamizaje o screening de las muestras (Nicola *et al.*, 2019; OIE, 2018). Para esta técnica se utilizaron dos micropipetas graduadas de 10-100µl, algutinoscopio con tapa de 45cm de largo x 35cm de ancho x 15cm de profundidad, placa de vidrio marcada con cuadrados de 4x4cm, mezcladores plásticos, y el antígeno comercial de Laboratorio Biológico Biotandil®. Previo al análisis de las muestras problemas, tanto el reactivo como los sueros, se llevaron a temperatura ambiente (22±4°C), y en el caso del reactivo se garantizó la homogeneización del antígeno mediante movimientos suaves de inversión. Los resultados se expresaron como positivos o negativos. En el caso de los sueros que resultan, se debe recurrir a pruebas diagnósticas confirmatorias (SENASA, 2019, OIE, 2018, Alton, 1990). La técnica se llevó a cabo cumpliendo el Manual de Procedimientos de SENASA (Nicola *et al.*, 2019).

#### *Procedimiento*

- 1) Colocación de 80µl de suero problema en cada cuadrado de 4x4cm, con micropipeta utilizando un tip/suero.
- 2) Descarga de 30µl del antígeno BPA (Laboratorio Biológico Biotandil®) próximo a la gota del suero anteriormente depositada.
- 3) Mezclado de antígeno y suero con mezclador plástico para formar un círculo de 3cm de diámetro. Inicio del tiempo de reacción.
- 4) Impresión de 3 movimientos en forma rotativa de la placa de vidrio hasta homogeneizar las mezclas.
- 5) A los 4 minutos de iniciada la reacción, nuevamente se vuelven a imprimir 3 movimientos en forma rotativa de la placa de vidrio.

- 6) A los 8 minutos, se imprime un nuevo movimiento de la placa, y se procede a la lectura con la luz del aglutinoscopio encendida.

### **2.2.2. Fijación del Complemento (FC)**

Esta técnica fue realizada en el Laboratorio de Red de Brucelosis LR331 del INTA Rafaela. Se utilizó la microtécnica en placas de polipropileno de 96 pocillos con fondo en U. Su condición de prueba confirmatoria y de referencia internacional, posibilita la detección y cuantificación relativa de anticuerpos específicos de *Brucella* que son capaces de fijar el complemento lo cual consecuentemente indicaría la existencia de un animal enfermo (Nicola *et al.*, 2019; OIE2, 2018, Alton, 1990). El desarrollo de la técnica fue de acuerdo al Manual de Procedimientos del SENASA (Nicola *et al.*, 2019).

#### *Reactivos*

El procedimiento se desarrolló en caliente con incubación en estufa a  $37^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Los reactivos utilizados (volumen final de 100 $\mu\text{l}$ ) fueron los siguientes:

- a) Sistema hemolítico, el cual se obtuvo por medio de la mezcla de volúmenes iguales de una solución de hemolisina (1 unidad de hemolisina/ml (UH/ml)) en tampón veronal-calcio magnesio (TV) y una suspensión de glóbulos rojos de carnero en TV al 2%. (Dilución de trabajo 1:500)
- b) Complemento de cobayo (25 unidades de complemento/ml (UC/ml)) en TV. (Dilución de trabajo 1:40)
- c) Solución de Antígeno en TV (Dilución de trabajo 1:200)
- d) Se realizaron diluciones en base 2, partiendo de la dilución  $\frac{1}{2}$  de los sueros problemas y controles.

Para la inactivación de sueros caprinos, un día antes previo a la realización de la técnica, se utilizó el baño termostático a  $60^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, con el objeto de eliminar el complemento natural contenido en las muestras problema.

#### *Controles del ensayo utilizados*

Controles de antígeno: se dispensó por duplicado en la placa de controles 25µl/pocillo de la solución de antígeno, posteriormente se adicionó 25µl de TV y 25µl de complemento diluido.

Control del sistema hemolítico sin complemento: en los pocillos sin complemento se dispensó 75µl de TV por duplicado en la placa de controles.

Control del sistema hemolítico con complemento: en los pocillos con complemento, se dispensaron 50µl de TV y 25µl de complemento diluido.

#### *Sueros controles*

Se utilizaron los sueros controles de referencia del LR331 estandarizados de acuerdo a los sueros patrones de la OIE: Suero International standard anti-*B. melitensis* Serum (ISaBmS).

#### *Procedimiento*

##### *1. Dilución de sueros problema*

En cada pocillo se dispensaron 25µl de suero sumado a 25µl de TV, y se homogeneizaron (aspiración/dispensión 5 veces con micropipeta). Luego se procedió, con micropipeta multicanal, a dispensar del pocillo recién homogeneizado, al siguiente y así consecutivamente hasta terminar la fila.

##### *2. Sueros controles*

Los sueros controles tanto positivos como negativos, se dispensaron con el mismo esquema planteado para las muestras problema.

3. Dispensado en pocillos de la solución del complemento a razón de 25µl/pocillo, desde la dilución 1:4 de los sueros en adelante.

4. Dispensado en pocillos de solución de antígeno a razón de 25µl/pocillo, desde la dilución 1:4 de los sueros en adelante.

5. Primera incubación. Incubación a 37°C por 30 minutos con agitación. El sistema hemolítico se incubó a 37°C por 30 minutos en baño maría agitando cada 10 minutos.
6. Adición del sistema hemolítico 25µl/pocillo.
8. Segunda incubación a 37°C por 15 minutos con agitación, luego 15 minutos sin agitación.
9. Incubación en heladera a 4°C durante 3 horas o toda la noche.
10. Lectura e interpretación de resultados. Muestras negativas (presencia de hemólisis) y muestras positivas (ausencia de hemólisis). En el caso de reacciones positivas, se cuantificó de acuerdo a la determinación del título de la dilución y grado de hemólisis, de acuerdo con lo sugerido por SENASA (Nicola *et al.*, 2019). Los resultados se expresaron en Unidades Internacionales de Fijación del Complemento.

### **2.2.3. Enzimoimmunoensayo indirecto (ELISAI)**

Se trabajó con un test de ELISA indirecto desarrollado en el Laboratorio de Serología de INTA Bariloche (Segovia *et al.*, 2000; Robles *et al.*, 2020). Se utilizaron placas de poliestireno (NUNC 269620). Se utilizó como antígeno el lipopolisacárido liso de *Brucella abortus* a una concentración 5 µg/ml en solución buffer de carbonato (0,06 M - pH 9,6) a razón de 100µl/pocillo. Los sueros problema fueron diluidos en PBS en dilución de 1/200. Como conjugado se utilizó un producto comercial a base de proteína A/G recombinante en una dilución de 1/5000. Para llevar adelante esta técnica, se utilizaron como sueros controles: sueros negativos, sueros positivos fuertes y sueros positivos débiles provistos por el INTA Bariloche. La lectura de los resultados se realizó con un espectrofotómetro Multiskan (Labsystems) a 414 nm.

#### *Procedimiento*

- 1) Pegado del antígeno a la microplaca de ELISA
- 2) Agregado de sueros controles y sueros problemas

- 3) Incubación a 27°C durante 60 minutos bajo agitación constante
- 4) Lavado de las placas
- 5) Adición del conjugado (Proteína A/G recombinante)
- 6) Incubación a 27°C durante 60 minutos bajo agitación constante
- 7) Lavado de las placas
- 8) Agregado del Sustrato-Cromógeno
- 9) Incubación a 27°C durante 10 minutos bajo agitación constante
- 10) Lectura en equipo de absorbancia

Los resultados de cada suero control y de los sueros problema analizados fueron expresados como el porcentaje de positividad (PP) de la densidad óptica (DO) producida por cada suero problema respecto a la media de la DO producida por el suero control positivo fuerte. La validez de cada placa se determinó mediante la DO del suero control positivo fuerte, que debe caer dentro de un rango de DO de 0,850 a 1,150 y del suero control negativo, que debe producir una DO igual o menor a 0,200. El software SPEIA utilizado para la lectura y cálculos de los resultados del test de ELISAI, fue desarrollado por Walter Kelly del Animal Disease Research Institute (ADRI).

#### **2.2.4. ELISA de bloqueo (ELISAb)**

Se utilizó un kit comercial de ELISA de bloqueo desarrollado por el Laboratorio Inmunología y Genética Aplicada S.A. – INGENASA de España.

Para la realización de la técnica el software utilizado fue el Gen5 2.07 RC (Reader Control) desarrollado por BioTek Instruments Inc. conjuntamente con el equipo lector perteneciente a la misma firma, modelo ELx800. Para los lavados se trabajó con un lavador de placas automático.

#### *Procedimiento*



Antes de iniciar el ensayo, todos los componentes del kit fueron sacados de la heladera y dejados en reposo a temperatura ambiente, tal cual lo sugerido por el laboratorio fabricante. Se constituyó la solución de lavado para su carga en el equipo lavador de placas (40 ml de solución concentrada más 960 ml de agua destilada).

- 1) Dilución de sueros problema a razón 1/5. En cada pocillo se dispensó 80  $\mu$ l de diluyente y luego, 20  $\mu$ l de la muestra. En cuanto a los sueros control, se añadieron 100  $\mu$ l en cuatro pocillos (dos por cada control).
- 2) Agitación suave para una correcta homogeneización de la mezcla, tapado de la placa e incubación a temperatura ambiente por una hora.
- 3) Lavado de placa 4 veces con la solución de lavado, con una distribución de 300 $\mu$ l por pocillo.
- 4) Adición de 100 $\mu$ l de conjugado provisto por el kit. Tapado de placa e incubación por 1 hora a temperatura ambiente.
- 5) Lavado de placa 4 veces con la solución de lavado, con una distribución de 300 $\mu$ l por pocillo.
- 6) Adición de 100 $\mu$ l de sustrato en cada pocillo.
- 7) Incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, contabilizando el tiempo a partir de la adición de la solución en el primer pocillo)
- 8) Adición de solución de frenado en el mismo orden en que se añadió la solución sustrato.
- 9) Lectura de valores de absorbancia en lector de placas, a 450 nm dentro de los 5 minutos posteriores a la adición de la solución de frenado.

En lo que respecta a los resultados se tuvo en cuenta la validación de los sueros controles en base al valor de absorbancia con una densidad óptica de 450 nm, siendo para el control negativo mayor a 1, y para el control positivo, 0,35. A su vez los resultados de los sueros problema fueron calculados teniendo en cuenta el cálculo del Porcentaje de Inhibición (PI) propuesto por el kit según la siguiente fórmula:

$$PI = 100 \times [1 - (DO \text{ muestra} / DO \text{ control negativo})]$$

Por lo tanto, para la interpretación de los resultados, se consideraron positivos para anticuerpos específicos de *Brucella*, aquellas muestras con valores PI mayores o iguales a 40 PI (Ingenasa, España), y negativas las muestras por debajo de este valor.

### **2.2.5. Fluorescencia Polarizada (FPA)**

Para la realización de esta técnica se trabajó con el polarímetro Sentry 200 *Diachemix Ellie*. Se utilizó el kit provisto por el Laboratorio Biológico Biotandil®, aplicando el protocolo para diagnóstico de brucelosis en caprinos, dispuesto por el Manual de Procedimientos de SENASA (Nicola *et al.*, 2019, 2019).

El kit utilizado está destinado al diagnóstico *in vitro* de las infecciones brucélicas por cepas lisas de *Brucella*. El kit está compuesto por el antígeno en base al polisacárido de cadena O de *Brucella abortus* 1119-3 conjugado con isotiocianato de fluoresceína y un buffer específico para la prueba, junto a sueros controles positivo y negativo.

#### *Calibración*

Previo a cada análisis, se procedió a calibrar el equipo con los sueros controles, buffer y antígeno provistos por el kit. La misma consistió en colocar:

- 1° tubo: 1ml de buffer + 40µl de suero positivo (blanco)
- 2° tubo: 1ml de buffer + 40µl de suero positivo + 10µl de antígeno
- 3° tubo: 1ml de buffer + 40µl de suero negativo (blanco)
- 4° tubo: 1ml de buffer + 40µl de suero negativo + 10µl de antígeno
- 5° tubo: 1ml de buffer (blanco)
- 6° tubo: 1ml de buffer + 10µl de antígeno

#### *Procedimiento*

Para el procesamiento de los sueros provenientes del ensayo vacunal se trabajó en el Laboratorio de Sanidad Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNNE, a una

temperatura ambiente de 24°C. Se utilizaron pipetas automáticas monocanal para la dosificación de sueros, antígenos y búferes.

- 1) Se colocó 1 ml de buffer provisto por el kit en tubos de borosilicato
- 2) Se dispensó 40µl de suero problema
- 3) Agitación con vórtex
- 4) Reposo a temperatura ambiente durante 2 minutos
- 5) Lectura del valor blanco de cada tubo
- 6) Adición de 10µl de antígeno brucélico en cada tubo
- 7) Agitación con vórtex
- 8) Reposo a temperatura ambiente durante 2 minutos evitando excesiva luminosidad
- 9) Lectura de valor final para obtención de mP de la muestra problema

Para la interpretación de resultados, el punto de corte aplicado para la técnica fue 85 unidades de mP (Nicola *et al.*, 2019).

### **2.3. Metodología específica**

#### **2.3.1. Evaluación de técnicas serológicas de nueva generación para medición y diferenciación de anticuerpos en sangre en animales infectados naturalmente.**

Para el desarrollo de este objetivo, se trabajó con un total de 201 sueros de caprinos no vacunados provenientes de establecimientos de cinco localidades del Departamento General Güemes, Chaco.

Las muestras obtenidas se procesaron mediante BPA (véase 2.2.1.), ELISAI (véase 2.2.3.) y FPA (véase 2.2.5.). Para evaluar los resultados se recurrió a la prueba de FC como *Gold Standard*, por ser la de referencia internacional (SENASA, 2019; OIE, 2016) (véase 2.2.2.).

##### **2.3.1.1. Análisis estadístico**

Se construyeron tablas de contingencia 2x2, en base a los resultados serológicos obtenidos. Posteriormente se trabajó con el programa MedCalc (Schoonjans *et al.*, 2009),

con el objeto de obtener las curvas ROC (Receiver Operator Characteristic) y evaluación de los puntos de corte así como también valoraciones de sensibilidad y especificidad en cada técnica. Se utilizó como prueba “*Gold Standard*” la FC. Con el mismo programa se procedió al cálculo del estadístico Chi2 ( $\chi^2$ ).

Para el cálculo de los índices de concordancia entre pruebas se aplicó el Coeficiente de Cohen (1960) o Índice Kappa, para establecer la fuerza de asociación de acuerdo a la escala propuesta por Landis y Koch (1977). Todos los cálculos fueron realizados con el programa WinEpi2 (de Blas et al., 2006).

### **2.3.2. Evaluación de la respuesta inmune humoral de la vacuna B. melitensis REV-1 en cabras, utilizando diferentes vías de administración**

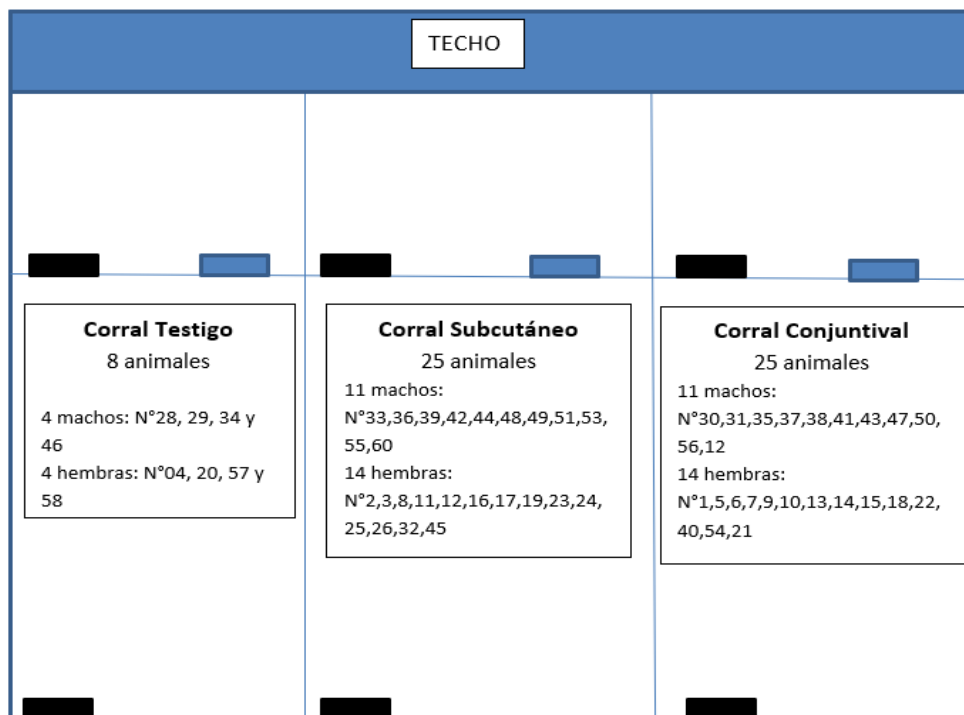
Para el desarrollo de este objetivo se describen a continuación las instalaciones construidas, los animales de experimentación, la dieta administrada y por último la ejecución de la vacunación experimental y posteriores muestreos para análisis serológicos.

#### **2.3.2.1. Instalaciones**

Los animales fueron dispuestos en tres corrales, donde se mantuvieron en completa estabulación durante 365 días.

Cada corral tenía una longitud total de 35 m por 21 m de ancho, y se dividieron en zonas de esparcimiento (longitud 20 metros) y de estadía, de 21 metros de ancho por 20 metros de largo, con un sector techado de 5m x 21m.

Cada corral, tenía su bebedero y comedero independiente. Los animales se distribuyeron de la siguiente manera, según puede observarse en la Figura 1.



**Figura 1: Corrales de experimentación para vacunación con *B. melitensis* REV-1 y distribución de los animales en Grupo Testigo (sin vacunar), Grupo Subcutáneo (vacunado vía subcutánea), y Grupo Conjuntival (vacunado vía conjuntival)**

### 2.3.2.2. Animales

Se trabajó con 58 caprinos de la raza Boer de 5 meses de edad, 32 hembras y 26 machos, con diagnóstico negativo a brucelosis, que fueron provistos por la cabaña Don Mella S.A. de la localidad de Las Lomitas, Formosa. El diagnóstico inicial de seronegatividad a brucelosis se llevó a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario LR. 205.

Quince días previos a la vacunación los animales, fueron seleccionados, pesados e identificados con caravanas de colores según el grupo al cual iban a pertenecer. En todos los grupos se dispuso una distribución uniforme por peso y sexo de los animales, para alcanzar mayor homogeneidad y representatividad en los resultados.

Los animales participantes fueron controlados sanitariamente de forma periódica previa vacunación así como también durante el transcurso del ensayo. Cada 20 días se realizaban extracciones de materia fecal para posterior análisis parasitológico y control de mucosa ocular para determinar anemia por presencia de *Haemonchus spp* por medio de la técnica FAMACHA<sup>®</sup> (Barth *et al.*, 1996).

Veinte días previos a la vacunación y según los resultados arrojados por los métodos coproparasitológicos y FAMACHA<sup>®</sup>, se realizaron desparasitaciones contra parásitos gastrointestinales (céstodos, nemátodos y coccidios) utilizando como drogas: praziquantel, combinación de albendazol y levamisol, y diclazuril respectivamente. Las aplicaciones se realizaron con jeringas dosificadoras y teniendo en cuenta el peso vivo de cada uno de los animales a fin de asegurar respuestas positivas en los tratamientos. En cuanto al control y tratamiento de ectoparásitos (piojos) se utilizó ivermectina inyectable, cada vez que se encontraban a la inspección los parásitos mencionados. Se realizó suplementación vitamínico-mineral. Cada 4 meses se procedió a efectuar vacunaciones anticlostridiales, con vacuna policlostridial (dosis de 3 ml vía SC).

Los grupos se clasificaron en 3 grupos como puede observarse en la tabla 1:

**Tabla 1. Clasificación e identificación de caprinos participantes del ensayo vacunal con *B. melitensis* REV-1 según vía de inoculación**

GRUPO	VÍA DE INOCULACIÓN	CARAVANA	ANIMALES
CJ	Conjuntival	Roja	25 (11 machos/14 hembras)
SC	Subcutáneo	Verde	25 (11 machos/14 hembras)
TE	Testigo	Amarillo	8 (4 machos/4 hembras)

### 2.3.2.3. Dieta

La dieta de los animales se basó en aporte de alimentos balanceados y alfalfa peletizada administrada según peso promedio de cada uno de los lotes a razón del 2,5% del peso vivo. Al inicio, el balanceado proporcionado estaba compuesto por: proteína bruta 18%, extracto etéreo 2%, fibra cruda 5%, minerales totales 8%, humedad 12%, tenor calcio 0,8-1,2%, tenor fósforo 0,35-0,55%, energía digestible 2900 Kcal EM/kg.

Luego de tres meses, se cambió el alimento por un balanceado específico para caprinos de recría. La composición del mismo fue la siguiente: proteína 18,67%, grasa 3,63%, fibra cruda 4,82%, cenizas 15,68%, humedad 10,92%, calcio 1,53% y fósforo 0,57%, materia seca 89,08%.

Se colocaron comederos con bloques de sal para estimular el consumo de agua y satisfacer el aporte de minerales.

La provisión de agua fue *ad-libitum* a través de bebederos dispuestos en cada uno de los corrales de experimentación.

### 2.3.2.4. Vacunación experimental con Vacuna *B. melitensis* REV I

El día de la vacunación, se consignó como el día 0 del ensayo vacunal.

Para la vacunación, debido al riesgo de infección para los operarios que manipulan la vacuna *B. melitensis* REV-1, se implementaron cuidados extras teniendo en cuenta normas de bioseguridad, ya que REV-1 es una vacuna viva atenuada. Para ello, todos los

participantes vistieron camisolín, barbijo, gafas protectoras, guantes de nitrilo y todos los materiales descartables fueron desechados como residuos patológicos.

*a) Grupo CJ- VACUNACIÓN CONJUNTIVAL*

Los animales del grupo conjuntival fueron colocados en el corral de esparcimiento, y a medida que eran vacunados eran pasados al corral de estadía para permanecer allí durante 15 días y evitar diseminación de vacuna por contacto o aerosoles en el corral de esparcimiento y mezclarse o pasarse a los corrales de al lado.

