

SEROPREVALENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA EN EL ALTIPLANO BOYACENSE, COLOMBIA-SURAMÉRICA

Seroprevalence Of Bovine Brucellosis In The Boyacense Highlands, Colombia - South America

Roy José Andrade-Becerra^{1*}, MV, Esp, MSc, PhD; Julio Cesar Vargas-Abella², Z, Esp, MSc y Luis Edgar Tarazona-Manrique³, eMVZ.

¹ Docente Titular Microbiología e Inmunología Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Tunja, Colombia. ² Docente asociado. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia. ³ MVZ. UPTC. Grupo de Investigación GIPATRACOL, Tunja (Boyacá-Colombia). *Correspondencia: roy.andrade@uptc.edu.co

RESUMEN

La brucelosis bovina es considerada como una de las enfermedades infecciosas más importantes en el mundo por sus implicaciones en salud pública. Para la investigación se tomaron muestras de 24.098 bovinos de 1.289 predios, se discriminaron como hembras de 18-35 meses (mes), hembras entre 36-59 mes, hembras mayores de 60 mes y machos. Se utilizaron como pruebas diagnósticas las técnicas Rosa de Bengala (RB), Fluorescencia Polarizada (FP), Elisa indirecto (Ei) y como prueba confirmativa Elisa Competitivo (Ec). De los 24.098 sueros procesados se encontró una prevalencia de brucelosis del 1,75%, que corresponden a 424 animales infectados y que se encuentran ubicados en las siguientes zonas: Occidente con 37,07%, seguida de la zona sur con 32,28%, la zona centro con 32,20%, la zona Oriente con 28,95 y la zona norte con 19,63%, confirmadas por Ec. Al separar las hembras por rangos de edad 24 a 35 mes, 36 a 59 mes y mayores de 60 mes se encontró que, a medida que aumenta la edad, en términos generales, la prevalencia se hace mayor. Se confirma la mayor sensibilidad y especificidad de la prueba EC comparada con las otras pruebas RB Modificada, RB Convencional, FP y Ei, pudiéndose detectar y diferenciar hembras vacunadas de infectadas

Palabras clave: Brucelosis bovina; Elisa; prevalencia

ABSTRACT

Bovine brucellosis is considered one of the most important infectious diseases in the world due to its public health implications. For the investigation, samples were taken of 24,098 cattle of 1,289 farms, were discriminated as females of 18-35 months (mon), females between 36-59 mon, females over 60 mon and males. The Rose Bengal (RB), Polarized fluorescence (PF), Indirect Elisa (iE) and confirmatory Competitive Elisa (cE) tests were used as diagnostic tests. Of the 24,098 sera processed, a prevalence of brucellosis of 1.75% was found, corresponding to 424 animals infected and located in the following areas: West with 37.07%, followed by the southern zone with 32.28%, the central zone with 32.20%, the east region with 28.95 and the northern zone with 19.63%, confirmed by cE. When the females were separated by age ranges from 24 to 35 mon, 36 to 59 mon and over 60 mon, it was found that as age increases, in general terms, the prevalence becomes greater. The greater sensitivity and specificity of the cE test compared with the other modified RB, conventional RB, PF, and iE tests are confirmed, and it is possible to detect and differentiate vaccinated females from infected

Key words: Bovine brucellosis; Elisa; prevalence

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad producida por una bacteria del género *Brucella*, la cual comprende al menos 11 especies reconocidas, de acuerdo a su patogenicidad y preferencia por los hospedadores. En los bovinos (*Bos taurus*), la principal especie patogénica a nivel mundial es *Brucella abortus* [3,15]

Esta enfermedad es epidemiológicamente importante debido a que es una de las zoonosis más importantes a nivel mundial, por sus implicaciones en la salud pública, por su fácil transmisión a los humanos, debido a que se transmite en forma natural de los animales vertebrados al hombre, atentando contra la salud de los ganaderos y del personal de campo, así como de los consumidores de leche cruda de animales enfermos.