Para la vacunación conjuntival, se utilizó la vacuna OCUREV<sup>®</sup> en base a *Brucella melitensis* REV-1, provista por el SENASA. Una vez reconstituida la vacuna, se instiló una gota en el ojo derecho de cada animal con el gotero provisto con la vacuna, y se mantuvo al animal durante 3 segundos con la cabeza elevada y horizontal para asegurar que la vacuna entrara en contacto con toda la mucosa ocular.

*b) Grupo SC- VACUNACIÓN SUBCUTÁNEA*

Los animales del grupo subcutáneo, fueron vacunados por vía parenteral, en la cara interna del muslo. A partir de 1 ml de vacuna OCUREV<sup>®</sup> remanente, se reconstituyó con un frasco de diluyente de cepa C19 a dilución de 1/50 (49 ml de diluyente), para poder aplicar una dosis vacunal de 2 ml/animal. Todo el material descartable fue colocado en una bolsa roja para residuos patológicos. Las agujas utilizadas se descartaron en un recipiente específico para el día de la vacunación.

*c) Grupo TE- GRUPO TESTIGO*

Los animales del grupo testigo, no recibieron vacuna, solo fueron sangrados el mismo día de vacunación de los otros 2 grupos.

**2.3.2.5. Toma de muestras**

Se procedió a la extracción de sangre de todos los caprinos participantes del ensayo vacunal. Los muestreos se realizaron los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 365 postvacunación.



La extracción de sangre fue realizada mediante venopunción de la vena yugular con jeringa de 5 ml y aguja 25/8. Una vez colectada la muestra, ésta se distribuyó en un tubo para serología (3,5 ml de sangre) y los 1,5 ml restantes fueron colocados en un tubo eppendorf con citrato al 3,8% (2 gotas de citrato para 1,5 ml de sangre) para su almacenamiento como muestra de sangre anticoagulada. Todos los tubos estaban rotulados, indicando el día de muestreo y caravana del animal.

Una vez arribadas las muestras al Laboratorio de Sanidad Animal en la Facultad de Ciencias Veterinarias UNNE, fueron centrifugadas para obtener el suero, y posteriormente se realizaron los análisis serológicos mediante las técnicas de ELISAI (véase 2.2.3.), ELISAB (véase 2.2.4.) y FPA (véase 2.2.5.), según protocolos de SENASA (Nicola *et al.*, 2019) e instrucciones de los fabricantes.

#### **2.3.2.6. Análisis estadísticos**

A los fines de visualizar el comportamiento general de las variables estudiadas, se realizó un análisis exploratorio de los datos y se realizaron gráficos y se calcularon estadísticos y estimadores de posición y dispersión.

Los estadísticos de posición utilizados fueron: valores mínimo y máximo y media aritmética (ME). Para evaluar los estimadores de variación se utilizó el desvío estándar (DE).

A efectos de establecer si existían diferencias significativas en el contenido de anticuerpos entre los animales de los tres grupos participantes, se realizaron Análisis de la Variancia y posterior prueba de F con un nivel de significancia  $\alpha=0,05$ . Estas herramientas se aplicaron para probar la existencia de efecto grupo. Con posterioridad, se realizó la prueba de Duncan a fin de la separación de las medias de grupos, con un nivel de significancia  $\alpha=0,05$ .

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el Software InfoStat 2020 (Di Renzo *et al.*, 2020).

### **2.3.3. Determinación de la prevalencia de brucelosis caprina y los factores de riesgo asociados a la presencia de la enfermedad en la provincia del Chaco.**

Se trabajó en el departamento General Güemes de la provincia del Chaco, y que al momento de iniciar el estudio la información aportada por la provincia daba cuenta de una población de 114.234 animales. Las actividades de muestreo se desarrollaron en las localidades de Miraflores, El Espinillo, Fuerte Esperanza, Nueva Pompeya y Sauzalito, abarcando distintos parajes.

Esta región chaqueña se caracteriza por poseer un clima subtropical subhúmedo a semiárido en su extremo oriental, las temperaturas son entre los 18°C y los 28°C con medias anuales de 26°C. El registro de precipitaciones es de 600 a 900mm concentradas en la época estival. Los suelos de esta región agroecológica se caracterizan por tener poca capacidad de retención de agua por drenaje excesivo y erosión hídrica severa, los mismos son de textura media a gruesa con limitada aptitud agrícola y por lo tanto pobres en producción de materia orgánica. La vegetación se compone de bosques donde predominan el quebrachal, mistol, guayacán, itín entre otros; en regiones donde los suelos son bajos se puede encontrar palo santo, algarrobo y vinal. Entre los pastizales se identifica el espartillar (Argentina, 2022).

#### **2.3.3.1. Diseño muestral**

Para el diseño del muestreo, la cantidad de predios y de animales se obtuvo a partir de datos suministrados por el Ministerio de Producción del Chaco y el SENASA regional. Se definió utilizar un sistema de muestreo simple en dos etapas, estimando primero la cantidad de establecimientos – para determinación de prevalencia interpredio – y luego la de animales – para determinar prevalencia intrapredio – tal como se describe en las Tablas 2 y 3. Para las estimaciones del marco muestral se utilizó el programa Win Episcopo Versión 2.0 (Thusfield *et al.*, 2001).

**Tabla 2. Diseño experimental para estimación de cantidad de establecimientos y animales a muestrear en el Dpto. Gral. Güemes para determinación de prevalencia de brucelosis caprina**

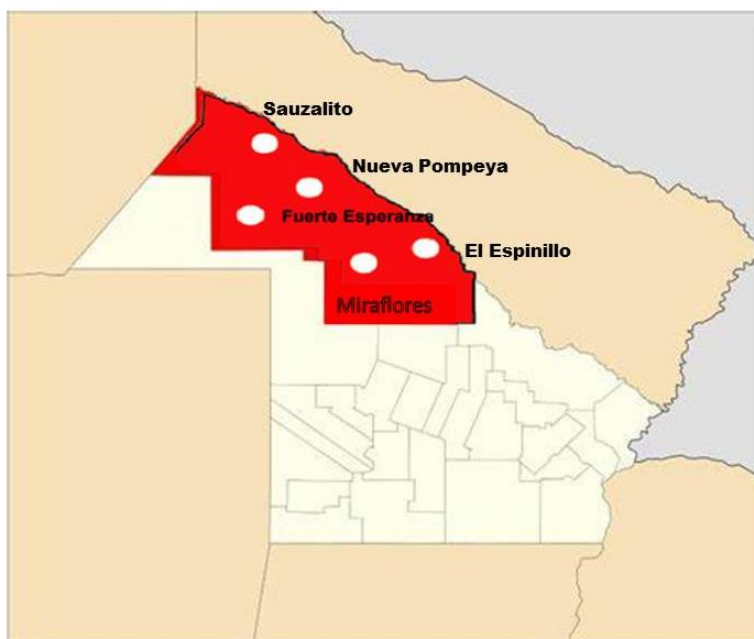
<b>PASO 1: ESTABLECIMIENTOS</b>		<b>PASO 2: ANIMALES</b>	
Total de establecimientos Gral. Güemes	4152	Total de animales Gral. Güemes	114234
Prevalencia interpredios esperada	35%	Prevalencia intrapredios esperada	10%
Error aceptado	5%	Error aceptado	1%
Nivel de confianza	95%	Nivel de confianza	95%
<b>Total de establecimientos a muestrear</b>	<b>323</b>	<b>Total de animales a muestrear</b>	<b>3356</b>

Para determinar la cantidad aproximada de animales a muestrear por establecimiento se dividió el total de animales a muestrear (3356) por el total de establecimientos a muestrear 323, lo que arrojó un valor de 10 caprinos por establecimiento.

Teniendo en cuenta que la cantidad de animales a muestrear establecida fue de 10, y previendo inconvenientes relacionados con las muestras, se decidió sangrar 15 animales por establecimiento. En la tabla 3, se expresan las estimaciones aplicadas para definir la cantidad de establecimientos a muestrear en cada localidad, de acuerdo con registros de productores provenientes de los Centros de Desarrollo Productivo (CEDEPRO), los cuales están ubicados estratégicamente en las localidades de El Espinillo, Miraflores, Fuerte Esperanza, Nueva Pompeya y Sauzalito del Dpto. Gral. Güemes tal como se puede apreciar en la figura 2.

**Tabla 3. Cantidad de establecimientos a muestrear en cada localidad del Dpto. Gral. Güemes para determinación de la prevalencia de brucelosis caprina**

Total de establecimientos a muestrear en Gral. Güemes	Total de CEDEPROs seleccionados (El Espinillo, Miraflores, Fuerte Esperanza, Nueva Pompeya y Sauzalito)	Cantidad de establecimientos a muestrear por localidad
323	5	65



**Figura 2. Localización de los Centros de Desarrollo Productivo - CEDEPROs. en los Departamentos Gral. Güemes de la provincia del Chaco.**

Se procedió a realizar la identificación y caracterización de los establecimientos y de los animales. Los establecimientos fueron identificados mediante coordenadas de geolocalización y nombre del propietario, así como también se consignaron datos referidos a especies animales explotadas, antecedentes de la enfermedad en el hato, entre otros. Con respecto a los animales se procedió a efectuar la identificación individual con caravanas numéricas, y registro de datos de raza, sexo y edad.

Se extrajeron 5 ml de sangre de hembras mayores de 6 meses de edad mediante venopunción yugular, utilizando tubos estériles para su recolección y almacenamiento. Las muestras de suero fueron analizadas en primera instancia por medio de BPA (véase 2.2.1.) como prueba tamiz, y los sueros positivos a BPA fueron procesados mediante el diagnóstico confirmatorio con la técnica de FPA (véase 2.2.5). Ambas técnicas fueron realizadas siguiendo las directrices de SENASA (Nicola *et al.*, 2019).

Para definir la prevalencia interpredial, se estimó la proporción de los predios infectados sobre el total de predios analizados en cada localidad. Y respecto a la prevalencia intrapredial, la estimación tuvo en cuenta la proporción de animales positivos sobre el total de animales seleccionados (n=15) en cada establecimiento. Las fórmulas aplicadas para las determinaciones mencionadas fueron las siguientes (Thusfield, 1990):

*Prevalencia interpredial*

$$\text{predios infectados(n) / total de predios visitados(n)*100}$$

*Prevalencia intrapredial*

$$\text{animales infectados (n) / total de animales muestreados (15)*100}$$

Para determinar posibles factores de riesgo se realizó una encuesta epidemiológica a los productores visitados en los establecimientos seleccionados. La encuesta estaba conformada por preguntas con respuestas de tipo binario SI/NO con el objeto de facilitar el análisis estadístico (véase ANEXO).

### **2.3.3.2. Análisis estadístico**

Se construyeron tablas 2x2 para contrastar las distintas variables encuestadas con resultados de FPA positivos (animales enfermos). Se analizaron los resultados mediante el cálculo de los valores de Odds ratio (OR) para lo que se utilizó el programa estadístico MedCalc para Windows versión 19.4 (Schoonjans *et al.*, 2009), y para la estimación de Chi cuadrado ( $X^2$ ) se trabajó con el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2020).

En la tabla 4 se presentan los totales de encuestas analizadas durante las visitas a los establecimientos agropecuarios en las localidades del Dpto. Gral. Güemes.

**Tabla 4. Total de encuestas epidemiológicas realizadas a pequeños productores de las localidades visitadas durante los muestreos de campo en el Dpto. Gral. Güemes para identificación de posibles factores de riesgo asociados a la presencia de la enfermedad**

<b>Localidad</b>	<b>Encuestas realizadas (n)</b>
El Espinillo	63
Miraflores	68
Fuerte Esperanza	57
Nueva Pompeya	65
Sauzalito	64
<b>TOTAL</b>	<b>317</b>

Las variables que estuvieron incluidas en la encuesta (véase ANEXO) fueron: tipo de manejo; aptitud; transhumancia; si forman parte de una unidad epidemiológica con diagnóstico o síntomas compatibles de brucelosis; presencia de montes; presencia de animales silvestres; antecedentes de laboratorio (diagnóstico de brucelosis, existencia de reaccionantes positivos); presencia de agua estancada; contaminación prolongada de comederos y bebederos; accesos a pastos contaminados; problemas de alimentación insuficiente; convivencia con otros animales domésticos; contacto entre animales domésticos mediante puntos de agua y pastoreo en común; reposición con hijas de madres positivas; hijos positivos; eliminación de hembras positivas; tamaño del establecimiento; presencia de abortos, mastitis u orquitis; destrucción de productos del aborto; uso de estiércol como abono; aislamiento de hembras próximas a parir; presencia de parasitosis; ingresos y procedencias de animales nuevos; existencia y estado del alambrado perimetral; síntomas de brucelosis en humanos, y diagnóstico confirmatorio en humanos mediante serología.

#### **2.3.4. Determinar las cepas de *Brucella melitensis* actuantes en rodeos de zonas endémicas**

Para cumplir este objetivo se seleccionaron siete rodeos identificados como infectados a partir del relevamiento serológico en la localidad de Miraflores. En cada establecimiento se tomaron muestras de suero de la totalidad de los animales para

identificar a los reaccionantes positivos. A partir de estos y de aquellas hembras que habían tenido un parto o aborto en los últimos 15 días, se tomaron las muestras clínicas para cultivo bacteriológico, que consistieron en sangre con anticoagulante en tubos vacutainer citratados para realización de hemocultivos, hisopados vaginales realizados con hisopos y almacenados en tubos estériles, así como también se colectaron muestras de leche de los dos cuartos en recipientes estériles (OIE, 2016; Alton y Jones, 1976) (véase 2.1.1.).

En las instalaciones del Laboratorio de Sanidad Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNNE, se procesaron las muestras de sangre para serología mediante las técnicas de BPA como técnica screening (véase 2.2.1.) y FPA como técnica confirmatoria (véase 2.2.5.).

A partir de los resultados de FPA positivos o de registros de hembras que habían abortado recientemente, se remitieron a las 48hs, las muestras pareadas de sangre con anticoagulante al Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) (véase 2.1.1.), para cultivo bacteriológico conjuntamente con las muestras de hisopados vaginales y muestras de leche. Se enviaron un total de 98 muestras de sangre con anticoagulante, 20 muestras de leche y 7 hisopados vaginales.

### III. RESULTADOS

Los resultados se presentan a continuación en el orden de acuerdo a los objetivos planteados.

#### 3.1. Evaluación de técnicas serológicas para medición y diferenciación de anticuerpos en sangre en animales infectados naturalmente.

En la tabla 5 se puede apreciar la cantidad de muestras procesadas con cada técnica y los resultados obtenidos.

**Tabla 5. Resultados para BPA, ELISAI y FPA, en 201 sueros de caprinos no vacunados de distintas localidades del Dpto. Gral. Güemes Chaco**

Pruebas	BPA		ELISAI		FPA	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Muestras (n)	97	104	75	126	80	121
Total	201		201		201	

En la tabla 6 se muestran los resultados comparativos de análisis serológicos mediante las técnicas de BPA, ELISAI y FPA usando FC como Gold Standard sobre 201 de caprinos no vacunados provenientes de distintas localidades del Dpto. Gral Güemes Chaco.

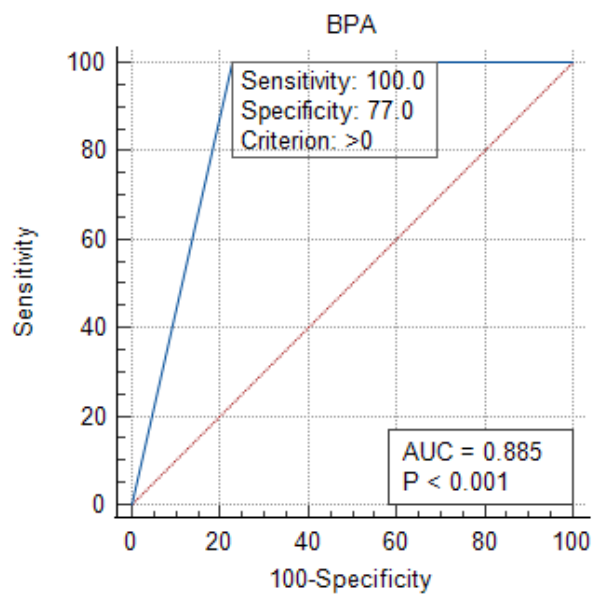
**Tabla 6. Tabla de contingencia con los resultados de análisis serológicos mediante las técnicas de BPA, ELISAI y FPA usando FC como Gold Standard sobre 201 de caprinos no vacunados provenientes de distintas localidades del Dpto. Gral Güemes Chaco**

		BPA		ELISAI		FPA	
		Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
FC	Positivos	66	0	65	1	65	1
	Negativos	31	104	10	125	15	120



En los gráficos 3, 4 y 5 se presentan los resultados serológicos de FC y análisis ROC con el área bajo la curva (AUC), punto de corte óptimo y valores de Sensibilidad y Especificidad obtenidos a partir del contraste de las pruebas serológicas evaluadas con la de referencia, FC.

A



B

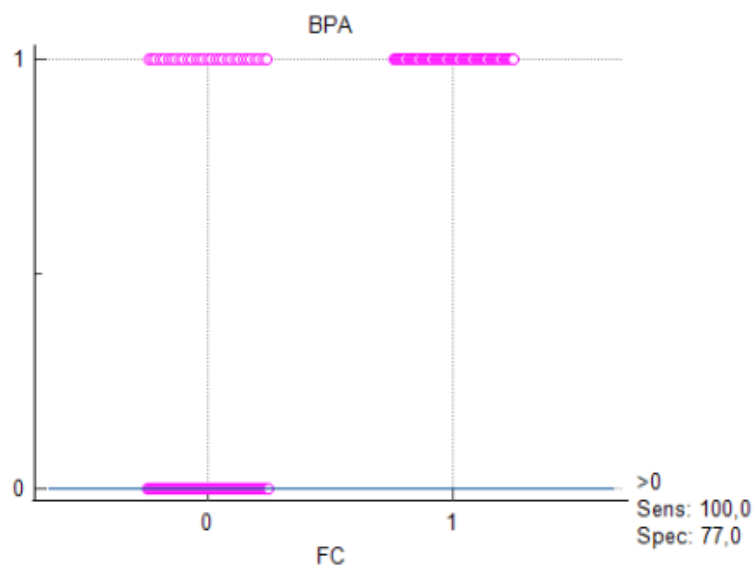
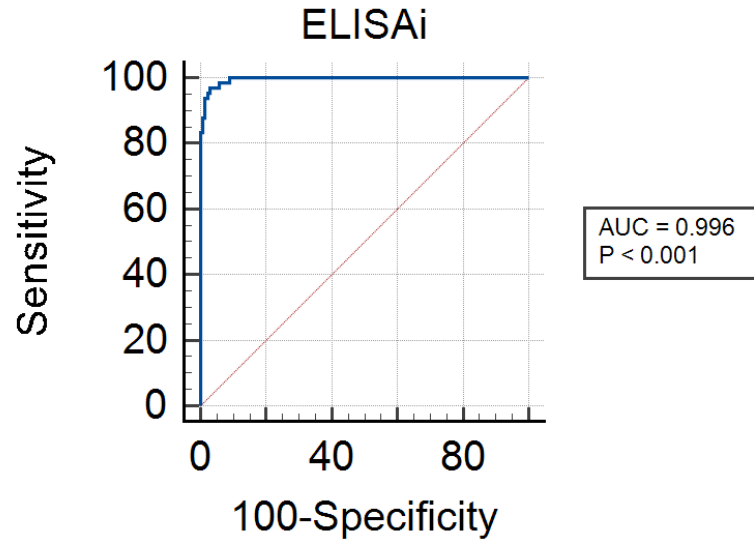


Figura 3. Análisis de curva ROC para la técnica de BPA. (A) Área bajo la curva (AUC) y (B) distribución de positivos y negativos para la técnica de BPA en contraste con la técnica de FC sobre 201 sueros de caprinos del Dpto. Gral. Güemes, Chaco

A



B

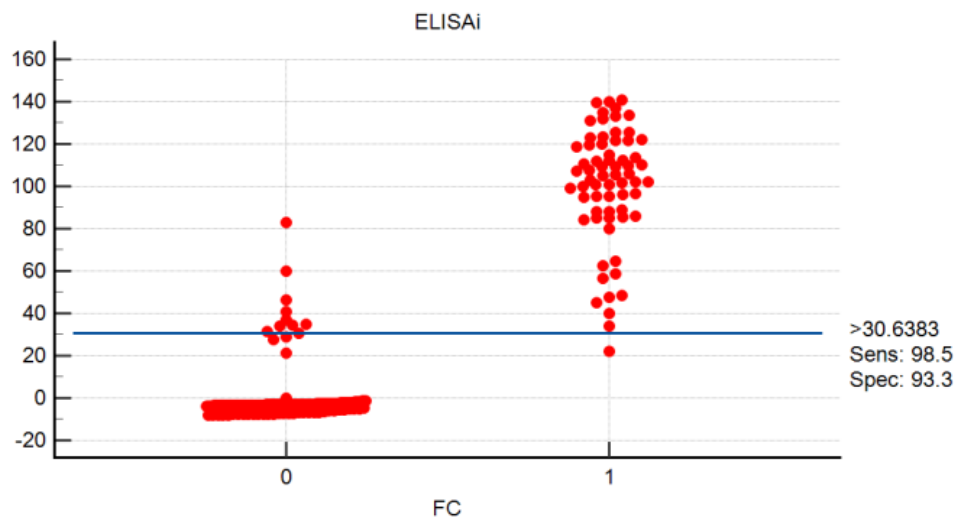
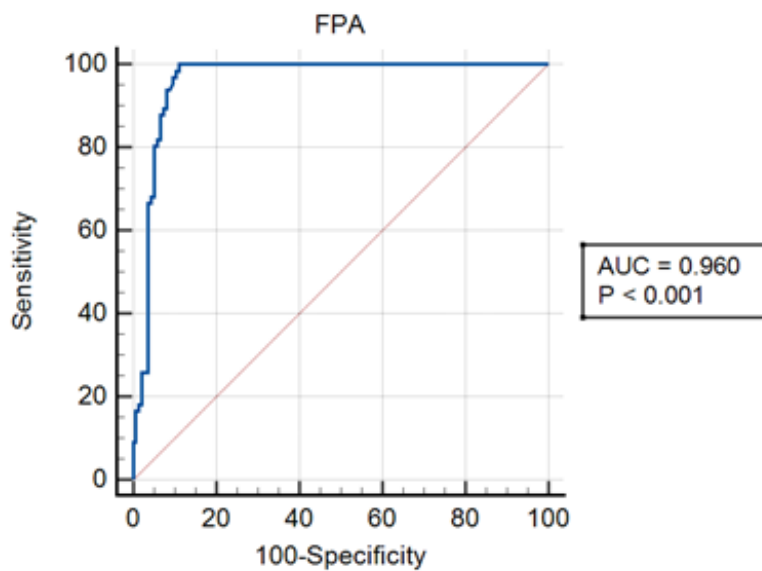
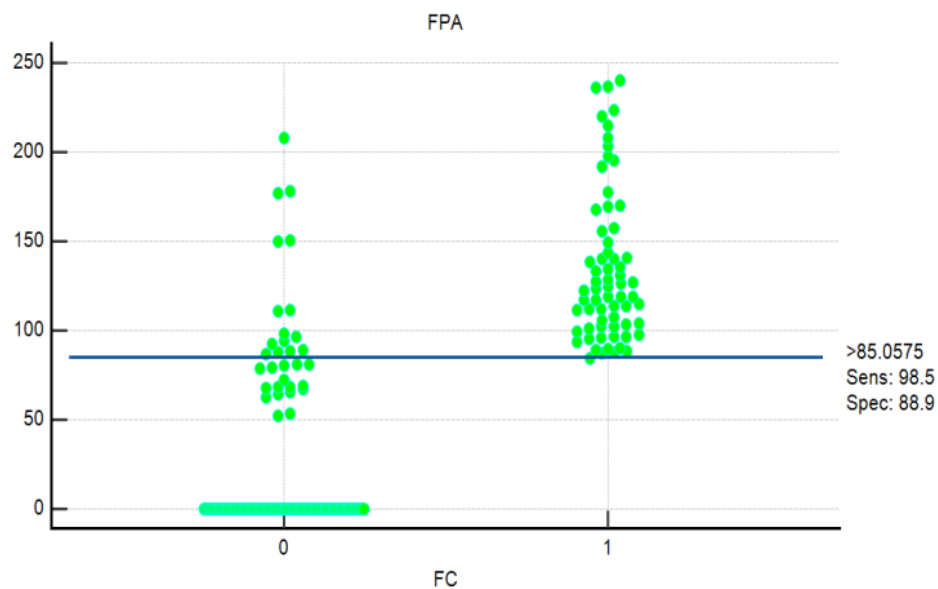


Figura 4. Análisis de curva ROC para la técnica de ELISAI. (A) Área bajo la curva ROC, punto de corte utilizado (30PP) y distribución de positivos y negativos (B) en contraste con la técnica de FC sobre 201 sueros caprinos del Dpto. Gral. Güemes, Chaco

A



B



**Figura 5. Análisis de curva ROC para la técnica de FPA. (A) Área bajo la curva ROC, punto de corte utilizado (85mP) y distribución de positivos y negativos (B) en contraste con la técnica de FC sobre 201 sueros caprinos del Dpto. Gral. Güemes, Chaco**

Utilizando los datos anteriores de procedió a la comparación de las tres técnicas utilizando el análisis del área bajo la curva ROC. El mejor rendimiento correspondió a la

técnica de ELISAI, seguida en orden decreciente por las pruebas de FPA y BPA como se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7. Área bajo la curva ROC e intervalo de confianza para cada una de las pruebas serológicas evaluadas, en relación con los resultados de FC sobre sueros caprinos del Dpto. Gral Güemes Chaco**

	<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>	<b>AUC</b>	<b>IC 95%</b>
<b>Técnica</b>	n	N		
<b>BPA</b>	97	104	0,885	0,833-0,926
<b>ELISAI</b>	75	126	0,996	0,974-1,000
<b>FPA</b>	80	121	0,960	0,922-0,982

En la tabla 8 se presentan las estimaciones de Sensibilidad (*Se*), Especificidad (*Es*) según los puntos de corte utilizados en cada técnica, e Índice *Kappa* para las pruebas de ELISAI y FPA respecto a los resultados de FC.

**Tabla 8. Resultados de parámetros para la evaluación de los desempeños demostrados por las técnicas serológicas de BPA, ELISAI y FPA respecto a los resultados de FC**

Técnica	<i>Se</i> (%)*	<i>Es</i> (%)*	Punto de corte	Índice <i>kappa</i>	Índice de performance (IP)
<b>BPA</b>	100	77,04	-	0,688	177,4
<b>ELISAI</b>	98,5	93,3	30PP	0,880	191,8
<b>FPA</b>	98,5	88,9	85 mP	0,829	187,4

\*Valores relativos a FC.

Al analizar individualmente cada una de las técnicas se puede observar, que todas demostraron elevada *Se*. Respecto a los valores de *Es* el ELISAI supera al BPA y FPA. En base a la escala propuesta por Landis y Koch (1977) para establecer la fuerza de concordancia entre pruebas, la técnica de BPA evidenció una fuerza de asociación adecuada, y las técnicas de FPA y ELISAI una asociación excelente respecto de FC.

En cuanto a los índices de performance obtenidos, la técnica de ELISAI presenta el valor más elevado, seguido por el FPA y BPA en último lugar.

En la tabla 9 se expresan los resultados del análisis estadístico mediante la prueba de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) sobre los resultados serológicos de las técnicas de ELISAI y FPA aplicadas en relación a los resultados obtenidos a través de FC.

**Tabla 9. Resultados de estimación de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) sobre resultados de técnicas serológicas de FPA y ELISAI versus FC sobre sueros caprinos no vacunados provenientes de distintas localidades del Dpto. Gral Güemes Chaco.  $\alpha$  0,05**

Técnica	$\chi^2$	p-valor*
<b>ELISAI vs. FC</b>	157,20	<0,00001
<b>FPA vs. FC</b>	141,24	<0,00001

\*significancia estadística

Las estimaciones de  $\chi^2$  evidencian asociaciones estadísticamente significativas entre las técnicas serológicas evaluadas y la FC, siendo la más elevada aquella resultante entre

ELISAI vs. FC. La técnica de BPA al ser una técnica de diagnóstico de tipo cualitativa no pudo ser procesada por medio de este análisis estadístico.

### 3.2. Estudio de la respuesta inmune humoral de la vacuna *Brucella melitensis* REV-1 en cabras utilizando diferentes vías de administración.

La vacuna *B. melitensis* REV-1 generó anticuerpos en los animales vacunados por diferentes vías de administración. La respuesta inmune resultante fue evaluada mediante las técnicas serológicas de diagnóstico de ELISAI, ELISAb y FPA.

#### 3.2.1. ENZIMOINMUNOENSAYO INDIRECTO – ELISAI

##### 3.2.1.1. Análisis exploratorio

A continuación, se presentan los valores medios y errores estándares de los niveles de anticuerpos generados por la vacuna *B. melitensis* REV-1 medidas por la técnica de ELISAI y expresados en Porcentaje de Positividad (PP).

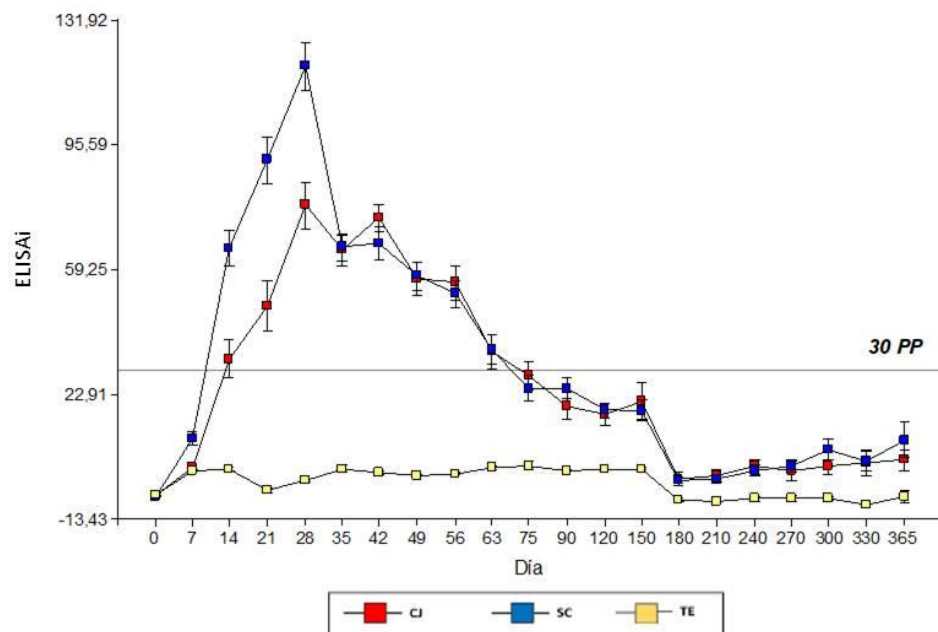
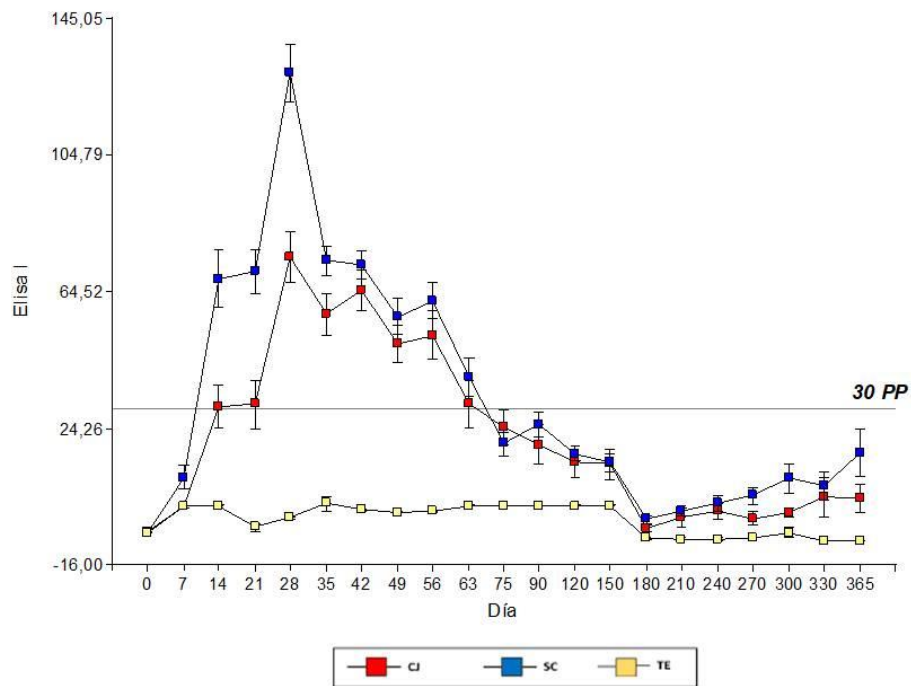


Figura 6. Valores de ELISAI y momentos de medición en caprinos vacunados con *B. melitensis* REV-1, por vía CJ y SC y animales testigos desde el día 0 a 365. Punto de corte utilizado: 30 PP

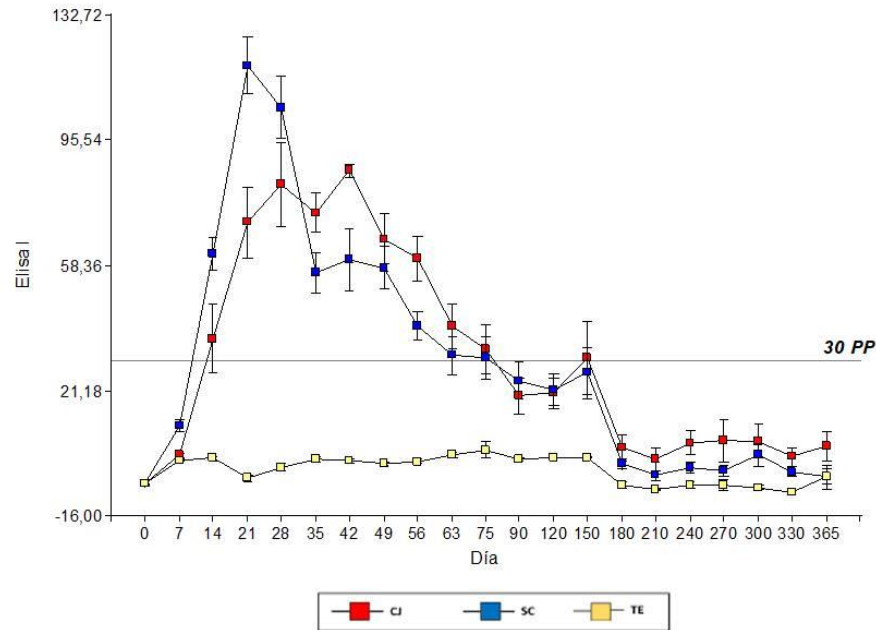
En la figura 6, se aprecia el comportamiento de los grupos vacunados para la técnica ELISAI. El pico máximo de producción de anticuerpos para el grupo conjuntival fue el día 28 (ME:78,20/DE: 33,89) y el mínimo el día 180 (ME:-1,48/DE:8,94). El grupo subcutáneo también demostró el pico máximo el día 28 (ME:118,60/DE:33,57), y el día 210 el pico mínimo (ME:-1,48/DE:5,38). El día 90 ambos grupos vacunados resultaron negativos.

Los resultados obtenidos se analizaron de manera independiente según sexo, con el objeto de determinar posibles diferencias entre machos y hembras en la producción de anticuerpos.

A





**B**

**Figura 7. A. Curvas de anticuerpos y valores de ELISAI y momentos de medición en hembras caprinas vacunadas con *B. melitensis* REV-1, por vía conjuntival y subcutánea y animales testigos desde el día 0 a 365. B. Valores de ELISAI y momentos de medición en machos caprinos vacunados con *B. melitensis* REV-1, por vía conjuntival y subcutánea y animales testigos desde el día 0 a 365. Punto de corte utilizado: 30PP.**

En la figura 7 A se presentan las curvas de titulación para hembras, aquellas pertenecientes al grupo conjuntival se positivizaron el día 28 y continuaron así hasta el día 90, en cambio las hembras del grupo subcutáneo se positivizaron el día 14 hasta el día 90. Por otra parte en la figura 7 B, los machos del grupo conjuntival fueron positivos desde el día 21 hasta el día 90, y aquellos del grupo subcutáneo lo fueron desde el día 14, hasta el día 90 en el cual se negativizaron.

### **3.2.1.2. Análisis de la variancia**

El análisis de la variancia muestra que hubo diferencias significativas en el comportamiento de los grupos entre los días 7 a 120 y 300 (tabla 10).

**Tabla 10. Análisis de la técnica de ELISAI mediante la Prueba de varianza, estadísticos F (con correspondientes probabilidades), y promedios de los tratamientos probados para cada momento de medición y resultados de la prueba de Duncan en caprinos vacunados con REV-1 vía CJ y SC y animales TE, desde día 0 a 365**

Análisis de la Varianza				Prueba de Duncan		
Momento	F	p-valor	Significancia estadística (*) A	Grupo	Medias	Significancia estadística
Día 7	12,49	<0,0001	*	CJ	1,44	A
				SC	10,2	B
				TE	0,75	A
Día 14	23,11	<0,0001	*	CJ	33,32	B
				SC	65,52	C
				TE	1,12	A
Día 21	27,76	<0,0001	*	CJ	48,84	B
				SC	91,24	C
				TE	-5	A
Día 28	45,26	<0,0001	*	CJ	78,2	B
				SC	118,6	C
				TE	-2	A
Día 35	35,01	<0,0001	*	CJ	64,92	B
				SC	66	B
				TE	1,38	A
Día 42	40,88	<0,0001	*	CJ	74,48	B
				SC	66,96	B
				TE	0,25	A
Día 49	26,83	<0,0001	*	CJ	56,68	B
				SC	57,44	B
				TE	-0,5	A
Día 56	22,54	<0,0001	*	CJ	55,52	B
				SC	52,36	B
				TE	-0,12	A
Día 63	9,02	0,0004	*	CJ	35,36	B
				SC	35,88	B
				TE	1,62	A

		0,004		CJ	28,36	B
Día 75	6,12		*	SC	24,68	B
				TE	2,25	A
		0,0034		CJ	19,52	B
Día 90	6,3		*	SC	24,48	B
				TE	0,88	A
		0,0064		CJ	16,92	B
Día 120	5,59		*	SC	18,33	B
				TE	1,13	A
				CJ	2	AB
Día 300	3,77	0,031	*	SC	6,9	B
				TE	-7,33	A

---

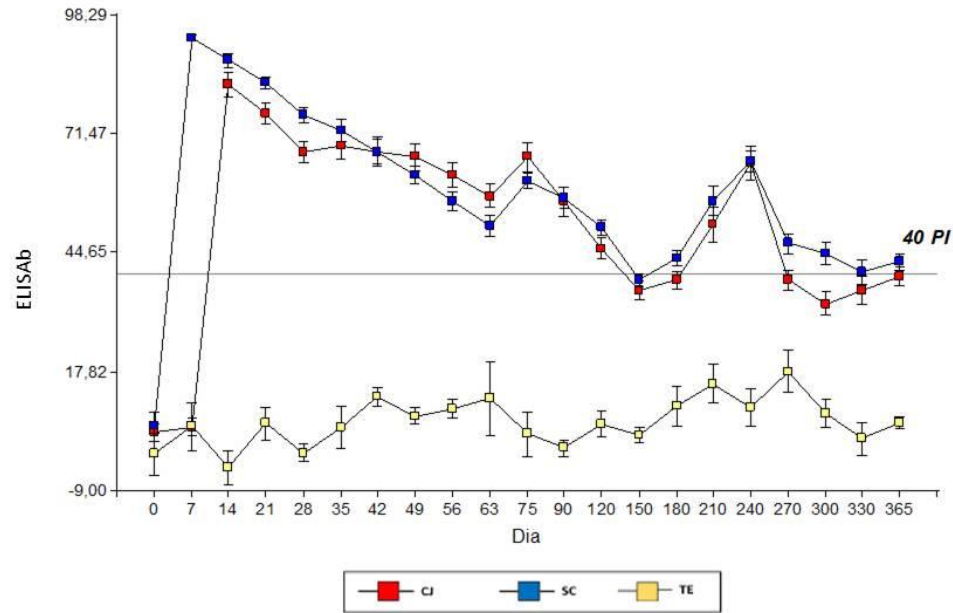
(\*) A. Significancia estadística de la Prueba de la Varianza. B. Resultados del test de Duncan, donde la significancia estadística está definida por la medias de los grupos que tienen letras diferentes.

Al analizar los promedios de PP obtenidos en cada grupo y momento de medición, el análisis de la variancia muestra que hubo diferencias significativas en el comportamiento de los grupos entre los días 7 a 120 y el día 300 (tabla 10). Los días en los cuales se registraron picos de máxima producción de anticuerpos (día 28 F: 45,26 y el p-valor <0,0001) coinciden con los resultados de las Pruebas de Duncan. Respecto al día 300, se podría suponer que la prueba fue capaz de detectar animales con mayor producción de anticuerpos, por ello la significancia estadística.

### 3.2.2. ENZIMOINMUNOENSAYO DE BLOQUEO – ELISAb

#### 3.2.2.1. Análisis exploratorio

A continuación, se presentan los valores medios y errores estándares de los niveles de anticuerpos generados por la vacuna *B. melitensis* REV-1 medidas por la técnica de ELISAb y expresados en Porcentaje de Inhibición (PI).



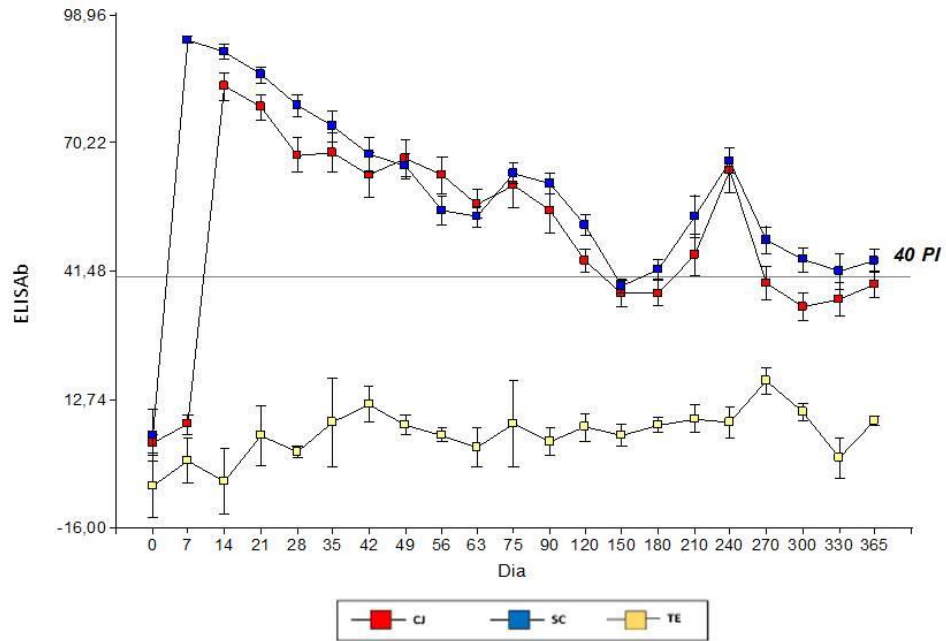
**Figura 8. Curvas de anticuerpos y valores de ELISAb en caprinos vacunados con *B. melitensis* REV-1, por vía conjuntival y subcutánea y animales testigos desde el día 0 a 365. Punto de corte utilizado: 40 PI**

En la figura 8, se pueden apreciar las diferencias en el comportamiento de los valores de titulación en los animales de los distintos grupos experimentales y según vía de inoculación de acuerdo con la técnica de ELISAb.