También es importante económicamente en el ámbito pecuario, entre sus implicaciones cabe destacar: la pérdida de terneros (abortos) en la segunda mitad de la gestación, placentitis y/o necrosis de placentomas, infertilidad subsecuente a la retención de placenta y a la metritis, repetición de servicios, aumento del intervalo entre partos, alta tasa de remplazos, disminución en la producción de leche y pérdida de peso en las canales, como también, orquitis y epididimitis en los machos, factores altamente importantes en sistemas de producción lecheros y/o cárnicos [2].

La repercusión socioeconómica de la brucelosis es grande en los países que no la han erradicado. En Colombia, las pérdidas económicas en bovinos no han sido calculadas en toda su extensión, sin embargo, en evaluaciones realizadas sugieren valores hasta de 15.000 dólares al año [12].

En la actualidad existen dos opciones para la vacunación contra la brucelosis bovina, la primera de ellas es Cepa 19, la cual genera una inmunidad de tipo humoral; y RB-51, la cual genera inmunidad de tipo celular; ambas mostrando una amplia efectividad contra la prevención de la infección y el subsecuente aborto, además ofreciendo amplio tiempo de protección [2].

La decisión sobre que pruebas usar en los programas de control y erradicación depende de la entidad oficial encargada en cada país; y está basada en estudios epidemiológicos de prevalencia y en los procesos de validación para conocer, tanto la repetitividad y la reproducibilidad, como la sensibilidad y especificidad de cada una de las pruebas disponibles, así como el tipo de vacunación utilizada en cada región. A nivel mundial, las pruebas utilizadas para el diagnóstico de brucelosis bovina son: Test de anillo en leche, Test intradérmico, Fijación del complemento, test de aglutinación sérica, rosa de bengala (RB), Elisa-indirecto (Ei), Elisa-competitivo (Ec) y Fluorescencia polarizada (FP) [4, 19, 21]. En Colombia, las pruebas diagnósticas aprobadas por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) son la prueba RB, FP y Ei, usadas como prueba tamiz y Ec como prueba confirmativa [9].

En el medio regional y nacional, las investigaciones que permitan tener un estado actualizado de las dinámicas epidemiológicas

de la enfermedad en los distintos Municipios, son escasos, por tanto, la posibilidad de validar los datos nacionales y así implementar discriminadamente programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad se dificultan.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar la seroprevalencia de brucelosis bovina en el Altiplano Boyacense, mediante la detección de anticuerpos contra *B. abortus*, así se actualizará la información de la región, necesaria para la implementación de programas de monitoreo, control y erradicación de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación geográfica

El estudio fue de tipo descriptivo y se realizó en el Altiplano Boyacense-Colombia, comparando las siguientes zonas: **Zona Norte (azul)** comprendida por los municipios de: 1) Duitama, 2) Santa Rosa de Viterbo, 3) Cerinza, 4) Belén, 5) Tibasosa, 6) Sogamoso, 7) Labranzagrande. **Zona oriental (roja)** que comprende los municipios de: 8) Páez, 9) Campo Hermoso, 10) Miraflores, 11) Garagoa, 12) Chinavita, 13) Santa María, 14) Guateque. **Zona sur (verde)**, con los municipios de: 15) Úmbita, 16) Turmequé, 17) Nuevo Colón, 18) Ventaquemada, 19) Samacá, 20) Siachoque, 21) Chíquiza. **Zona Occidental (amarillo)**, que comprende a los municipios de: 22) Cucaita, 23) Arcabuco, 24) Togüí, 25) Monquirá, 26) Chiquinquirá, 27) Caldas. Y, por último, **Zona Centro (naranja)** con los municipios de: 28) Tunja, 29) Soracá, 30) Motavita, 31) Cómbita, 32) Toca, 33) Tuta, 34) Sotaquirá. (FIG. 1)