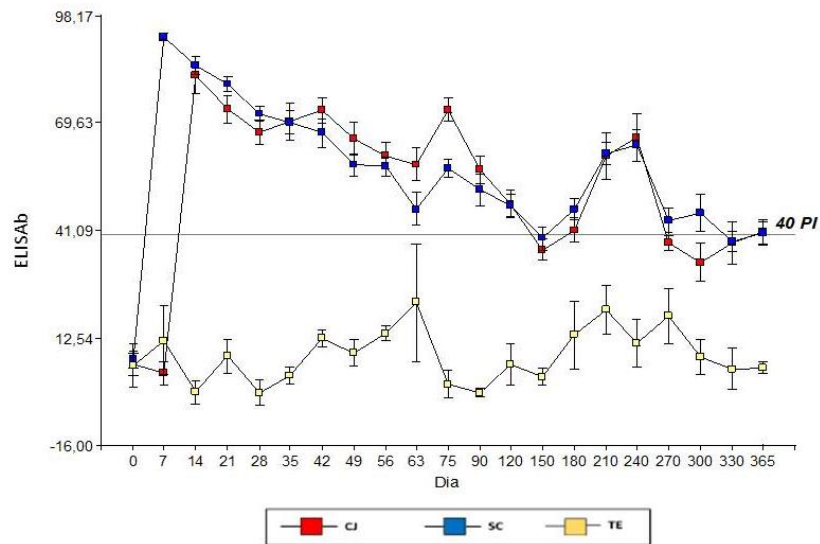
En este caso, el pico máximo de producción de anticuerpos para el grupo conjuntival fue el día 14 (ME: 82,65/DE: 13,78) y el pico mínimo el día 300 (ME: 33,1/DE:11,77). Por otro lado el grupo subcutáneo, tuvo su pico máximo el día 7 (ME: 93,09/DE: 3,14) y pico mínimo el día 150 (ME: 38,43/DE:7,09). En ambos grupos vacunados, los PI detectados por la técnica fueron variables hasta el día 365, sin lograr demostrar negatividad completa de los grupos vacunados. Los animales del grupo testigo resultaron negativos durante todo el ensayo, y se mantuvieron alejados del punto de corte tal como se puede apreciar en la figura 8.

Los resultados obtenidos se analizaron de manera independiente según sexo para determinar posibles diferencias entre machos y hembras en la producción de anticuerpos.

A



B



**Figura 9. A. Curvas de anticuerpos y valores de ELISAb en hembras caprinas vacunadas con *B. melitensis* REV-1, por vía CJ y SC y animales testigos desde el día 0 a 365. B. Curvas de anticuerpos y valores de ELISAb en machos caprinos vacunados con *B. melitensis* REV-1, por vía CJ y SC y animales testigos desde el día 0 a 365. Punto de corte utilizado: 40 PI**

En la figura 9 A se evidencia el comportamiento de las hembras de los grupos vacunados. Aquellas que pertenecían al grupo conjuntival se positivizaron el día 14, manteniéndose positivas en lo sucesivo y sin poder definirse la negatividad del 100% del grupo; respecto a las hembras del grupo subcutáneo superaron el punto de corte, el día 7 sin lograr negativizarse en momentos posteriores. En la figura 9 B, los machos muestran un comportamiento similar al de las hembras, donde ambos grupos vacunados, se positivizaron los días 14 y 7 para los grupos conjuntival y subcutáneo respectivamente sin negativizarse hasta el último día de ensayo. En el grupo testigo, tanto hembras como machos manifestaron marcada amplitud del desvío estándar.

### 3.2.2.2 Análisis de la variancia

El análisis de la varianza muestra que hubo diferencias significativas en el comportamiento de los grupos entre los días 7 a 365 (tabla 11).

**Tabla 11. Análisis de la técnica de ELISAb mediante la Prueba de varianza, estadísticos F (con correspondientes probabilidades), y promedios de los tratamientos probados para cada momento de medición y resultados de la prueba de Duncan en caprinos vacunados con *B. melitensis* REV-1 vía conjuntival y subcutánea y animales testigos, desde día 0 a 365.**

Análisis de la Varianza				Prueba de Duncan		
Momento	F	p-valor	Significancia estadística (*) A	Grupo	Medias	Significancia estadística
Día 7	779,4 4	<0,0001	*	CJ	5,4	A
				SC	93,09	B
				TE	5,43	A
Día 14	230,8 8	<0,0001	*	CJ	82,65	B
				SC	88,09	B
				TE	-3,76	A
Día 21	204,8 8	<0,0001	*	CJ	76,1	B
				SC	83,14	B
				TE	6,15	A
Día 28	170,5	<0,0001	*	CJ	67,37	B

	6			SC	75,72	C
				TE	-0,56	A
				CJ	68,94	B
Día 35	75,6	<0,0001	*	SC	72,14	B
				TE	5,14	A
				CJ	67,45	B
Día 42	53,45	<0,0001	*	SC	67,36	B
				TE	12,04	A
				CJ	66,29	B
Día 49	75,64	<0,0001	*	SC	62,15	B
				TE	7,82	A
				CJ	62,06	B
Día 56	64,77	<0,0001	*	SC	56,36	B
				TE	9,28	A
				CJ	57,48	B
Día 63	30,7	<0,0001	*	SC	50,68	B
				TE	11,86	A
				CJ	66,26	B
Día 75	70,69	<0,0001	*	SC	60,81	B
				TE	3,71	A
				CJ	56,15	B
Día 90	59,25	<0,0001	*	SC	57,01	B
				TE	0,6	A
				CJ	45,68	B
Día 120	62,25	<0,0001	*	SC	50,43	B
				TE	5,98	A
				CJ	36,2	B
Día 150	54,63	<0,0001	*	SC	38,43	B
				TE	3,5	A
				CJ	38,43	B
Día 180	36,63	<0,0001	*	SC	43,57	B
				TE	10,13	A
				CJ	50,95	B
Día 210	17,29	<0,0001	*	SC	56,38	B
				TE	15	A
Día 240	39,08	<0,0001	*	CJ	64,82	B

				SC	65,33	B
				TE	9,83	A
				CJ	38,45	B
Día 270	16,91	<0,0001	*	SC	46,81	B
				TE	17,83	A
				CJ	3,1	B
Día 300	25,47	<0,0001	*	SC	44,6	C
				TE	8,33	A
				CJ	36,2	B
Día 330	21,28	<0,0001	*	SC	40,3	B
				TE	2,67	A
				CJ	39,3	B
Día 365	28,74	<0,0001	*	SC	42,65	B
				TE	6,25	A

(\*) A. Significancia estadística de la Prueba de la Varianza. B. Resultados del test de Duncan, donde la significancia estadística está definida por la medias de los grupos que tienen letras diferentes.

El análisis de la varianza para la técnica de ELISAb, muestra que hubo diferencias significativas en el comportamiento de los grupos vacunados entre los días 7 a 365 (tabla 11). Más específicamente, los días 7 y 14 los resultados del ANOVA mostraron resultados estadísticamente significativos: F:779,44 y p-valor: <0,0001 (día 7 grupo subcutáneo) y F: 230,88 y el p-valor <0,0001 (día 14 grupo conjuntival). Durante los 365 días de ensayo, no se pudo determinar la negatividad completa de cada grupo vacunado. Los animales testigos mantuvieron su condición durante todo el ensayo.

Los resultados de las Pruebas de Duncan (tabla 11), muestran diferencias de significancia estadística durante los 365 días de ensayo, lo cual se puede apreciar en las medias de los grupos vacunados las cuales oscilan alrededor del punto de corte (40 PI).

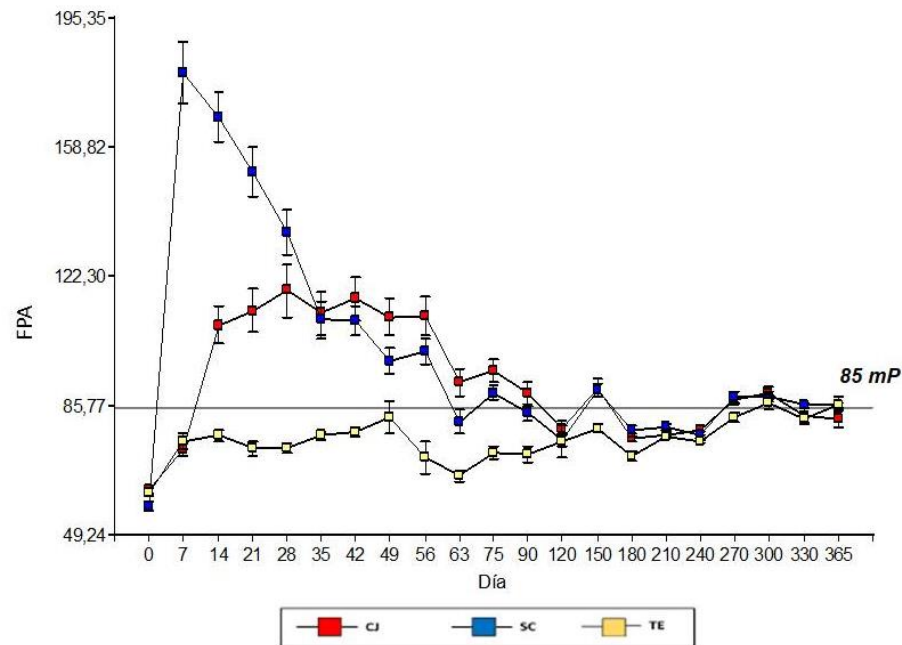
### 3.2.3. FLUORESCENCIA POLARIZADA - FPA

#### 3.2.3.1. Análisis exploratorio

A continuación, se presentan los valores medios y errores estándares de los niveles de anticuerpos generados por la vacuna *B. melitensis* REV-1 medidas por la técnica de FPA y expresados en unidades de milipolarización (mP).



Al analizar por grupo, se pueden observar diferencias en el comportamiento de los valores de titulación entre animales vacunados y no vacunados y según el modo de inoculación. La figura 10 muestra las curvas de anticuerpos detectadas por la técnica de FPA en los distintos grupos.



**Figura 10. Curvas de anticuerpos y valores de FPA en caprinos vacunados con *B. melitensis* REV-1, por vía conjuntival y subcutánea y animales testigos desde el día 0 a 365. Punto de corte utilizado: 85 mP**

Las curvas generadas por la vacuna se diferencian según la vía de inoculación. En el caso del grupo inoculado por vía conjuntival la curva se inicia con aumento moderado, cuyo pico máximo de producción ocurre el día 28 (ME: 118,20 mP/DE: 36,65) y luego se ameseta para terminar declinando, y cuyo pico mínimo se registra el día 180 (ME: 76,71/DE: 6,21).

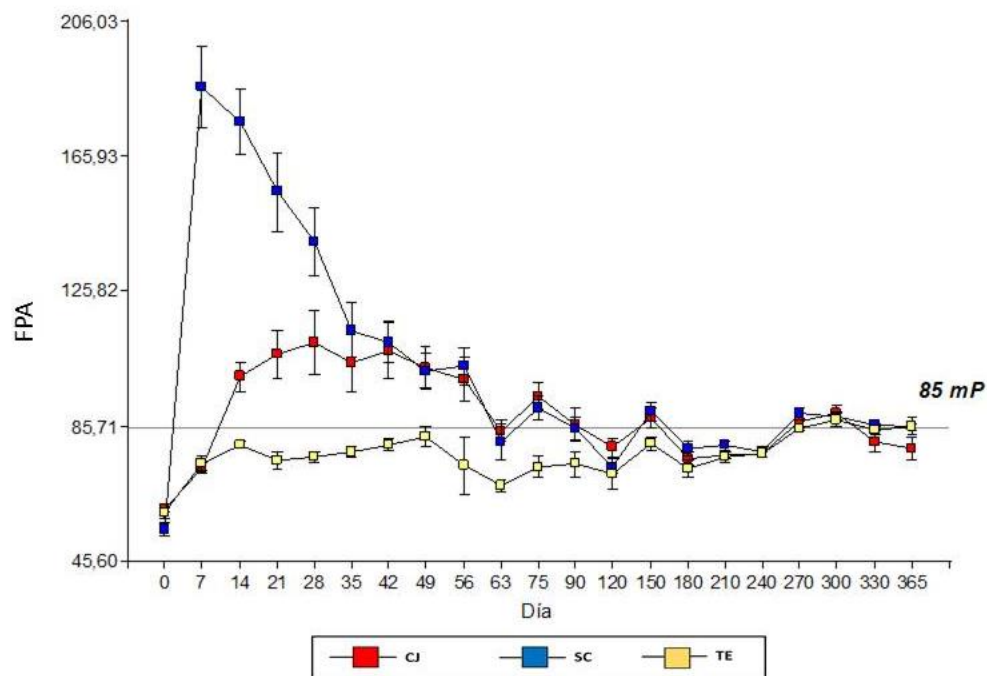
En cuanto a la vía subcutánea, ésta demuestra un aumento brusco con un pico máximo de producción el día 7 (ME: 180,04mP/DE: 43,36), y luego inicia un descenso paulatino acompañando la curva del grupo CJ, y el pico mínimo se registra el día 120 (ME: 76,17 mP/DE: 8,72).

La curva de los animales testigo se mantiene por debajo del punto de corte desde el día 0 hasta el día 300 donde supera levemente el punto de corte, lo mismo ocurre el día 365.

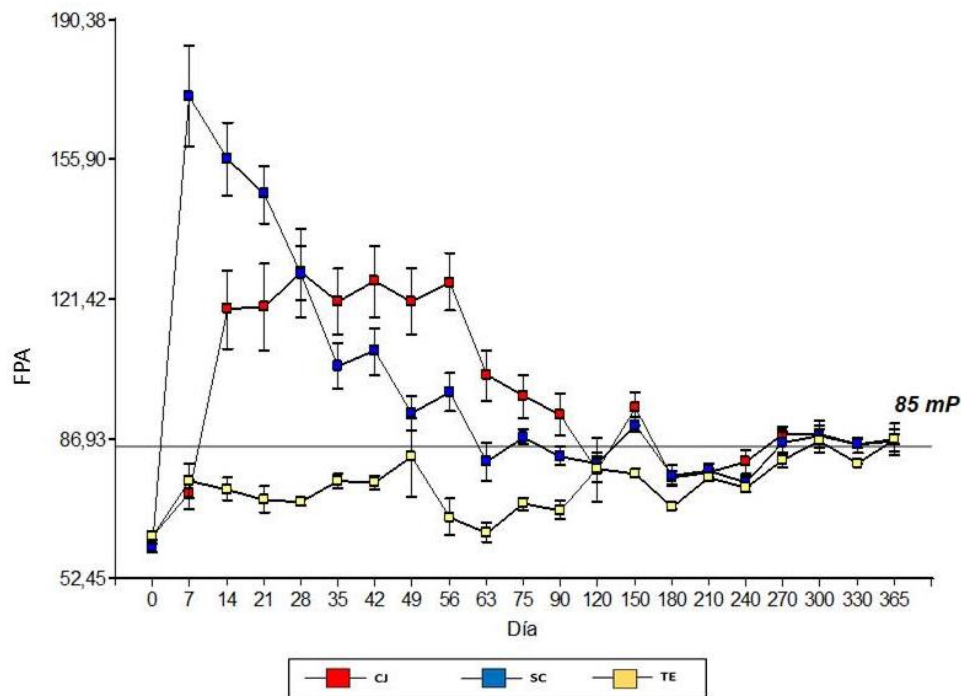
El día 14 postvacunación, el 100% de los animales pertenecientes al grupo CJ demostraron valores superiores al punto de corte, y mantuvieron esa condición hasta el día 120. Por su parte, en el grupo SC, todos los animales se positivizaron al día 7 postvacunación, y al igual que los animales del grupo CJ, todos se negativizaron para el día 120.

Los resultados obtenidos fueron analizados de manera separada según sexo para determinar posibles diferencias entre machos y hembras en la producción de anticuerpos.

**A**



B



**Figura 11. A. Curvas de anticuerpos y valores de FPA en hembras caprinas vacunadas con *B. melitensis* REV-1, por vía conjuntival y subcutánea y animales testigos desde el día 0 a 365. B. Curvas de anticuerpos y valores de FPA en machos caprinos vacunados con *B. melitensis* REV-1, por vía conjuntival y subcutánea y animales testigos desde el día 0 a 365. Punto de corte utilizado: 85mP**

Respecto a la figura 11 A, se puede evidenciar el comportamiento de las hembras, donde aquellas del grupo conjuntival se positivizaron el día 14 y continuaron así hasta el día 120. En cambio las hembras del grupo subcutáneo superaron el punto de corte desde el día 7 hasta el día 120. En relación al comportamiento de los machos (figura 11 B) los del grupo conjuntival también se positivizaron el día 14 para continuar así hasta el día 180. Por otra parte los machos del grupo subcutáneo demostraron igual comportamiento serológico que las hembras del mismo grupo (positivización día 7 y negativización día 120).

### 3.2.3.2. Análisis de la varianza

**Tabla 12. Análisis de la técnica de FPA mediante la Prueba de varianza, estadísticos F (con correspondientes probabilidades), y promedios de los tratamientos probados para cada momento de medición y resultados de la prueba de Duncan en caprinos vacunados con *B. melitensis* REV-1 vía conjuntival y subcutánea y animales testigos, desde día 0 a 365**

Momento	Análisis de la Varianza			Prueba de Duncan		
	F	p-valor	Significancia estadística (*) A	Grupo	Medias	Significancia estadística
Día 7	93,1 5	<0,0001	*	CJ	73,27	A
				SC	180,04	B
				TE	75,64	A
Día 14	41,8 3	<0,0001	*	CJ	108,61	B
				SC	167,28	C
				TE	77,26	A
Día 21	21,9 6	<0,0001	*	CJ	112,65	B
				SC	151,81	C
				TE	73,73	A
Día 28	11,0 2	0,0001	*	CJ	118,2	B
				SC	134,88	B
				TE	73,9	A
Día 35	5,5	0,0066	*	CJ	111,83	B
				SC	110,14	B
				TE	77,31	A
Día 42	7,13	0,0018	*	CJ	116	B
				SC	109,71	B
				TE	78,23	A
Día 49	5,69	0,0057	*	CJ	110,86	B
				SC	98,36	AB
				TE	82,41	A
Día 56	9,99	0,0002	*	CJ	111,07	B
				SC	101,3	B
				TE	70,91	A
Día 63	7,64	0,0012	*	CJ	90,32	B
				SC	81,31	B
				TE	65,89	A
Día 75	10,6 2	0,0001	*	CJ	95,82	B
				SC	89,39	B

				TE	72,33	A
				CJ	89,17	B
Día 90	4,81	0,0119	*	SC	83,95	B
				TE	71,93	A
				CJ	90,82	B
Día 150	4,16	0,0211	*	SC	90,08	B
				TE	79,36	A
				CJ	76,71	B
Día 180	3,55	0,0362	*	SC	78,62	B
				TE	71,6	A

(\*) A. Significancia estadística de la Prueba de la Varianza. B. Resultados del test de Duncan, donde la significancia estadística está definida por la medias de los grupos que tienen letras diferentes.

El análisis de la variancia de los promedios de mP obtenidos en cada grupo y momento de medición muestra que hubo diferencias significativas en el comportamiento de los grupos entre los días 7 a 90 y 150 a 180 (tabla 12). Los picos de máxima producción de anticuerpos en ambos grupos vacunados, se evidencian en los resultados de la tabla 1, siendo el valor de F y el p-valor para el grupo conjuntival el día 28 de 11,02 y 0,0001 respectivamente. En el caso de los animales del grupo subcutáneo, los resultados del ANOVA coinciden con el pico máximo registrado el día 7 (F: 93,15; p-valor: <0,0001). Entre los días 150 y 180 se observa una elevación en forma de pico lo cual puede ser contrastado mediante los resultados del ANOVA (tabla 12). A partir del día 210 y hasta el día 365, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas para la prueba de FPA en los animales de los grupos vacunados. Por otra parte, los animales del grupo testigo, demostraron su condición negativa a través de la curva de anticuerpos generada durante los 365 días de ensayo.

Respecto a los resultados de las Pruebas de Duncan (tabla 12), se confirman los datos obtenidos en ANOVA, y también se pueden apreciar los valores medios de cada grupo en los momentos en que hubo diferencias significativas.

### 3.3. Determinación de la prevalencia de brucelosis caprina y los factores de riesgo asociados a la presencia de la enfermedad en cinco localidades del Dpto. Gral. Güemes de la provincia del Chaco.

#### 3.3.1. Prevalencias interpredio e intrapredio

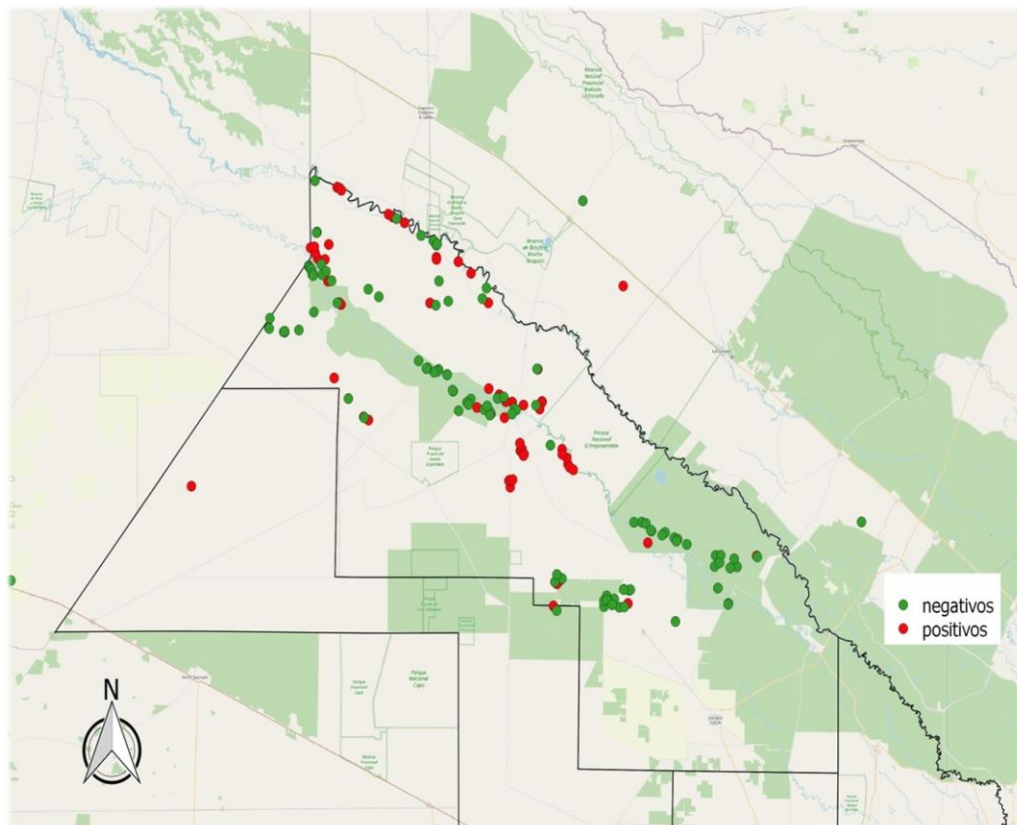
En la tabla 13 se exponen los totales correspondientes a productores visitados en cada localidad, animales muestreados, animales con resultados positivos por medio de las técnicas diagnósticas de BPA y FPA, y los resultados de las prevalencias interpredios e intraprediales de la enfermedad.

**Tabla 13. Establecimientos visitados y animales muestreados en las localidades El Espinillo, Miraflores, Fuerte Esperanza, Nueva Pompeya y Sauzalito del Dpto. Gral. Güemes, Chaco**

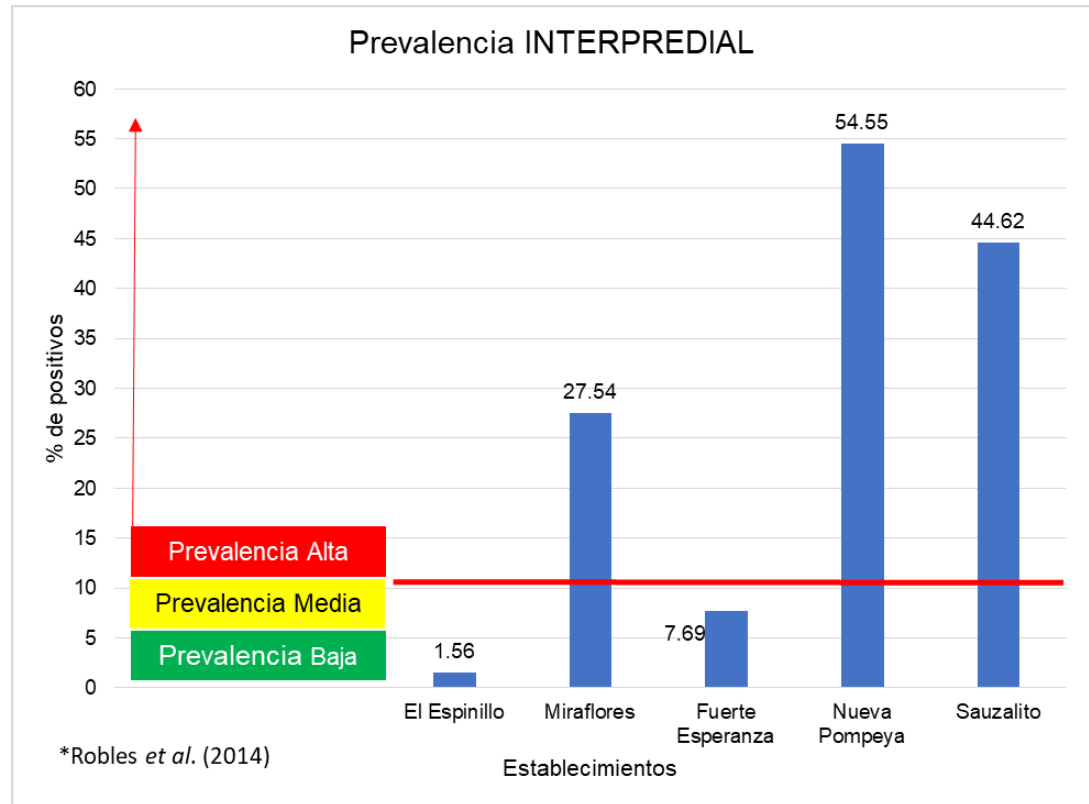
Localidad	Est. visitados (n)	Est. con animales positivos a ambas pruebas (n)	Prevalencia Interpredial media (%)	Animales muestreados (n)	Animales positivos (n)	Prevalencia intrapredial media y rango (%)
El Espinillo	64	1	1,56	960	2	0,21 (0-0,21)
Miraflores	69	19	27,54	1035	48	4,64 (0-40)
Fuerte Esperanza	78	6	7,69	1170	9	0,77 (0-13,3)
Nueva Pompeya	66	36	54,55	1028	103	10,02 (0-46,6)
Sauzalito	65	29	44,62	1020	55	5,39 (0-20)
<b>TOTALES</b>	<b>342</b>	<b>91</b>	<b>26,61</b>	<b>5213</b>	<b>217</b>	<b>4,16</b>

Con respecto a los resultados de prevalencia interpredial obtenidos en las 5 localidades seleccionadas, Nueva Pompeya y Sauzalito superaron el 35% de prevalencia esperada, seguidas por las localidades de Miraflores (27,54%), Fuerte Esperanza (7,69%) y El Espinillo (1,56%). La prevalencia interpredial global del

Dpto. Gral. Güemes resultó ser de 26,61%. Mediante georeferenciación de la mayoría de los establecimientos visitados, se pudo establecer el tipo de distribución de la enfermedad (figura 12).



**Figura 12. Geolocalización de establecimientos con caprinos negativos y positivos a brucelosis en las localidades de El Espinillo, Miraflores, Fuerte Esperanza, Nueva Pompeya del Dpto. Gral. Güemes-Chaco. Gentileza: M.V. Fabiana Moreno, INTA Balcarce**

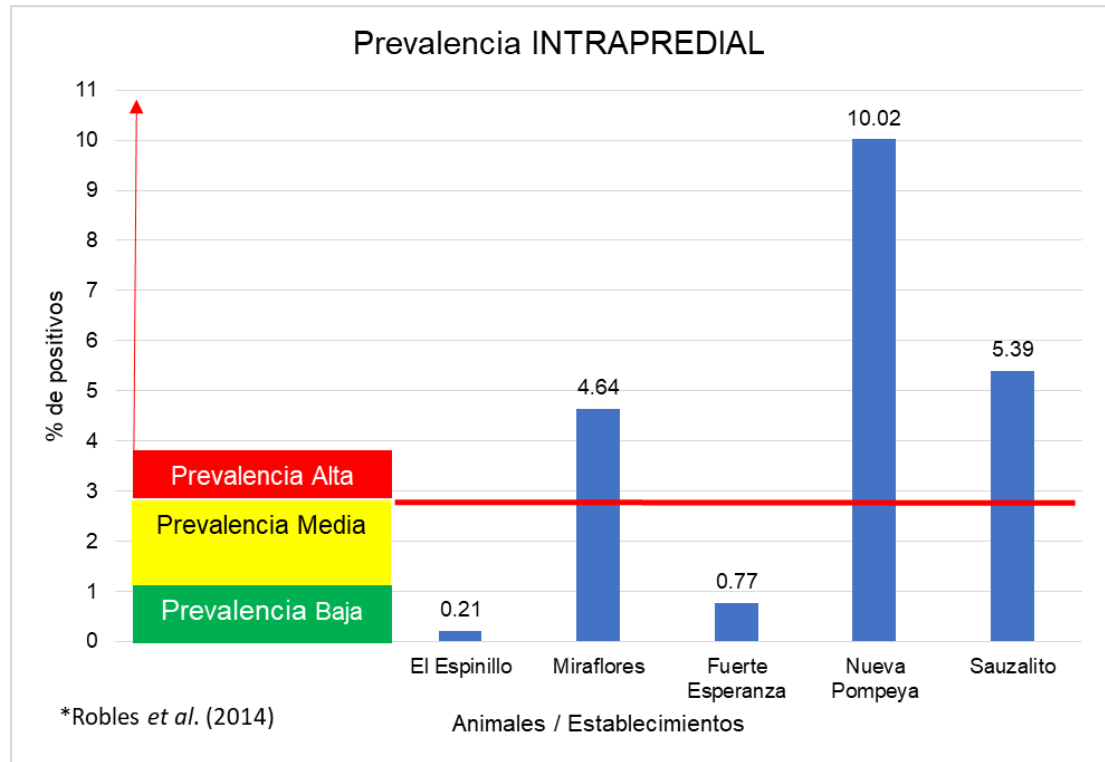


**Figura 13. Prevalencias interprediales halladas en las localidades de El Espinillo, Miraflores, Fuerte Esperanza, Nueva Pompeya y Sauzalito del Departamento Gral. Güemes, Chaco y clasificación según escala propuesta por Robles *et al.* (2014)**

Por otra parte se definió como predio infectado a aquel que tuviera al menos un animal con resultado positivo a ambas pruebas diagnósticas (BPA y FPA), tal como se muestra en la tabla 13.

Las prevalencias intraprediales más elevadas se obtuvieron en las localidades de Nueva Pompeya (10,02%), Sauzalito (5,39%) y Miraflores (4,64%), siendo la primera la única localidad que superó levemente la estimación de la prevalencia inicial estimada del 10%. El Dpto. Gral Güemes demostró una prevalencia intrapredial global de 4,19% (tabla 13).





**Figura 14. Prevalencias intraprediales halladas en las localidades de El Espinillo, Miraflores, Fuerte Esperanza, Nueva Pompeya y Sauzalito del Departamento Gral. Güemes, Chaco y clasificación según escala propuesta por Robles *et al.* (2014)**

### 3.3.2. Factores de riesgo epidemiológico para la presentación de brucelosis en cabras

Dentro de las variables consignadas en las encuestas y nombradas previamente, se identificaron aquellas que mostraron un comportamiento uniforme en las respuestas y posibilitaron la caracterización de la producción caprina en la región del Impenetrable chaqueño. La presencia de montes y animales silvestres es común en toda la región. La producción se destaca por ser de tipo extensiva y con hábitos de transhumancia. La aptitud del ganado es carnífera. No se encontraron antecedentes de laboratorio referidos a diagnóstico de brucelosis caprina. Las aguadas no cumplían con las normas de potabilidad ya que la mayoría son a partir de aguas naturales en muchos casos, estancadas, barrosas (figura 15). Los problemas de alimentación insuficiente, cohabitación y contacto con otros animales domésticos también fueron variables de comportamiento homogéneo.



**Figura 15. Potencial factor de riesgo: agua de bebida no potable, estancada y barrosa**

Las variables que pudieron ser analizadas estadísticamente para determinar si se trataban de potenciales factores de riesgo o protección se presentan en la tabla 14.

**Tabla 14. Variables analizadas estadísticamente a partir de encuestas realizadas a productores en las localidades de Miraflores, El Espinillo, Fuerte Esperanza, Nueva Pompeya y Sauzalito del Dpto. Gral. Güemes, Chaco para determinar potenciales factores de riesgo o protección en establecimientos caprinos.**

<b>Variables</b>
Tamaño del establecimiento (70 animales)
Abortos
Mastitis
No destrucción de productos de los abortos
Uso de estiércol como abono
Aislamiento de hembras próximas a parir
Presencia de parasitosis
Ingreso de animales nuevos
Procedencia de animales nuevos
Presencia y estado de alambrado perimetral
Existencia de síntomas compatibles con brucelosis en humanos
Diagnóstico serológico confirmatorio en humanos

Para el análisis estadístico de la variable “Tamaño del Establecimiento” se definió un punto de corte de 70 animales para definir si el establecimiento era pequeño ( $\leq$  o 70 animales) o grande ( $\geq$ 70 animales).

En la tabla 15, se presentan los datos de stock mediante estadísticas descriptivas como ser promedio (PRO), moda (MO) y mínimos (MIN) y máximos (MAX) según las categorías consignadas en la encuesta.

**Tabla 15. Stock según categorización de establecimientos en las localidades de Miraflores, El Espinillo, Fuerte Esperanza, Nueva Pompeya y Sauzalito del Dpto. Gral. Güemes, Chaco**

<b>Variable</b>	<b>PRO</b>	<b>MO</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>
Stock de machos adultos	3,79	2	1	40
Stock de machos reposición	3,65	1	1	10
Stock machos cabritos	11,39	5	1	100
Stock de hembras adultas	58,35	30	9	400
Stock de hembras reposición	14,58	10	2	80
Stock de hembras cabritos	14,65	10	1	150

Como se puede apreciar, en cualquier categoría las cantidades de hembras declaradas son superiores a las de machos, resultado esperable teniendo en cuenta la relación de cantidad de hembras vs. machos en un establecimiento de cría.

La presencia/ausencia de cada uno de los potenciales factores de riesgo evaluados fue relacionada con los resultados serológicos de los sueros caprinos en cada explotación y los valores de OR y  $X^2$ , con un nivel de significancia de  $\alpha$ : 0,05, fueron los siguientes:

**Tabla 16. Resultados de OR y X<sup>2</sup> de variables analizadas en 317 encuestas provenientes de las localidades de Miraflores, El Espinillo, Fuerte Esperanza, Nueva Pompeya y Sauzalito del Dpto. Gral. Güemes, Chaco**

VARIABLE	OR	IC 95%	X <sup>2</sup>	p- valor
Existencia de abortos	3.27	1.11-9.57	4.30*	0.038
Tamaño establecimiento (70)	1.17	0.71-1.91	0.40	0.52
Presencia de Mastitis	1.69	0.78-3.68	1.81	0.17
No destrucción de placentas postaborto	1.66	0.38-1.15	2.15	0.14
Acceso de perros y gatos	1.66	0.38-1.15	2.15	0.14
Uso de estiércol como abono	1.17	0.64-2.16	0.28	0.59
Aislamiento de hembras próximas a parir	0.38	0.23-0.63	14.42*	0.00014
Problemas de parasitosis	1.97	1.07-3.64	4.9*	0.026
Ingreso de animales nuevos	0.47	0.28-0.79	8.14*	0.0043
Presencia de alambrado	0.50	0.28-0.86	6.17*	0.012
Familias con sintomatología compatible con brucelosis	1.47	0.85-2.55	1.97	0.16
Familias con serología positiva a brucelosis	1.99	1.10-3.59	5.38*	0.020

*\*indica significancia estadística*

Teniendo en cuenta el análisis de OR propuesto por Tamargo Barbeito *et al.* (2019), cuando los valores de OR superan el valor de 1 y los límites inferior o superior del IC también superen la unidad, la variable analizada actúa como factor de riesgo. En caso que el OR se posicione por debajo de la unidad, la variable en análisis actuaría como factor de

protección siempre y cuando los límites del IC no superen al 1. En el caso que OR resulte igual a 1, esto indica que no existe asociación entre las variables analizadas.

De acuerdo a los resultados expuestos en la tabla 16, las variables: existencia de abortos (figura 16), tamaño del establecimiento, mastitis, no destrucción de productos de abortos y consecuente acceso de perros y gatos (figura 17), uso de estiércol como abono, parasitosis y familias con resultados de laboratorio positivos actuarían como posibles factores de riesgo. Las variables aislamiento de hembras próximas a parir, ingreso de animales nuevos al establecimiento y presencia de alambrado perimetral actuarían como posibles factores de protección.



**Figura 16. Hallazgo, en corral, de restos placentarios por aborto de hembra caprina de 1 año de edad en la localidad de Miraflores del Dpto. General Güemes Chaco**



**Figura 17. Potencial factor de riesgo: acceso de perros domésticos a feto abortado en la localidad de Miraflores del Dpto. Gral. Güemes-Chaco.**

Se detectó existencia de significancia estadística en las variables: presencia de abortos, aislamiento de hembras próximas a parir, problemas de parasitosis, ingreso de animales nuevos, presencia de alambrados y familias con diagnóstico serológico positivo a brucelosis mediante la técnica de Huddleson, lo cual refuerza su categorización como posibles factores de riesgo o protección en cada caso en particular.

### **3.4. Determinar las cepas de *Brucella melitensis* actuantes en hatos infectados del NEA.**

Los resultados obtenidos a partir del cultivo de muestras clínicas de cabras seropositivas y/o sintomáticas a brucelosis se muestran en la tabla 17.

**Tabla 17. Resultados de cultivos bacteriológicos de muestras de hisopados vaginales y sangre anticoagulada de caprinos seropositivos y/o sintomáticos de brucelosis pertenecientes a tres establecimientos de la localidad de Miraflores-Dpto. Gral Güemes, Chaco.**

Productor	Total de animales muestreados por establecimiento (n)	Total de resultados de BPA (+) y FPA (+) sobre el total de animales muestreados*	Total de resultados de FC (+) sobre el total de animales muestreados**	Origen de la muestra y cultivos bacteriológicos (+) obtenidos compatibles con <i>Brucella sp</i> ***
1	70	37	46	1 Hisopado vaginal (+) 3 muestras de sangre (+)
2	42	5	9	2 Hisopados vaginales (+)
3	84	6	12	2 muestras de sangre (+)

\*técnica diagnóstica desarrollada en las instalaciones del Laboratorio de Sanidad Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNNE

\*\* técnica diagnóstica fue realizada en ANLIS Dr. C.G. Malbrán

\*\*\*técnica diagnóstica fue realizada en el laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC

En las placas de cultivo se observó el desarrollo de colonias pequeñas con una longitud de entre 0,6 a 1,5 micrones, translúcidas, de bordes lisos e inmóviles y negativas a la técnica de Gram. No se observó coloración bipolar, no presentaron cápsula ni formación de esporas y resultaron positivas a la coloración de Köster teñidas de rojo anarajando sobre fondo azul.

En seis (6) de los animales cuyas muestras clínicas resultaron positivas al cultivo, hubo manifestación previa de anticuerpos circulantes según la prueba de BPA y FPA, mientras que en uno de ellos - una cabra que había abortado en los días previos al muestreo y de la que se tomaron muestras de hisopado vaginal y leche - la serología fue negativa.

La tipificación bacteriológica de las cepas obtenidas permitió determinar que se trataba de *B. melitensis* biovar 1.

En cuanto a los resultados de la tipificación, los mismos fueron contrastados con los registrados para la cepa *B. melitensis* 16M, que corresponden al biovar 1 (Alton, 1990; OIE, 2016). Los resultados pueden observarse en la tabla 18.



**Tabla 18. Resultados de tipificación tradicional de cultivos bacteriológicos de colonias obtenidas de cabras seropositivas y/o sintomáticas de brucelosis pertenecientes a tres establecimientos de la localidad de Miraflores-Dpto. Gral Güemes, Chaco. A. Características de crecimiento frente a CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S y en medios de cultivo enriquecidos. B. Características de Aglutinación y Fagotipificación**

**A**

Crecimiento en medio de cultivo con:									
CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	Tionina	Fucsina básica	Safranina O	Pironina	Verde de malaquita	Penicilina	Estreptomicina	Ureasa
(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)

**B**

Aglutinación*			Lisis de fagos		
A	M	R	Tb	Wb	RC
(-)	(+)	(-)	(-)	(+/-)	(-)

\*A: suero monoespecífico anti-*B. abortus*; M: suero monoespecífico anti-*B. melitensis*; suero anti *Brucella R*

En cuanto al requerimiento de CO<sub>2</sub>, las colonias no se desarrollaron en los medios con atmósfera controlada. Respecto al S<sub>2</sub>H, el resultado obtenido consistió en comparar el ennegrecimiento producido por el sulfuro de plomo con el de las cepas patrones.

En el caso de la prueba de la ureasa, la misma se considera positiva cuando el color del indicador cambia al color púrpura

La fagotipificación su resultado se expresó como la concentración más baja de fago que produce lisis completa en su cepa de propagación.

## IV. DISCUSIÓN

A continuación se presentan las discusiones generadas de acuerdo a los objetivos planteados inicialmente.

### **4.1. Evaluación de técnicas serológicas para medir y discriminar anticuerpos en sangre en animales infectados naturalmente**

Las pruebas serológicas evaluadas con muestras de caprinos no vacunados provenientes de la región del Impenetrable chaqueño, manifestaron desempeños coherentes con lo reportado previamente (Nielsen *et al.*, 2005 a, b; Cisterna *et al.*, 2015; Robles *et al.*, 2020).

Si bien el cultivo bacteriológico es considerado la técnica “*Gold Standard*” en el diagnóstico de brucelosis (OIE, 2016), en este estudio se recurrió a la utilización de la prueba de FC como prueba patrón debido a que es la técnica confirmatoria de referencia internacional, aprobada para su uso en pequeños rumiantes y para el comercio internacional (Nicola *et al.*, 2019; OIE, 2016; Blasco y Molina Flores, 2011; Cisterna *et al.*, 2015).

La técnica de BPA demostró una *Se* de 100% y *Es* de 77%, lo cual difiere en parte a lo propuesto por Cisterna *et al.* (2015) quienes tuvieron valores de *Se* y *Es* de 98,03% y 96,84% respectivamente, al contrastar los sueros de caprinos no vacunados con la técnica de FC. Sin embargo en ambos casos, se puede apreciar la elevada *Se*, lo cual valida su implementación como prueba diagnóstica tamiz o de screening (Nicola *et al.*, 2019; OIE, 2016; Cisterna *et al.*, 2015; Nielsen, 2002). La baja *Es* respecto a FC obtenida en el presente trabajo, podría deberse a reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas y con anticuerpos vacunales, cosa que se descarta en este último caso debido a que las muestras provenían de establecimientos donde no se aplica REV-1 (Nicola *et al.*, 2019; Nielsen 2002; OIE, 2016).

La técnica de ELISAi, fue de las tres técnicas utilizadas la que mostró el mejor desempeño con una de *Se* 98,5%, una *Es* de 93,3% y un IP de 191,8. Estos resultados son similares con reportes previos de Nielsen *et al.* (2005a) quienes obtuvieron un IP de 195,9, Nielsen *et al.* (2005b) IP 193,6 y Nielsen *et al.* (2004), IP 197,4. Si bien se recomienda su utilización como una técnica de screening por su elevada *Se* (OIE, 2016; Nicola *et al.*,

2019; Nielsen *et al.*, 2005a; Ramírez-Pfeiffer *et al.*, 2007); en el presente trabajo la alta *Es* demostrada por esta técnica habilita la posibilidad de utilizar esta técnica como diagnóstico serológico único (screening y confirmatoria) para la brucelosis caprina. La excelente concordancia hallada respecto a la técnica de FC (índice kappa 0,880) podría también deberse a la capacidad de ambas pruebas de identificar animales con infecciones crónicas donde predominan las IgG (Díaz-Aparicio *et al.* 1994). Otro factor que puede haber influido en la buena performance de la técnica es que la misma fue desarrollada en nuestro país y estandarizada con una colección de sueros positivos y negativos locales que se ajustan a la realidad epidemiológica de Argentina (Segovia *et al.*, 2000; Robles *et al.*, 2020).