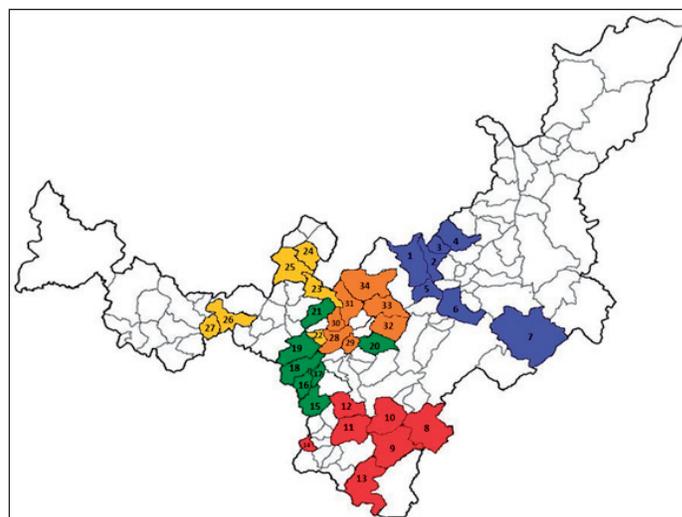


FIGURA 1. MAPA DE BOYACÁ CON LA DISTRIBUCIÓN DE LOS MUNICIPIOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO, DIVIDIDOS POR LA ZONAS EVALUADAS.

Características de cada zona

Zona Norte: Comprende desde los 1.210 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) (Labranzagrande) y los 2.760 msnm

(Cerinza); con un rango de temperatura de 16° hasta los 30°; con pluviosidades de hasta 3.334 milímetros (mm) al año en toda la zona. [10] la base forrajera varía únicamente para el municipio de Labranzagrande en donde se encuentra predominantemente *Brachiaria brizanta*; por su parte para los demás Municipios es pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum*), Ray grass (*Lolium perenne*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*), estos últimos recursos forrajeros son los que más predominan en las demás zonas evaluadas.

Zona Oriental: está ubicada entre los 850 m.s.n.m. (Santa María) y los 1.800 m.s.n.m (Chinavita); cuyo rango de temperatura es de 14° hasta los 31°, así mismo, la pluviosidad promedio para la zona es de 2.500 mm anuales [10]. La base forrajera comprende *B. brizanta* y *decumbens* para todos los Municipios;

Zona Sur: Comprende desde los 2.480 m.s.n.m. (Úmbita) hasta los 2.900 m.s.n.m (Chíquiza), con una temperatura promedio para toda la zona de 15°C; con una pluviosidad promedio de 2.000 mm al año en toda la zona [10]; la base forrajera es Kikuyo, Ray grass, y trébol rojo.

Zona Occidental: Va desde los 1.650 m.s.n.m (Togüí) hasta los 2.650m.s.n.m. (Cucaita); la pluviosidad promedio es de 2.400 milímetros (mm) anuales y la temperatura promedio es de 18°C para toda la zona [10]. La base forrajera es Kikuyo, Ray grass, y trébol rojo, y en algunos municipios como Moniquirá y Togüí, *B. decumbens*.

Zona Centro: comprende desde los 2.600 m.s.n.m (Tuta) hasta los 2.965 m.s.n.m (Motavita), la temperatura promedio de la zona es de 12°C y la pluviosidad promedio es de 2.200 mm anuales [10]. La base forrajera es Kikuyu, Ray grass y Trébol rojo.

Época de muestreo

La recolección y procesamiento de las muestras se dio en el período que comprende desde octubre 2017 hasta septiembre 2018.

Diseño de investigación

La investigación fue realizada tomando como estratos los grupos etarios de los animales, la población total bovina del Altiplano Boyacense, se tomó según datos del ICA [8], extraídos del último ciclo vacunal contra la fiebre aftosa. El cálculo de la muestra se determinó empleando el método de Putt y col. [22], el cual está indicado para estudios epidemiológicos en donde la hipótesis plantea la presencia de una enfermedad, pero esta debe ser cuantificada. Para la investigación se tomaron muestras de 24.098 bovinos de 1.289 predios, se discriminaron como hembras de 18-35 mes, hembras entre 36-59 mes, hembras mayores de 60 mes y machos.