La técnica de FPA demostró un IP 187,4 y una *Se* 98,5%, sin embargo el 88,9% de *Es* no fue lo esperado teniendo en cuenta lo reportado previamente por otros autores. Minas *et al.* (2005), analizaron la técnica de FPA vs. FC y tuvieron un IP de 194,68 (*Se* 95,7% y *Es* 98,9%); Nielsen *et al.* (2004) obtuvieron 192,5 (*Se* 92,7% y *Es* 99,8%); Nielsen *et al.* (2005b) lograron un IP de 187,6 (*Se* 88,7% y *Es* 98,9%); y Cisterna *et al.* (2015) obtuvieron un IP de 177,62 (*Se* 87,44% *Es* 90,18%). La elevada *Es* (superior a 90%) en todos los estudios previos, justifica su aplicación como técnica confirmatoria (Nicola *et al.*, 2019). Sin embargo, en las condiciones en las que se evaluó esta técnica en este estudio la *Es* fue baja. A raíz de esto, se realizó un ejercicio subiendo el punto de corte de 85mP a 90mP (datos no mostrados) con el objeto de mejorar la *Es*, sin embargo se obtuvo un aumento de 2 puntos de la *Es* (88,9% vs. 91,9%) con un detrimento notable de la sensibilidad (*Se* 98,5% vs. 90,3%) que hizo inviable el resultado del ejercicio.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren la necesidad de re estandarizar esta técnica en Argentina para su uso en caprinos a partir de evaluar si la dilución de los sueros (1:40) es la correcta, si la producción y concentración del antígeno es la adecuada, etc. tal como lo sugieren Robles *et al.* (2020), a fin de poder mejorar su aplicabilidad como prueba confirmatoria.

La técnica de FC por su complejidad no es un diagnóstico de rutina en laboratorios convencionales, lo cual motiva la implementación de nuevas técnicas como el ELISAI y el

FPA que brindan resultados rápidos, permiten el diagnóstico en masa y pueden ser desarrollados de manera rutinaria como fue demostrado en este estudio.

#### **4.2. Estudio de la respuesta inmune humoral de la vacuna *Brucella melitensis* REV-1 en cabras utilizando diferentes vías de administración**

La vacuna *B. melitensis* REV-1, generó una excelente respuesta inmunológica humoral en los animales inoculados por las vías conjuntival y subcutánea, evidenciada a través de resultados positivos a partir del día 7 y picos máximos de producción de anticuerpos en la segunda semana posvacunación, semejante a lo descrito por Alton (1990), Fensterbank *et al.* (1987), Giraudo *et al.* (2009); Robles *et al.* (2020). Esta respuesta pudo ser medida a través de técnicas diagnósticas como ELISAs y FPA, debido a la estimulación de la producción de anticuerpos específicos contra el LPS vacunal (Estein, 2006; Schuring *et al.*, 2002; Nicoletti, 1990). Los animales del grupo testigo permanecieron negativos durante los 365 días de ensayo para las técnicas de ELISAb y ELISAi, mientras que la prueba de FPA detectó resultados positivos en el grupo testigo los días 300 y 365.

Las respuestas inmunes generadas post inoculación variaron según la vía de administración de la vacuna.

La vía subcutánea demostró un comportamiento similar con todas las técnicas serológicas evaluadas. Esta ruta de administración manifestó un aumento brusco del título de anticuerpos (día 0 a 35 post inoculación) para luego descender paulatinamente (42-365 días), similar a lo reportado por Muñoz *et al.* (2008) y Jiménez de Bagües *et al.* (1992) quienes afirman que la inoculación de REV-1 vía subcutánea produce una infección controlada generalizada durante el primer mes postvacunación provocando una respuesta inmune de mayor intensidad. Resultados similares a los obtenidos en este ensayo, fueron hallados en Argentina por Robles *et al.* (2000) en caprinos criollos, sin embargo, en un ensayo llevado a cabo por Giraudo *et al.* (2009), ambas vías de inoculación (subcutánea y conjuntival) tuvieron igual comportamiento de la respuesta inmune en los animales jóvenes vacunados sin diferenciación de la vía de inoculación utilizando la misma vacuna y dosis de inoculación.

La vía conjuntival generó una respuesta inmune con un pico de anticuerpos de menor intensidad que la inoculación subcutánea (día 7 a 28 postinoculación). Esta respuesta inmunológica se explica por el comportamiento de la cepa REV-1 administrada por vía conjuntival, en la que invade la mucosa ocular estimulando el desarrollo de una respuesta inmunitaria local y luego sistémica de menor intensidad (Fariñas Guerrero, 2015; Fensterbank *et al.*, 1987; Robles, 2009; Muñoz *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2018).

Todas las técnicas serológicas utilizadas en este ensayo detectaron la presencia de anticuerpos postvacunales de manera temprana entre los 7 y 15 días post inoculación similar a los descrito por Robles *et al.* (2020). Las curvas de anticuerpos según las técnicas de ELISAi y FPA tuvieron un comportamiento similar entre ellas, con diferencias evidentes según la vía de inoculación. En el ELISAb ambos grupos vacunados tuvieron una respuesta inmune semejante, sin diferencias marcadas según la vía de administración.

Contrariamente a lo esperado, la curva de anticuerpos debería haber comenzado a descender a partir del pico máximo inicial (figuras 7B, 8, 9, 10 y 11), sin embargo se produjo un pico inesperado de anticuerpos alrededor del día 150 post vacunación. En el caso de los machos de los tres grupos, se detectó una elevación de los títulos de anticuerpos el día 150 con las tres técnicas serológicas, y en el caso de las hembras, a partir del día 150 hasta el día 270 postvacunación con el ELISAb.

No se encontró en la bibliografía una situación semejante así como tampoco una explicación técnica a este fenómeno. Se podría discutir que algún componente de la vacuna anticlostridial que se aplicó a los 150 días postinoculación con *B. melitensis* REV-1, haya generado una interferencia con la respuesta de la cepa REV-1. Otra opción que se podría discutir es la posible contaminación de la jeringa dosificadora automática utilizada para aplicar la vacuna anticlostridial, que haya sido utilizada previamente para aplicar la vacuna anual de *B. abortus* cepa C19 a las terneras del establecimiento. Esta última situación ha sido descrita en bovinos por Aguirre *et al.* (2009).

En la técnica de ELISAi, las curvas de anticuerpos evidencian, polarización entre los animales vacunados y testigos a lo largo del tiempo. El desempeño de esta técnica para detectar rápidamente la respuesta inmune postvacunal fue similar a lo reportado por otros autores (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1992; Robles *et al.*, 2020). El comportamiento de las

curvas en este ensayo conciden con lo reportado por Nielsen *et al.*, (2004) para esta técnica demostrando una detección marcada de animales vacunados al momento del pico máximo para posteriormente negativizarse a partir del día 90 postvacunación, sin elevaciones evidentes por encima del punto de corte establecido de 30PP (Robles *et al.*, 2020).

Particularmente en esta técnica hubo certeza de negativización de animales vacunados a partir del día 90 y hasta el día 365 posvacunación y una interferencia serológica moderada luego de inoculada REV-1, coincidente con lo reportado (Díaz-Aparicio *et al.*, 1994; Garin-Bastuji *et al.*, 2006; Robles *et al.*, 2020). Tanto machos como hembras lograron a partir del día 90 valores menores a 30PP. El comportamiento detectado en los machos es semejante a lo descrito por Muñoz *et al.* (2008), sin embargo Robles *et al.* (2020), destacan serología positiva en animales machos hasta el día 360 postvacunación. Por ello y teniendo en cuenta lo establecido en la Resol. 372/2017 (SENASA), cabritos, corderos, capones y machos reproductores no deben ser vacunados, siendo la recomendación vacunar hembras jóvenes y adultas no preñadas en las campañas de vacunación.

De acuerdo con el desempeño demostrado en este ensayo, el ELISAI podría ser utilizada como prueba diagnóstica tamiz cuando no se cuente con diagnósticos de aglutinación o confirmatoria en pruebas en serie, o como prueba única reforzando lo propuesto por Robles *et al.* (2014) y Nicola *et al.* (2019).

Parte de la buena performance de este ELISA reside en que el punto de corte de 30PP utilizado para el ELISAI llevado a cabo en este ensayo, sí fue validado/establecido con sueros provenientes de caprinos de Argentina (Robles *et al.*, 2020), lo que podría determinar la mejor performance de este diagnóstico en las condiciones evaluadas.

En la técnica de ELISAb, las curvas obtenidas manifiestan una polarización marcada, con un agrupamiento de los animales vacunados por ambas vías, separados de los del grupo testigo. Es válido destacar que en el presente ensayo se utilizó un kit comercial (Brucella Compac 2.0 Ingenasa S.A.<sup>TM</sup>), cuyas especificaciones técnicas sugieren no utilizarla en sueros de caprinos vacunados. La marcada polarización obtenida entre animales vacunados y testigos utilizando el punto de corte sugerido por el fabricante (40PI),

permite plantear a futuro la posibilidad de evaluar su desempeño en animales sin vacunación con REV-1, a fin de poder analizar su utilización como prueba confirmatoria (García-Bocanegra *et al.*, 2014; OIE, 2016). Sin embargo la incapacidad de la prueba de poder definir el final del periodo de interferencia inmunológica postvacunal refuerzan la necesidad de continuar trabajando con esta técnica haciendo ajustes para optimizar sus resultados y así poder agregar un ELISAb a la lista de diagnósticos disponibles para brucelosis caprina en Argentina.

El desempeño de la técnica de FPA en este ensayo, utilizando el punto de corte de 85mP (Nicola *et al.*, 2019) demostró una correcta polarización entre los animales vacunados y los del grupo testigo sólo hasta el día 63. A partir de allí los resultados fueron inconsistentes lo cual se manifestó con aumentos y disminuciones de los valores de mP sobre el punto de corte hasta el final del ensayo.

Nielsen *et al.* (2005b) intentó establecer un punto de corte universal para la utilización de esta técnica según la especie animal, sin resultados satisfactorios, y recomienda la utilización del FPA como una técnica de screening o confirmatoria, modificando el punto de corte para elevar la sensibilidad o especificidad según la situación epidemiológica, sin embargo en este estudio se hizo un prueba para cambiar el punto de corte para mejorar la *Es* sin resultados satisfactorios.

La duración de la interferencia vacunal para la técnica de FPA vía conjuntival y subcutánea fue de 210 días, superior a lo expuesto por Robles *et al.* (2020) quien evaluó la vacuna REV-1 vía conjuntival y subcutánea en la región Patagónica en caprinos criollos y determinó la negatividad de los animales vacunados por vía conjuntival a los 180 días y a los 360 días para la vacunación subcutánea. Arregui *et al.* (2014), determinaron seronegatividad de los animales vacunados con REV-1 a los 240 días posvacunación.

La curva de anticuerpos del FPA en los machos fue más elevada así como los desvíos estándar más marcados que en las hembras, esta reacción podría deberse a un exceso en la producción de anticuerpos posvacunales, tal como es reportado por Larsen *et al.* (2018), que afirma que en un población vacunada el 5-8% produce alto título de anticuerpos, o también por posible colonización de REV-1 en órganos reproductivos de los

machos (Robles *et al.*, 2020). Si bien son escasos los reportes de lesiones testiculares o infertilidad producidos por vacunación con REV-1 (Muñoz *et al.*, 2008), en 1980, Tolari y Salvi informaron sobre un caso de orquitis bilateral producida por REV-1 en un macho caprino de 5 meses de edad.

Dada la pobre performance y problemas de interferencia prolongada con los anticuerpos vacunales y grupo testigo en este estudio, para la utilización como prueba complementaria o confirmatoria en caprinos (Nicola *et al.*, 2019), la OIE (2016) se debería proceder a realizar una correcta validación y ajuste del punto de corte de la prueba según los escenarios epidemiológicos de la región que incluyen la revisión de las condiciones de ejecución de la técnica como pueden ser cambios en la dilución de los sueros problemas o en la producción y dilución del antígeno y posterior adaptación del punto de corte con colecciones de sueros positivos con el respaldo de aislamiento de *B. melitensis* y de sueros negativos provenientes de áreas libres de la enfermedad (Robles *et al.*, 2020).

#### **4.3. Determinación de la prevalencia de brucelosis caprina y los factores de riesgo asociados a la presencia de la enfermedad en la provincia del Chaco.**

En este estudio se demostró la presencia de brucelosis caprina en proporciones variables en las localidades de El Espinillo, Miraflores, Fuerte Esperanza, Nueva Pompeya y Sauzalito del Dpto. Gral Güemes de la provincia del Chaco así como también fue posible investigar los potenciales factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de la enfermedad.

Los muestreos realizados superaron el esquema original planteado ya que se sugería visitar 323 establecimientos, y se visitaron 342. Respecto a la cantidad de animales participantes, se propuso muestrear 3356, y se tomaron muestras de 5168 caprinos. Ello otorgó mayor fortaleza a los resultados de prevalencia hallados.

El criterio de diagnóstico de laboratorio aplicado, de BPA como prueba tamiz y FPA como prueba confirmatoria (Nicola *et al.*, 2019, Robles *et al.*, 2014), favoreció la uniformidad de los resultados obtenidos en las localidades visitadas como lo sugieren Robles *et al.* (2014) y Mohamed *et al.* (2018).



Las prevalencias interprediales (figura 13) de las localidades de Miraflores (27,54%), Nueva Pompeya (54,5%) y Sauzalito (44,62%) son altas según la escala propuesta por Robles *et al.* (2014), quienes consideran una prevalencia interpredial elevada aquella que supera el 10% de establecimientos positivos, prevalencia media entre un 5-10% de establecimientos positivos - como lo hallado en la localidad de Fuerte Esperanza (7,69%) - y prevalencia baja cuando la cantidad de establecimientos positivos es menor a 5% como lo ocurrido en El Espinillo (1,56%). De acuerdo a estos datos el Dpto. Gral Güemes se posicionaría como una región con una prevalencia promedio interpredial elevada (26,61%), lo cual replantea la categorización propuesta en el 2014 por Robles *et al.* donde el Dpto. Gral Güemes conjuntamente con el Dpto. Almirante Brown en la provincia del Chaco, eran consideradas regiones de baja o media prevalencia.

A nivel intrapredial (figura 14), las prevalencias promedio de Miraflores (4,64%), Nueva Pompeya (10,02%) y Sauzalito (5,39%) fueron altas, superando el 2,5% de la escala propuesta por Robles *et al.* (2014). El Espinillo (0,21%) y Fuerte Esperanza (0,77%), siguiendo esta misma escala de valores, presentan prevalencias bajas.

La distribución de la enfermedad fue heterogénea en estas localidades chaqueñas (figura 12), coincidiendo estos resultados con lo reportado por Russo *et al.* (2016) en la vecina provincia de Formosa. Las elevadas prevalencias inter e intraprediales halladas en las localidades de Nueva Pompeya y Sauzalito, podrían deberse a que éstas constituyen una región endémica que trasciende los límites geográficos por su cercanía con la provincia de Formosa (Russo *et al.*, 2016), sumado a la existencia de animales silvestres, hábitos de transhumancia y bajo nivel de tecnificación de alambrados que complican el control de movimiento de los animales. En estudios previos de similares características, Robles *et al.* (2014), Russo *et al.* (2016) y Martínez *et al.* (2018) reportan la presencia de hatos positivos en los Dptos. de Patiño, Bermejo y Maticos, los cuales están ubicados en las zonas centro y oeste de la provincia de Formosa, región limítrofe con el Dpto. Güemes en la provincia del Chaco. La proporción de majadas positivas fue de entre 12 y 36% para las mencionadas regiones (Russo *et al.*, 2016), mientras que en el estudio reportado por Martínez *et al.* (2018), la prevalencia interpredial fue del 40,9%. La información lograda de esta zona de la provincia del Chaco y la aportada por Russo *et al.* (2016) de la provincia de Formosa,

permiten inferir que se trataría de un área epidemiológica homogénea respecto a la Brucelosis caprina y por ende, sería deseable que las medidas de control que se implementen a futuro se tomen para todo el área y de común acuerdo entre las provincias involucradas.

En la región del NEA nunca se vacunó con *B. melitensis* REV-1, sin embargo la Resol. 372/17 de SENASA contempla la incorporación de la vacuna previo relevamiento seroepidemiológico de una región a fin de establecer estrategias de control adecuadas según resultados obtenidos. Por lo antes expuesto es necesario ampliar los muestreos en las localidades pendientes del departamento así como también verificar el estado sanitario en los departamentos restantes de la provincia del Chaco (Robles *et al.*, 2014), a fin de poder definir la o las posibles estrategias de control de la enfermedad en la totalidad de la provincia.

Es indispensable caracterizar los sistemas de cría predominantes de la zona, así como también contar con suficiente cantidad de profesionales veterinarios que colaboren en el control de la enfermedad (Robles *et al.*, 2014, OIE, 2016). La actividad caprina generalmente está a cargo de pequeños productores y comunidades aborígenes; se caracteriza por ser de tipo extensivo con poca o nula tecnificación como ser la implementación de alambrado perimetral e instalaciones adecuadas para el manejo del ganado (Robles *et al.*, 2007), tal como lo revelado por las encuestas y visitas a establecimientos agropecuarios. Por ello es importante el rol del estado provincial, como organismo ordenador de todas las actividades de sanidad animal como de salud pública en pos del control de la enfermedad.

De acuerdo a Robles *et al.* (2014) y Robles y Martínez (2018) la distribución de la enfermedad en la Argentina es heterogénea, donde se destacan regiones de alta, media y baja prevalencia, y regiones libres de la enfermedad como la Patagonia (Resol. N°857-E-2017 (SENASA). Mendoza, La Rioja, Catamarca, sur de San Juan y este de Salta son regiones de alta prevalencia y que aplican o han aplicado la vacunación estratégica con *B. melitensis* REV-1. Sin embargo en las regiones oeste de Chaco y Formosa, aun siendo detectadas como regiones endémicas de la enfermedad (Robles y Martínez, 2018; Martínez

*et al.*, 2018; Russo *et al.*, 2016, Robles *et al.*, 2014), la implementación de la vacuna como herramienta de control aún no ha sido incorporada para los hatos caprinos de la región.

En regiones de prevalencia elevada, Robles *et al.* (2014) proponen la vacunación masiva selectiva de todo el hato con *B. melitensis* REV-1 vía conjuntival a dosis completa (OIE, 2016), exceptuando las hembras preñadas y machos todos los años o año por medio hasta alcanzar una prevalencia del 1%.

En el caso de lograr alcanzar valores de prevalencia menores al 1% se podrían plantear nuevas estrategias enfocadas a la erradicación de la enfermedad.

Paralelamente, Russo *et al.* (2016) propone implementar medidas de control y erradicación de la enfermedad en la región endémica del NEA las cuales deberían ser aplicadas en forma conjunta por las provincias involucradas.

Mediante el análisis de las encuestas realizadas a los pequeños productores en las localidades del Dpto. Gral Güemes, se pudo determinar que la actividad caprinería en la provincia de Chaco es llevada a cabo por pequeños productores en su mayoría quienes utilizan la producción caprina principalmente para autoconsumo, lo cual coincide con reportes previos (Robles *et al.*, 2007; Ministerio de Agricultura de la Nación, 2011).

En la región visitada y de acuerdo a los datos recopilados por las encuestas epidemiológicas realizadas durante este estudio, la raza predominante es la cabra criolla y Anglo Nubian. La producción ganadera consiste en una explotación extensiva de los recursos naturales existentes con mínimo grado de tecnificación, lo cual se traduce en hábitos de transhumancia, pastoreo de diferentes majadas en lotes comunes, ausencia de controles sanitarios, intercambio de reproductores, ordeño manual, que constituyen potenciales factores de riesgo para la diseminación de la enfermedad, similar a lo descrito por Rossetti *et al.* (2018) y a descrito a nivel mundial sobre todo en la región Mediterránea, norte y este de África, Asia Central, México y centro y sur de América (Seleem *et al.*, 2010).

La presencia de abortos constituyó el potencial factor de riesgo con los valores de OR y  $X^2$  más elevados (OR=3,27  $X^2=4,30$ ), lo cual coincide con otros autores quienes reportan que la presencia de este factor constituye una fuente de infección por excelencia en la transmisión de la enfermedad. (Alton, 1990, Robles, 2009; Mohamed *et al.*, 2018;

Solorio-Rivera *et al.*, 2007; Crespo León, 1994). Si bien los abortos podrían tener otros orígenes, como ser alimentación deficiente durante la gestación, situaciones de estrés, así como otras enfermedades infecciosas (toxoplasmosis) tal como lo sugieren Rossetti *et al.* (2018) y Mohamed *et al.* (2018), los valores de OR y  $X^2$  obtenidos en el presente trabajo demuestran que en las condiciones evaluadas la manifestación clínica de este trastorno reproductivo estaría relacionada con una mayor circulación de *B. melitensis* en los hatos caprinos. Cabe destacar que el escaso control de nacimientos y abortos por parte de los productores así como la presencia de predadores en la zona, pueden afectar en menos el verdadero valor de este factor de riesgo.

El tamaño del hato, demostró actuar como un posible factor de riesgo para la diseminación de la enfermedad, similar a lo reportado previamente por Mohamed *et al.* (2018), Solorio-Rivera *et al.* (2007), Radostits *et al.* (2000) quienes describen que en los rodeos grandes, las probabilidades de encontrar al menos un animal positivo son más elevadas y atribuyen estas posibilidades a una mayor tasa de contacto entre los animales.

La presencia de mastitis también reveló actuar como un posible factor de riesgo para la existencia de brucelosis (OR=1,69 y  $X^2= 1,81$ ). La infección persistente de la ubre y ganglios linfáticos supramamarios genera excreción de bacterias al medio y su consecuente transmisión (Cohelo *et al.*, 2014), por lo que la existencia de esta patología en el rodeo actuaría como un indicador de la enfermedad. Sin embargo los productores de la región, según la información que se pudo recabar en el trabajo de campo, saben reconocer esta afección debido a que genera inconvenientes durante la lactancia de los cabritos. Sin embargo hay una subestimación del problema de la brucelosis como causante de la patología porque muchas veces asumen que la enfermedad tiene un origen parasitario - debido a infestaciones de la glándula mamaria con ectoparásitos del género *Tunga* spp. - y no infeccioso, lo que demuestra la necesidad de insistir en educación para la salud con este grupo de personas.

La práctica de no destrucción de productos del aborto (OR=1,66  $X^2=2,15$ ) y consecuente acceso de animales domésticos a estos productos, demostraron actuar como factores de riesgo para la diseminación de la enfermedad. Estos resultados coinciden con lo reportado por Mohamed *et al.* (2018) quienes tuvieron resultados similares para el factor de

riesgo descarte de productos del aborto. El consumo de estos desechos por parte de otros animales domésticos (perros y gatos) y silvestres (pumas, cerdos salvajes entre otros) favorece el contagio de otras especies animales así como la contaminación del ambiente, pastos y aguadas principalmente (Díaz-Aparicio, 2013; Mikolon *et al.*, 1998; Kabagambe *et al.*, 2001).

La utilización de estiércol como abono representa un posible factor de riesgo en las condiciones evaluadas en el presente trabajo (OR=1,17  $X^2=0,28$ ). De acuerdo con Moreno (1976), la *Brucella* puede sobrevivir en el abono por un periodo de tiempo prolongado, siempre que predominen las temperaturas bajas, elevada humedad y ausencia de fermentaciones (Díaz-Aparicio, 2013). Por otra parte, en los establecimientos visitados y que consignaron utilizar el abono, el mismo proviene de los corrales de parición, donde no son habituales las prácticas de limpieza y desinfección, lo cual eleva aún más las chances de infección.

En cuanto al aislamiento de las hembras próximas a parir, si bien esta práctica demostró ser un factor de protección frente a la enfermedad (OR=0,38  $X^2=14,42$ ) las respuestas de los productores encuestados en el presente trabajo demostraron que esta variable no es acompañada por el criterio sanitario de protección de las hembras, sino para evitar pérdidas de cabras y cabritos nacidos en el monte que luego son depredados por la fauna salvaje predominante.

La concomitancia con otras enfermedades que debiliten el sistema inmune pueden predisponer la infección con *B. melitensis* (Robles, 2009), es probable que por ello la presencia de parasitosis haya resultado como un potencial factor de riesgo en el presente análisis (OR=1,97 y  $X^2=4,9$ ), pero debido a que los datos sólo fueron contrastados mediante serología diagnóstica para brucelosis, estos resultados deberían ser corroborados a futuro mediante un diagnóstico coprológico cuantitativo. Por otra parte los productores sólo identifican las ectoparasitosis, sin registro alguno de parasitosis internas por desconocimiento de estas patologías.

En el presente trabajo, la variable ingreso de animales nuevos a los establecimientos actuó como un potencial factor de protección (OR=0,47 y  $X^2=8,14$ ). Esta información es contradictoria ya que la forma que tienen la brucelosis caprina de ingresar a un

establecimiento sano, es a través del ingreso de animales infectados (Robles, 2009; Kabagambe *et al.*, 2001). En este caso, los productores en su mayoría recurren a los centros productivos dependientes del gobierno chaqueño para adquirir nuevos reproductores con el objeto de obtener mejoras genéticas así como también evitar problemas de consanguinidad en el hato. En estos centros los controles sanitarios son frecuentes, lo cual se traduce en incorporación de animales de sanidad conocida.

La presencia de alambrado perimetral demostró actuar como posible factor de protección (OR=0,50  $X^2=6,17$ ). Los establecimientos que declararon contar con algún tipo de alambrado, ejercen control sobre el ingreso de la enfermedad, en cambio aquellos productores que no lo poseen generalmente muestran similitudes en cuanto al leve o nulo manejo de la misma. La transhumancia, el compartir pasturas y aguadas con otros animales, representa un potencial factor de riesgo en la transmisión de la enfermedad (Díaz-Aparicio, 2013; Robles, 2009; Cohelo *et al.*, 2014; Reviriego *et al.*, 2000).

En cuanto a la variable sintomatología en humanos (OR= 1,47  $X^2=1,97$ ), los resultados demostraron la existencia de asociación con la brucelosis caprina, por su característica de zoonosis, ya que aquellos productores que declararon tener sintomatología compatible con la enfermedad tienen más probabilidades de que sus cabras estén enfermas con *B. melitensis*. Si bien la sintomatología en humanos es inespecífica y puede ser confundida con un estado gripal (Seleem *et al.*, 2010), los productores encuestados denuncian no concurrir a centros de salud debido a las distancias geográficas entre los centros de atención primaria y los parajes donde viven.

Al igual que en el caso anterior, al analizar la variable diagnóstico serológico en humanos, se evidenció asociación positiva (con valores aún más elevados - OR=1,99 y  $X^2=5,38$ ) con la presencia de brucelosis caprina. Conviene especificar que a partir de las encuestas realizadas, se detectaron establecimientos con diagnóstico positivo a brucelosis en los productores mediante la técnica de Huddleson (Alton, 1990) realizados en los hospitales de las localidades, y sólo dos casos puntualmente consignaron haber sido atendidos y diagnosticados en centros de salud de mayor complejidad en la ciudad de Resistencia, Chaco. En esta zoonosis subdiagnosticada, Rosetti *et al.* (2017; 2018) sugiere multiplicar el número de casos confirmados por 10 a fin de poder estimar la verdadera tasa

de enfermos. Un dato a considerar es que en general las personas que han sido declaradas positivas en las encuestas eran mujeres y/o niños; esta particularidad tiene fundamento cuando se analiza la producción caprinería en el NEA, debido a que las mujeres y niños son los encargados de asistir en las pariciones de las cabras, ayudar en el amamantamiento a los cabritos, ordeño, entre otras funciones.

El desconocimiento de conceptos básicos de la enfermedad como ser síntomas en humanos y animales, formas de contagio, medidas de prevención e higiene entre otros (Robles *et al.*, 2007; Rossetti *et al.*, 2018), constituyen factores de riesgo preponderantes en el control y erradicación de la enfermedad, por lo que se propone considerar como un factor de riesgo el “grado de conocimiento de la enfermedad” en futuras encuestas a realizar.

#### **4.4. Determinación de las cepas de *Brucella melitensis* actuantes en hatos infectados del NEA.**

Los aislamientos de *B. melitensis* biovar 1 a partir de muestras de sangre e hisopados vaginales, junto a la identificación de hatos serológicamente positivos en la localidad de Miraflores y en otros departamentos descritos previamente, ratifican la presencia y endemicidad de brucelosis caprina en la región del oeste chaqueño.

Para lograr una identificación definitiva e inequívoca de *Brucella*, el cultivo bacteriológico es la prueba “*Gold Standard*” (OIE, 2016, 2018; Alton, 1990). La correcta toma de muestras, así como el posterior acondicionamiento y rapidez del envío (dentro de las 48 hs.) para bacteriología fueron determinantes para la obtención de estos resultados, coincidentemente con lo sugerido por OIE (2016; 2018).

De los tres tipos de muestras remitidas para cultivo, sangre anticoagulada, hisopados vaginales y leche, sólo los dos primeros arrojaron resultados positivos. La obtención de cultivos mediante el buffy coat demostró ser una herramienta útil para el diagnóstico bacteriológico (OIE, 2016, 2018). Asimismo, los hisopados vaginales evidenciaron ser una excelente fuente para el aislamiento de *Brucella*, y a su vez su implementación, es menos riesgosa para el personal de campo y de laboratorio a comparación de los productos del aborto (OIE, 2016, 2018).

La ausencia de crecimiento bacteriano en las muestras de leche puede deberse a la utilización de un medio (Brucella Agar - Neogen® Culture Media) no específico para la obtención de la bacteria a partir de dicha muestra. Martínez Herrera *et al.* (2009), realizaron una evaluación comparativa entre diferentes métodos de aislamiento de *B. melitensis* a partir de muestras de leche caprina, demostrando que los medios de cultivo de Farrell y TSA enriquecidos con suero bovino son los ideales para el desarrollo de colonias a partir de este tipo de muestras. Otra de las razones de la ausencia de crecimiento, podría deberse a la incompleta higienización de la ubre al momento de tomar la muestra y consecuente contaminación (OIE, 2016, 2018); la falta de provisión de agua limpia durante los trabajos en los corrales de los establecimientos visitados fue una constante en el trabajo de campo.

El aislamiento de *B. melitensis* a partir de un hisopado vaginal proveniente de una cabra cuya serología fue negativa para las pruebas de FPA y FC ejecutadas como pruebas confirmatoria y de referencia internacional respectivamente (Nicola *et al.*, 2019), podría deberse a una infección reciente (Alton, 1990). Estos resultados coinciden con el hallazgo registrado por Herrera *et al.* (2011), quienes trabajaron en un hato libre de brucelosis y con diagnóstico serológico negativo. En dicho ensayo se aisló *B. melitensis* a partir de una muestra de exudado vaginal proveniente de una cabra que había abortado recientemente. Si bien se desconocen los mecanismos de infecciones latentes producidos por *Brucella* (Blasco y Molina-Flores, 2011), esto también podría considerarse como otra de las razones por las cuales se obtuvo este resultado, asumiendo que la bacteria persistió sin desarrollar una respuesta inmunitaria detectable, transformando en portador silente al animal afectado (Díaz-Aparicio, 2013). En bovinos existen reportes de vacas seronegativas de las cuales se aisló *B. abortus* en muestras de leche (Zowgui y Mohseni, 1990) y en exudados vaginales (Arellano-Reynoso *et al.*, 2012).

La presencia de *B. melitensis* biovar 1 en la región oeste de la provincia del Chaco coincide con los datos reportados por Russo *et al.* (2016) para la provincia de Formosa, así como también con aquellos registros denunciados por Lucero *et al.* (2007) a nivel país para las regiones del NOA, Cuyo y Pampa Húmeda. La región de la Patagonia fue recientemente declarada libre de brucelosis caprina (Resol. N°857/2017-SENASA).



De todas las especies de *Brucella*, *B. melitensis* es la más virulenta para el hombre (Corbel, 2006). Está considerada como una de las zoonosis más comunes y descuidadas (OIE, 2016) a nivel mundial. Al mismo tiempo se asume que las infecciones en humanos están subdiagnosticadas, coincidente con lo recopilado por las encuestas epidemiológicas realizadas durante este trabajo en el apartado “*Sintomatología compatible con brucelosis en humanos*” (Lucero *et al.*, 2007; Rossetti *et al.*, 2017) por su variada sintomatología que puede ser confusa y también porque los diagnósticos no son aplicados de manera rutinaria (Lucero *et al.*, 2007).

Los resultados epidemiológicos obtenidos a través de las técnicas bacteriológicas practicadas en el presente estudio, ponen de manifiesto la necesidad de establecer estrategias de control de la enfermedad en los animales, así como también involucrar a las autoridades sanitarias pertinentes para llevar a cabo un muestreo que permita conocer la situación sanitaria de los pequeños productores que viven en esa zona.

## V. CONCLUSIONES

La vacuna *B. melitensis* produjo una excelente respuesta inmune en los caprinos bajo ensayo, destacándose las ventajas de la vía conjuntival, en el sentido de generar menor interferencia con las técnicas serológicas utilizadas en este estudio.

Con respecto de las técnicas serológicas de ELISAI, ELISAb y FPA, si bien todas detectaron la respuesta vacunal generada por la vacuna *B. melitensis* REV I, demostraron comportamientos diferentes destacándose los buenos resultados del ELISAI y la necesidad de ajustes en la prueba del FPA.

En muestras de sueros caprinos no vacunados provenientes del Impenetrable chaqueño, las técnicas de BPA y ELISAI evidenciaron un desempeño adecuado al ser contrastadas con la técnica de FC, permitiendo una adecuada diferenciación de animales sanos y enfermos. Sin embargo, en las condiciones de estudio, la prueba de FPA no alcanzó los estándares de *Es* (88,9%) requeridos para una prueba confirmatoria.

En el caso del ELISAI, los valores obtenidos de *Se* (98,5%) y *Es* (93,3%) sobre sueros de caprinos infectados así como también de animales vacunados experimentalmente manifiestan la posibilidad de implementar su utilización como prueba única simplificando el diagnóstico de la enfermedad.

Las prevalencias inter e intraprediales halladas en las localidades visitadas del Dpto. Gral. Güemes, demuestran que la brucelosis caprina está presente en el Chaco y tiene una distribución heterogénea, con localidades de alta y baja prevalencia. Sumado a esto, la asociación de posibles factores de riesgo detectados en la zona coinciden con las situaciones epidemiológicas halladas.

La confirmación de la presencia de *B. melitensis* biovar 1 mediante cultivo bacteriológico realizado por un laboratorio de referencia internacional refuerza los hallazgos serológicos y se corresponde con registros previos sobre el agente causal en el país.

El desconocimiento y falta de concientización de pequeños productores respecto de los riesgos que representa la presencia de la enfermedad en los hatos caprinos, eleva las probabilidades de contagio en las familias caprinas.

Los resultados de este estudio permiten incorporar al departamento de General Güemes de la provincia del Chaco, en un área endémica de brucelosis caprina que comprende la región este de la provincia de Salta y el centro y oeste de la provincia de Formosa.

## VI. PROPUESTAS

Revisión y adecuación de la técnica serológica de FPA sobre sueros caprinos (con y sin vacunación) provenientes de la región del NEA, utilizando la técnica de FC como técnica de referencia internacional, con el objeto de estandarizar las técnicas para la región y según las realidades epidemiológicas predominantes.

Analizar el desempeño de la técnica de ELISAb sobre sueros de caprinos no vacunados, a fin de poder implementar su uso en un futuro cercano como técnica diagnóstica complementaria para el diagnóstico de brucelosis caprina.

Ampliar los estudios epidemiológicos en los departamentos restantes de la provincia del Chaco para determinar la prevalencia de la provincia respecto de la brucelosis caprina.

Plantear estrategias de manejo en establecimientos afectados en conjunto con el Ministerio de Producción, teniendo en cuenta el stock caprino y cantidad de animales enfermos adecuando, según corresponda, alternativas beneficiosas para los pequeños productores afectados.

Posibilidad de implementar un plan piloto de vacunación a campo con *B. melitensis* REV-1, sobre todo en algunos establecimientos pertenecientes a las localidades detectadas como de alta prevalencia (Nueva Pompeya y/o Sauzalito), y realizar un seguimiento posterior a la vacunación para analizar la disminución o no de la prevalencia inicial detectada.

Posibilidad de realizar un análisis más profundo de los potenciales factores de riesgo identificados en las encuestas epidemiológicas que contemplen la toma de muestras de agua y suelos para identificar contaminaciones con el agente causal de brucelosis caprina, inspección clínica y toma de muestras de animales con orquitis y/o mastitis, recolección de materia fecal para la contabilización mediante la técnica de HPG para determinación del estado sanitario respecto a las parasitosis, entre otros.

Posibilidad de vinculación con el Ministerio de Salud Pública del Chaco, para determinar el estatus sanitario de las familias de pequeños productores dueños de los animales enfermos identificados.

Implementar campañas de concientización y prevención de la brucelosis caprina, haciendo especial hincapié en identificación de probables factores de riesgo en animales y

medio ambiente, así como también insistencia en la atención primaria de la salud de las familias caprinas ante sintomatología compatible de la enfermedad.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acha, P., Szyfres, B. (1986). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud. 2da. edición. Volumen 1.
2. Aguirre, N., Lugaresci, C., Mondino, M., Zenklussen, A., Vanzini, V., & Torioni de Echaide, S. (2009) Interferencia de la *Brucella abortus* Cepa 19 en el Diagnóstico de la Brucelosis por Inoculación Accidental mediante Jeringas Inadecuadamente Higienizadas. Web: [Interferencia de la Brucella Abortus Cepa 19 en el Diagnóstico de la Brucelosis por Inoculación Accidental mediante Jeringas Inadecuadamente Higienizadas \(mincyt.gov.ar\)](http://www.mincyt.gov.ar)
3. Alton, G. G., Jones, L. M. (1976) Laboratory techniques in brucellosis. *Monograph series. World Health Organization*, 55, 1–92.
4. Alton, G.G. (1990) *Brucella melitensis*. En: Animal Brucellosis, Ed. por Nielsen y Duncan. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.
5. Alton, G.G.; Jones, L.M.; Angus, R.D.; Verger, J.M. (1988) Techniques for the brucellosis laboratory. 1<sup>st</sup> edition. Institut National de la Recherche Agronomique. París.
6. Álvarez, L.P.; Marcellino, R.B.; Martínez, A.; Robles, C. (2017) Duplex PCR for the diagnosis of *Brucella melitensis* and its differentiation from the Rev-1 vaccine strain. *Small Ruminant Research*. 146, 1-4.
7. Angus, R. D., & Barton, C. E. (1984). The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. *Developments in biological standardization*, 56, 349–356.
8. Arellano-Reynoso, B., Suárez-Güemes, F., Estrada, F.M., Michel-GómezFlores, F., Hernández-Castro, R., Acosta, R.B., & Díaz-Aparicio, E. (2012) Isolation of a field strain of *Brucella abortus* from RB51-vaccinated-and brucellosis-seronegative bovine yearlings that calved normally. *Tropical Animal Health and Production*, 45, 695-697.
9. Argentina, (2022) Cuenca Caprina. Recuperado de: [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/plan\\_de\\_cuenca\\_impenetrable\\_chaqueno\\_0.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/plan_de_cuenca_impenetrable_chaqueno_0.pdf)
10. Arregui, M.; Degiorgis A.; Rodriguez D.; Samartino L. (2014) Identificación serológica de caprinos infectados por *Brucella melitensis* y control de la respuesta en animales vacunados con cepa Rev-1. III Congreso Panamericano de zoonosis. Argentina.
11. Bakos, E.; Duarte de Storni. (1981) Informe del Laboratorio Central de Salud Pública del Chaco.
12. Baldi C.; Cassataro J.; Comerci D.; Eisten S.; Fossati, C.; Giambartolomei G.; Goldbaum F.; Wallach J. (2007) Microbiología Veterinaria. Editorial Intermédica. 39, 281-293.
13. Barth, G.F., Malan, F.S & van Wyk, J.A. 1996. The “FAMACHA” ovine anaemia guide to assist with the control of haemonchosis. Proceedings of the 7 th Annual Congress of the Livestock Health and Production Group of the South African Veterinary Association (Port Elizabeth, South Africa).

(12) (PDF) *the in vitro anthelmintic effects of ethnoveterinary medicinal plant extracts used in blouberg district, limpopo province, south africa*. Available from:

[https://www.researchgate.net/publication/354236469\\_the\\_in\\_vitro\\_anthelmintic\\_effects\\_of\\_ethnoveterinary\\_medicinal\\_plant\\_extract\\_Used\\_in\\_Blouberg\\_District\\_Limpopo\\_Province\\_South\\_Africa](https://www.researchgate.net/publication/354236469_the_in_vitro_anthelmintic_effects_of_ethnoveterinary_medicinal_plant_extract_Used_in_Blouberg_District_Limpopo_Province_South_Africa).

14. Blasco, J. M.; Molina-Flores B. (2011) Control and Eradication of *Brucella melitensis* Infection in Sheep and Goats. *Vet Clin Food Anim.* 27, 95-104.
15. Blasco, J.M. (1997) A review of the use of *B. melitensis* Rev-1 vaccine in adult sheep and goats. *Preventive Veterinary Medicine.* 31, 275-81.
16. Blood, D. C.; Radostits O. M. (1992) *Medicina Veterinaria*. Editorial Interamericana. 7ma edición. Capítulo 17, 749-750.
17. Boschioli, M.L; Foulongne, V.; O'Callahan, D. (2001) Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current opinion in microbiology.* 4, 58-64.
18. Bricker, B. J; Halling, S.M. (1994) Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 32, (11), 2660-2666.
19. Carlsson, H.E., Hurvell, B. And Lindberg, A.A. (1976), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) For Titration Of Antibodies Against *Brucella abortus* And *Yersinia Enterocolitica*. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section C Immunology*, 84C: 168-176. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1976.tb00016.x>
20. Cisterna, C.; Conde, S.; Hollender, D.; Martino, P.; Samartino, L. (2015) Diagnóstico serológico de brucelosis en caprinos: comparación de técnicas. *InVet.* 17, 1-8.
21. Coelho, A. C., Díez, J. G., & Coelho, A. M. (2015). Risk Factors for *Brucella* spp. in Domestic and Wild Animals. In (Ed.), *Updates on Brucellosis*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/61325>
22. Coelho, Adosinda, García Díez, Juan, & Coelho, Ana Cláudia (2014) Brucelosis en pequeños rumiantes: etiología, epidemiología, sintomatología, diagnóstico, prevención y control. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 15(5),1-31.[fecha de Consulta 24 de Enero de 2022]. ISSN:.. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63633881002>
23. Cohen, J. (1960) A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educational and Psychological Measurement*, 20(1), 37-46. Extraído: <https://doi.org/10.1177/001316446002000104>
24. Corbel, M. (1997) Brucellosis: an Overview. *Emerging Infectious Diseases.* (3), N°2 Abril-Junio.
25. Corbel, M. J, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization & World Organisation for Animal Health. (2006). *Brucellosis in humans and animals*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43597>
26. Crespo León, F. (1994) Influencia de los elementos y factores geográficos en la Epidemiología de la Brucelosis del Ganado Ovino y Caprino. *Papeles de Geografía.* N°20, 189-209.