La obtención de la muestra por Municipio se determinó, aplicando un factor de ponderación (Wh), el cual se obtuvo dividiendo la

población de cada Municipio (Nx) entre la población total (N) ($Whx = Nx/N$), este factor de ponderación (Whx), se multiplica por el tamaño de la muestra total (n). ($Whx * n$).

Muestra poblacional

La población de referencia estuvo conformada por 24.098 animales mayores de 18 mes de edad. El tamaño de la muestra se estimó considerándose desconocida la prevalencia poblacional [11], y para garantizar que la misma fuera representativa de la población de referencia, se utilizó la siguiente fórmula:

$$N = \frac{Z^2 \alpha / 2}{4(e)^2}$$

Donde N: Tamaño de la muestra; Z: 1,96 (Valor para el 95% de confianza); e: error máximo permisible_0,05; α _ nivel de significancia_0,05.

La edad de los animales incluidos en el estudio estuvo entre los siguientes grupos etarios: animales entre 18 a 35 mes (n=10.800), entre 36 a 59 mes (n=9.100), mayores de 60 mes (n=3.218) y machos (n=980). Las razas cruzadas predominantes en la población de bovinos estudiados fueron: Holstein (n=19.023), Normando (n=4.150), Cruces (n=750), Pardo suizo (n=83), Simmental (n=70) y Airshire (n=22).

Muestreo

Se utilizó muestreo estratificado proporcional en función al total de hembras bovinas existentes en cada sector y la selección de los animales se hizo en forma sistemática en aquellos predios con más de 5 animales de iguales características a la población en referencia [14].

Toma de muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena coccígea, utilizando tubos al vacío sin anticoagulante, se separó el suero y se congeló a -40°C hasta el momento de la realización de las diferentes pruebas en un congelador marca Whirlpool®, referencia UW8 F2Y XBIF, fabricada por Whirlpool® en EUA. Para la realización de la prueba de RB, se depositaron 30 microlitros (µL) de suero y 15 µL de antígeno (Técnica modificada) sobre una placa de aglutinación, se mezcló y homogenizó suavemente por 4 minutos (min), después de los cuales se visualizó la presencia de aglutinación macroscópicamente [17]. Los sueros positivos por el método de RB modificado fueron sometidos a la prueba RB convencional (30µL del suero más 30 µL de antígeno). Los sueros positivos por el método RB Modificado fueron remitidos al centro de diagnóstico animal del ICA (Sogamoso), donde se realizó FP y Ei como pruebas tamiz y para confirmar se enviaron al centro de diagnóstico animal del ICA (Bogotá) para Ec.

Definición e interpretación de los resultados de seropositividad

Para definir las regiones de alta, moderada y baja incidencia

de brucelosis bovina, se tuvieron en cuenta los criterios establecidos por el comité mixto de expertos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) en brucelosis para América Latina [18].

Para rebaños: Niveles de infección baja en rebaños con índices de infección menores del 10%. Moderados rebaños entre el 10 a un 35% de infección; altos, cuando la seropositividad es superior al 35%.

Para animales: Niveles de infección bajos, una positividad en animales menor del 3%, niveles de infección moderados, entre un 3 a un 10% de animales infectados y niveles de infección altos, cuando los índices de infección son superiores a un 10%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El criterio para modificar la prueba se basó en el concepto de que, a menor concentración de antígeno, hay mayor probabilidad de formación de complejos inmunes multivalentes y por lo tanto, mayor es la probabilidad de evidenciar macroscópicamente la aglutinación. Por lo mismo, solo se detectaron 1.219 bovinos positivos a la prueba convencional de RB, mientras que al realizar la prueba modificada se encontraron 1.372, positivos, de los cuales 424 fueron confirmados por la prueba Ec, lo que muestra que la prueba de tamizaje convencional puede confundir animales positivos por infección, animales vacunados y animales con residuos de títulos.