27. Dalrymple-Champneys, W. (1950a) Undulant fever a neglected problem. *The Lancet*. 1, 429 – 435.
28. de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vallejo A. (2006) WinEpi: Working in epidemiology. An online epidemiological tool. ISVEE 11: Proceedings of the 11th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Cairns (Australia), August 6-11. Theme 4 - Tools & training for epidemiologists: Poster session, 2006; 800
29. De Miguel, M. J., Marín, C. M., Muñoz, P. M., Dieste, L., Grilló, M. J., & Blasco, J. M. (2011). Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *Journal of clinical microbiology*, 49(4), 1458–1463. <https://doi.org/10.1128/JCM.02301-10>
30. DelVecchio, V.; Kapatral V.; Elzer, P.; Patra, G.; Mujer, C. (2002) The genome of *Brucella melitensis*. *Veterinary Microbiology*. 90, 587-592.
31. Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. and Robledo, C.W. (2020) InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
32. Díaz Aparicio, E. (2013) Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. *Rev.sci.tech Off. int. Epiz.* 32 (1), 43-51.
33. Díaz-Aparicio, E., Marín, C., Alonso-Urmeneta, B., Aragón, V., Pérez-Ortiz, S., Pardo, M., Blasco, J. M., Díaz, R., & Moriyón, I. (1994). Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *Journal of clinical microbiology*, 32(5), 1159–1165. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.5.1159-1165.1994>
34. Elberg, S.S., & Faunce, K.V. (1957). Immunization against *Brucella* infection. VI. Immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of *Brucella melitensis*. *Journal of bacteriology*, 73 2, 211-7 .
35. Estein, S.M. (2006). Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). Extraído de: [\(12\) \(PDF\) Brucelosis: Inmunidad y vacunación \(revisión bibliográfica\) - Brucellosis: Immunity and vaccination \(a review researchgate.net\)](#)
36. F.A.O. (2006) Global livestock production and health atlas. Rome, Italy. Electronic edition.
37. F.A.O. (2010) [Brucella melitensis in Eurasia and the Middle East \(fao.org\)](#).
38. Farrell, I.D. (1974) The Development of a New Selective Medium for the Isolation of *Brucella abortus* from Contaminated Sources. *Research in Veterinary Science*, 16, 280-286.
39. Fensterbank, R.; Pardon, P.; Marly, J. (1987) Comparison between Subcutaneous and Conjunctival Route of Vaccination with Rev-1 Strain against *Brucella melitensis* infection in ewes. *Ann. Rech. Vét.* 13 (4), 295-301.
40. Foster, G.; Osterman, B.; Godfroid J.; Jacques, I. Cloeckaert A. (2007) *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with



- cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 2688–2693.
41. García-Bocanegra, I., Allepuz, A., Pérez, J. J., Alba, A., Giovannini, A., Arenas, A., Candeloro, L., Pacios, A., Saez, J. L., & González, M. Á. (2014). Evaluation of different enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of brucellosis due to *Brucella melitensis* in sheep. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 199(3), 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.12.002>
  42. Garin-Bastuji, B., Blasco, J.M. (2004). Caprine and ovine brucellosis (excluding *B. ovis*). In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, fifth ed. OIE, pp. 598-606.
  43. Garin-Bastuji, B., Blasco, J.M., Marín, C.M., & Albert, D. (2006). The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. *Small Ruminant Research*, 62, 63-70.
  44. Giraud, J.; Magnano, G.; Schneider, M.; Macías, A.; Sticotti, E.; Macio, M.; Bergamo, E.; Perez Zavala, V.; Zanella, F.; Combina, E. (2009) VI Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica, Mar del Plata, Argentina.
  45. Godfroid, J.; Nielsen, K.; Saegerman, C. (2010) Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Croat Med J*. 51, 296-305.
  46. Herrera, E., Rivera, A., Palomares, E.G. et al. Isolation of *Brucella melitensis* from a RB51-vaccinated seronegative goat. *Trop Anim Health Prod* 43, 1069–1070 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11250-011-9822-4>
  47. Hill W. (1963) Standardization of the Complement Fixation test for Brucellosis *Bull OIE*, Vol. 60, pp. 401-410.
  48. Hornitzky, M., & Searson, J.E. (1986). The relationship between the isolation of *Brucella abortus* and serological status of infected, non-vaccinated cattle. *Australian veterinary journal*, 63 6, 172-4.
  49. INGENSA España. Kit *Brucella* Compaq 2.0 Multiespecie.
  50. Jiménez de Bagüés, M. P., Marín, C. M., Blasco, J. M., Moriyón, I., & Gamazo, C. (1992) An ELISA with *Brucella* lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjunctival *B. melitensis* strain Rev 1 vaccination. *Veterinary microbiology*, 30(2-3), 233–241. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90117-c](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90117-c)
  51. Kabagambe EK, Elzer PH, Geaghan JP, Opuda-Asibo J, Scholl DT, Miller JE. (2001). Risk factors for *Brucella* seropositivity in goat herds in eastern and western Uganda. *Prev Vet Med*. Dec 3;52(2):91-108. doi: 10.1016/s0167-5877(01)00251-3. PMID: 11679168.
  52. Kattar, M. M., Zalloua, P. A., Araj, G. F., Samaha-Kfoury, J., Shbaklo, H., Kanj, S. S., Khalife, S., & Deeb, M. (2007). Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 59(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.04.002>
  53. Landis, J. R., Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1), 159–174.

54. Lopes, L.B.; Nicolino, R.; Haddad, J.P.A. (2010) Brucellosis – Risk Factors and Prevalence: A Review. *The Open Veterinary Science Journal*. 4, 72-84.
55. Lucero, N. E.; Ayala, S.M.; Escobar, G.I.; Jacob, N.R. (2008) *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol. Infect.* 136, 496-503.
56. Marín, C. M., Alabart, J. L., & Blasco, J. M. (1996). Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis*, and *B. ovis*. *Journal of clinical microbiology*, 34(2), 426–428. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.2.426-428.1996>
57. Martínez Herrera, D.I, Abeledo, María A, Lara Gutiérrez, A, Peniche Cardeña, A, Robledo Salinas, M.L, Pulido Camarillo, E, Rosas Sastre, T.J, & Flores Castro, R. (2009). EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO PRIMARIO DE *Brucella melitensis* A PARTIR DE LECHE DE CABRAS. *Revista de Salud Animal*, 31(3), 164-169. Recuperado en 28 de junio de 2022, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2009000300005&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2009000300005&lng=es&tlng=es).
58. Martínez, D. E., Cipolini, M. F., Storani, C. A., Russo, A. M., & Martínez, E. I. (2018). Brucellosis: prevalencia y factores de riesgo asociados en bovinos, bubalinos, caprinos y ovinos de Formosa, Argentina. *Revista Veterinaria*, 29(1), 40. <https://doi.org/10.30972/vet.2912789>
59. Maudlin I.; Weber, S. (2006) The control of neglected zoonotic diseases: a route to poverty alleviation. Geneva (Switzerland).
60. Megersa B., Biffa D., Abunna F., Regassa A., Godfroid J., Skjerve E. (2011). Seroprevalence of brucellosis and its contribution to abortion in cattle, camel, and goat kept under pastoral management in Borana, Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 2011; 43:651-656
61. Mikolon AB, Gardner IA, Hernandez De Anda J, Hietala SK. (1998) Risk factors for brucellosis seropositivity of goat herds in the Mexicali Valley of Baja California, Mexico. *Prev Vet Med*. Dec 1;37(1-4):185-95. doi: 10.1016/s0167-5877(98)00097-x. PMID: 9879591.
62. Minas, A., Stournara, A., Minas, M., Papaioannou, A., Krikelis, V., & Tselepidis, S. (2005). Validation of fluorescence polarization assay (FPA) and comparison with other tests used for diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep. *Veterinary microbiology*, 111(3-4), 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.009>
63. Ministerio de Agricultura de la Nación. (2011) Caracterización del Sector Caprino en la Argentina. Extraído de: [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/procal/estudios/04\\_Caprino/SectorCaprino\\_Argentina.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/procal/estudios/04_Caprino/SectorCaprino_Argentina.pdf)
64. Ministerio de Salud de la Nación. (2013) Enfermedades Infecciosas Brucellosis Diagnóstico de Brucellosis, Guía para el equipo de salud. Extraído de: <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000304cnt-guia-medica-brucellosis.pdf>

65. Miranda, A.O.; Báez, E.N.; Acosta, R.S.; Correa Saravia, H.A. (1999) Brucellosis: relevamiento seroepidemiológico en cabras del Nordeste argentino. *Therios*. 28 (145), 40-44.
66. Mohamed, E. M., Elfadil, A., El-Sanousi, E. M., Ibrahaem, H. H., Mohamed-Noor, S. E., Abdalla, M. A., & Shuaib, Y. A. (2018). Seroprevalence and risk factors of caprine brucellosis in Khartoum state, Sudan. *Veterinary world*, 11(4), 511–518. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.511-518>
67. Moreno R., Rentería E., Searcy B. (2002) Seroprevalencia y factores de riesgos asociados a la brucelosis bovina en hatos lecheros de Tijuana, Baja California. *Rev Téc Pec Méx* 40: 243-249.
68. Moreno, L.S. (1976) Las Zoonosis – Aspectos Sanitarios, Económicos y Sociales, Etiología, Epidemiología, Diagnostico y Profilaxis. Editorial AEDOS, Barcelona, pp. 149-165.
69. Muñoz, P. M., de Miguel, M. J., Grilló, M. J., Marín, C. M., Barberán, M., & Blasco, J. M. (2008). Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine*, 26(21), 2562–2569. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.030>
70. Nicola A.M.; Elena S.; Franco, C. (2019) Manual de diagnóstico serológico de la brucelosis bovina SENASA. Laboratorio de Referencia de OIE para brucelosis. Argentina.
71. Nicoletti P. (1990). Vaccination against *Brucella*, pp. 147-168. In: *Bacterial vaccines* Alan Liss, Inc., New York.
72. Nicoletti, P. (1989) Brucellosis in animals. Control, eradication and prevention. En: *Brucellosis*. M. M. Madkour. University Press, Cambridge, Gran Bretaña.
73. Nielsen, K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary microbiology*, 90(1-4), 447-459.
74. Nielsen, K. and Gall, D. (2001) Fluorescence Polarization Assay for the Diagnosis of Brucellosis: A Review. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 22, 183-201. <https://doi.org/10.1081/IAS-100104705>
75. Nielsen, K., Gall, D., Jolley, M., Leishman, G., Balsevicius, S., Smith, P., & Thomas, F. (1996). A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *Journal of immunological methods*, 195(1-2), 161-168.
76. Nielsen, K., Gall, D., Smith, P., Balsevicius, S., Garrido, F., Ferrer, M. D., Biancifiori, F., Dajer, A., Luna, E., Samartino, L., Bermudez, R., Moreno, F., Renteria, T., & Corral, A. (2004). Comparison of serological tests for the detection of ovine and caprine antibody to *Brucella melitensis*. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 23(3), 979–987.
77. Nielsen, K., Gall, D., Smith, P., Bermudez, R., Moreno, F., Renteria, T., & Halbert, G. (2005a). Evaluation of serological tests for detection of caprine antibody to *Brucella melitensis*. *Small Ruminant Research*, 56(1-3), 253-258.
78. Nielsen, K., Smith, P., Yu, W., Nicoletti, P., Elzer, P., Robles, C., Bermudez, R., Renteria, T., Moreno, F. S., Ruiz, A., Massengill, C., Muenks, Q., Jurgensen, G., Tollersrud, T., Samartino, L., Conde, S., Forbes, L., Gall, D., Perez, B., Rojas,

- X., ... Minas, A. (2005b). Towards single screening tests for brucellosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 24(3), 1027–1037. <https://doi.org/10.20506/rst.23.3.1532> serological tests ovine and caprine antibody b. melitensis
79. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff W (2000). *Veterinary Medicine. Textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 9th edition, New York: W.B. Saunders Company Ltd. pp. 867-882.
  80. Ramírez-Pfeiffer, C., Díaz-Aparicio, E., Rodríguez-Padilla, C., Morales-Loredo, A., Alvarez-Ojeda, G., & Gomez-Flores, R. (2007). Improved performance of *Brucella melitensis* native hapten over *Brucella abortus* OPS tracer on goat antibody detection by the fluorescence polarization assay. *Veterinary immunology and immunopathology*, 123(3-4), 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.02.001>
  81. Redkar, R.J., Rose, S., Bricker, B.J., & DelVecchio, V.G. (2001). Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Molecular and cellular probes*, 15 1, 43-52 .
  82. Rees, R. K., Graves, M., Caton, N., Ely, J. M., & Probert, W. S. (2009). Single tube identification and strain typing of *Brucella melitensis* by multiplex PCR. *Journal of microbiological methods*, 78(1), 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.04.010>
  83. Resolución N°372-E. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentario, Buenos Aires, Argentina, 09 de junio de 2017.
  84. Resolución N°857-E. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentario, Buenos Aires, Argentina, 22 de diciembre de 2017.
  85. Reviriego, F.J.; Moreno, M.A.; Domínguez, L. (2000) Risk factors for brucellosis seroprevalence of sheep and goat flocks in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*.44, 167-173.
  86. Robles, C. A., Bernard, O., Zenocrati, L., & Marcellino, R. (2007). *Encuesta serológica sobre Brucelosis en caprinos de la provincia de Mendoza*.
  87. Robles, C. A., Chodilef, M. M., & Cabrera, F. R. (2020) *Respuesta inmune en caprinos criollos vacunados con la vacuna Brucella melitensis REV 1 aplicada por vía conjuntival*. *Rev. Med. Vet.*, 101 (1): 65-70
  88. Robles, C.; Gaido, A.; Späth, E.; Torioni de Echaide, S.; Vanzini, V.; Zielinsky, G.; Aguirre, D.; Samartino, L.; Rossanigo, C. (2014) *Brucelosis caprina en la Argentina*. Ediciones INTA. Argentina.
  89. Robles, C.A. (2009) *Brucelosis Caprina*. Ediciones INTA. Grupo de Salud Animal. Argentina
  90. Robles, C.A., Martínez A. (2018) *Libre de Brucelosis Caprina*. Ediciones INTA. Grupo de Salud Animal. Argentina.
  91. Rossetti, C. A., Eliazarian M., Domínguez P., Díaz Bazán R., Arregui, Samartino L. (2018) Factores de riesgo asociados y relevamiento serológico para la detección de anticuerpos anti-*Brucella* en caprinos del departamento de La Paz, Catamarca, Argentina. *Vet. Arg. – Vol. XXXV – N° 367*

92. Rossetti, C. A., Arenas-Gamboa, A. M., & Maurizio, E. (2017). Caprine brucellosis: A historically neglected disease with significant impact on public health. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **11**, 1–17.
93. Russo, A.M.; Mancebo, O.; Monzón, C.; Gait, J.; Casco R.; Torioni, S. (2016) Epidemiología de la brucelosis caprina y ovina en la provincia de Formosa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 48 (2),147-153.
94. Saegerman, C., De Waele, L., Gilson, D., Godfroid, J., Thiange, P., Michel, P., Limbourg, B., Vo, T. K., Limet, J., Letesson, J. J., & Berkvens, D. (2004). Evaluation of three serum i-ELISAs using monoclonal antibodies and protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary microbiology*, *100*(1-2), 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.02.003>
95. Scholz, H.C.; Hubalek, Z.; Sedlacek, I.; Vergnaud, G.; Tomaso, H.; Al Dahouk, S.; Melzer, F.; Kampfer, P.; Neubauer, H.; Cloeckart, A.; Maquart, M.; Zygmunt, M.S.; Whatmore, A. M.; Falsen E.; Bahn, P.; Gollner, C.; Pfeifer, M.; Huber, B.; Busse, H.J.; Nockler, K. (2008b) *Brucella microti* sp. Nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58, 375-382.
96. Scholz, H.C.; Nockler, K.; Gollner, C.; Bahn, P.; Vergnaud, G.; Tomaso, H.; Al Dahouk, S.; Kampfer, P.; Cloeckart, A.; Maquart, M.; Zygmunt, M.S.; Whatmore, A.M.; Pfeiffer, M.; Huber, B.; Busse, H.J.; DE, B.K. (2010) *Brucella inopinata* sp nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60, 801-808.
97. Schoonjans, F., Zalata, A., Depuydt, C. E., & Comhaire, F. H. (2009). MedCalc: a new computer program for medical statistics. *Computer methods and programs in biomedicine*, *48*(3), 257–262. [https://doi.org/10.1016/0169-2607\(95\)01703-8](https://doi.org/10.1016/0169-2607(95)01703-8)
98. Schurig, G. G., N. Sriranganathan, and M. J. Corbel. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.* 90, 479–496
99. Segovia, C.N.; Uzal, F.A y Robles C.A (2000) EVALUACION DE UN ENZIMO-INMUNOENSAYO INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella melitensis* en suero de caprinos. *Therios*, Vol 29(154): 177-182.
100. Seleem, M.; Boyle, S.; Sriranganathan N. (2010) Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Veterinary Microbiology*. 140, 392-398.
101. SENASA SIGSA – Mapa de Distribución de existencias Caprinas (2017) - Dirección de Control de Gestión y Programas Especiales, Dirección Nacional de Sanidad Animal. Extraído de: <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/caprinos/informacion/informes-y-estadisticas>
102. SENASA SIGSA - Mapa de Distribución de existencias Caprinas (2020) - Dirección de Control de Gestión y Programas Especiales, Dirección Nacional de Sanidad Animal. Extraído de: [Datos Argentina - SENASA - Existencias caprinas](#)
103. Solera, J. (2010) Update on brucellosis: therapeutic challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 36S, S18-S20.
104. Solorio-Rivera, J. L., Segura-Correa, J. C., & Sánchez-Gil, L. G. (2007). Seroprevalence of and risk factors for brucellosis of goats in herds of Michoacan,

- Mexico. *Preventive veterinary medicine*, 82(3-4), 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.05.024>
105. Tamargo Barbeito, Teddy Osmin, Gutiérrez Rojas, Ángela Rosa, Quesada Peña, Susel, López León, Nirka, & Hidalgo Costa, Tania. (2019). Algunas consideraciones sobre aplicación, cálculo e interpretación de odds ratio y riesgo relativo. *Revista Cubana de Medicina*, 58(3), e497. Epub 24 de junio de 2020. Recuperado en 01 de noviembre de 2021, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75232019000300008&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232019000300008&lng=es&tlng=es).
  106. Thayer, J. D., & Martin, J. E., Jr (1966). Improved medium selective for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. *Public health reports (Washington, D.C.: 1896)*, 81(6), 559–562.
  107. Thrusfield, M. (1990) Epidemiología Veterinaria. Department of Animal Health Royal School of Veterinary Studies University of Edinburgh. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza (España) v, xi, 339 p.
  108. Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, I., Noordhuizen, J.P. and Frankena, K. (2001), WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Veterinary Record*, 148: 567-572. <https://doi.org/10.1136/vr.148.18.567>
  109. Tolari F y Salvi G (1980) Segnalazione di un caso di orchite bilaterale in un capretto in sequito a vaccinazione con Rev. 1. Estrato dagli Anm Faculta Med Vet:33.
  110. Verger, J.-M.; Grimont, F.; Grimont, P. A. D. and Grayon, M. (1987) Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 138, 235–238.
  111. World Organization for Animal Health (OIE). (2004) Caprine and ovine brucellosis (excluding *Brucella ovis*). OIE Terrestrial Manual.
  112. World Organization for Animal Health (OIE). (2016) Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). OIE Terrestrial Manual.
  113. World Organization for Animal Health (OIE). (2018) Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). OIE Terrestrial Manual.
  114. Yu, W. L.; Nielsen, K. (2010) Review of Detection of *Brucella* spp. by Polymerase Chain Reaction. *Croat Med J.* 51, 306-313.
  115. Zowghi, E., Ebadi, A.G., & Mohseni, B. (1990). Isolation of *Brucella* organisms from the milk of seronegative cows. *Revue scientifique et technique*, 9 4, 1175-8.

# ANEXO



## ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA BRUCELOSIS

**Fecha de la encuesta:**

**Encuestador:**

### 1. DATOS DE LA EXPLOTACIÓN

Provincia \_\_\_\_\_ Departamento \_\_\_\_\_  
Municipio/Paraje \_\_\_\_\_ Localización \_\_\_\_\_  
Propietario \_\_\_\_\_ RENSPA \_\_\_\_\_  
Domicilio \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_

### 2. CARACTERÍSTICAS DE LA EXPLOTACIÓN

#### a. Datos de Stock

Categorías caprinos	Adultos	Reposición	Cabritos
Machos			
Hembras			

#### b. Manejo de los caprinos

- i. Aptitud: Leche  Carne  Mixto  Otro   
ii. Manejo: Intensivo  Semi-intensivo  Extensivo   
iii. Transhumancia: sí  no

#### c. Datos epidemiológicos

- i. Forma parte de una unidad epidemiológica con antecedentes recientes (3 años):  
Sí  No  No hay antecedentes recientes   
ii. Presencia de montes/matorrales: sí  no   
iii. Se ha detectado presencia de las siguientes especies silvestres de riesgo:  
Jabalíes/cerdos salvajes  Cérvidos  Zorros  Pumas

### 3. ANTECEDENTES DE LABORATORIO

- iv. ¿Ha realizado diagnósticos de brucelosis en la majada? Sí  no   
v. ¿Ha tenido reaccionantes positivos? sí  no

### 4. INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

#### a. Fuentes de contaminación e infección

- i. En la explotación hay: Seropositivos - sí  no  / Posibles latentes- sí  no   
ii. ¿Ha habido abortos/nacidos débiles o muertos? sí  No   
iii. ¿Se observó mastitis en las hembras? Sí  No   
iv. ¿Se observó orquitis en machos? sí  no   
v. ¿Se destruyen los abortos/secundinas? Sí  No   
vi. ¿Tienen acceso a ellos perros o gatos? Sí  No





- vii. ¿Existen puntos de agua estancada dentro de la explotación? Sí  No
- viii. ¿Pueden contaminarse de forma prolongada los comederos/bebederos con deyecciones de los animales? Sí  No
- ix. ¿Hay acceso a pastos posiblemente contaminados? Sí  No
- x. ¿Usa estiércol como abono? Sí  No

**b. Receptividad y reactividad de los animales (determinantes de enfermedad)**

- i. ¿Se aíslan las hembras próximas al parto? Sí  No
- ii. ¿Se detectan problemas evidentes de alimentación estacional insuficiente? Sí  No
- iii. ¿Se detectan problemas de parasitosis que afecten la resistencia? Sí  No

**c. Fuentes de contagio (formas de transmisión)**

**i. Entrada de animales**

¿Han ingresado animales nuevos en la majada recientemente (3 años)? Sí  No

Origen de los animales ingresados:

Compra a otro productor  / Compra a establecimiento vendedor de reproductores

¿Han entrado o conviven animales domésticos (vacas, ovejas, cabras) de otra explotación en su establecimiento? Sí  No

Estado del alambrado perimetral: Completo  Parcial  Sin alambrado

**ii. Contacto entre animales domésticos susceptibles**

¿Realiza pastoreo en común o convivencia entre animales domésticos susceptibles? Sí  No

¿Se comparten puntos de agua entre rodeos? Sí  No

**iii. Causas endógenas**

¿Hizo reposición con hijos de hembras positivas? Si  No  No sabe

¿Resultó alguno de los hijos, positivo en alguna prueba? Si  No  No sabe

¿Esperó a la finalización del ciclo productivo antes de eliminar hembras positivas? Sí  No

**5. CASOS HUMANOS**

i. ¿Ha habido síntomas en las personas que frecuentan la explotación? Sí  No  No sabe

Fiebre recurrente/ondulante  Dolor muscular/articular

ii. ¿Los casos humanos han sido atendidos por un médico? Sí  No

iii. ¿Les han realizado diagnóstico de laboratorio a las personas afectadas? Sí  No  No sabe