Los resultados obtenidos sobre brucelosis bovina en el Altiplano Boyacense utilizando la prueba de Rosa de Bengala modificada (RBM) mostraron para esta área una prevalencia de (5,69%); al utilizar la prueba RB convencional la prevalencia es de (5,05%). Al utilizar la prueba de FP la prevalencia fue de (4,14%). Al utilizar la prueba de Ei la prevalencia fue de (3,25%) y al confirmar los sueros por Ec la prevalencia fue de (1,75%), esto indica que en el Altiplano Boyacense el perfil epidemiológico de la enfermedad es bajo, debido a que existe vacunación (Cepa-19), (FIG. 2).

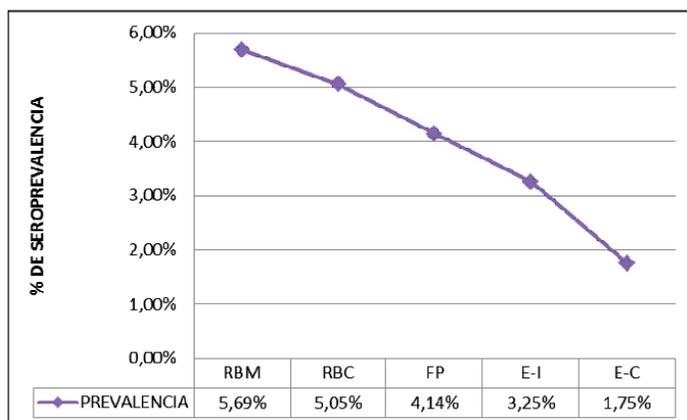


FIGURA 2. PORCENTAJE DE BOVINOS SEROPOSITIVOS EN CADA PRUEBA SEROLÓGICA

La zona de mayor prevalencia es la zona de Occidente: 37,07%, seguida de la zona Sur: 32,28%, zona Centro: 32,20%, zona Oriente: 28,95% y zona Norte: 19,63% (FIG. 2). La prevalencia de la zona Occidente es la suma de individuos infectados (Ec: 96) sobre total seleccionados (RB Modificado: 259) por cien por ciento: 37,07%; la prevalencia de la zona Sur es la suma de individuos infectados (Ec: 82) sobre total seleccionados (RB Modificado: 254) por cien por ciento: 32,28%; la prevalencia de la zona Centro es la suma de individuos infectados (Ec: 171) sobre total seleccionados (RB Modificado: 531) por cien por ciento: 32,20%; la prevalencia de la zona Oriente es la suma de individuos infectados (Ec: 33) sobre total seleccionados (RB Modificado: 114) por cien por ciento: 1,14%; la prevalencia de la zona Norte es la suma de individuos infectados (Ec: 42) sobre total seleccionados (RB Modificado: 214) por cien por ciento: 19,63%. (FIG. 3)

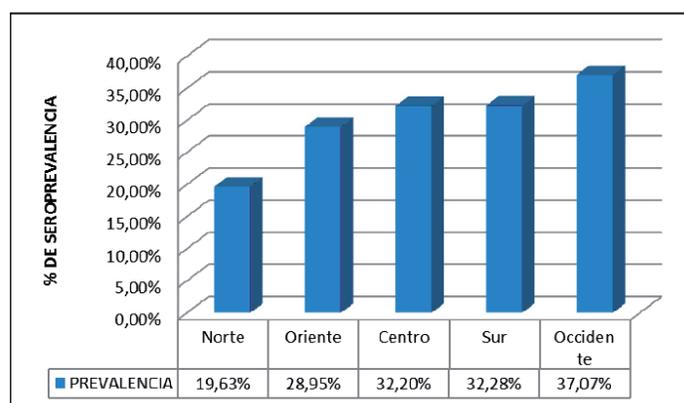


FIGURA 3. PORCENTAJE DE SEROPREVALENCIA PARA BRUCELOSIS BOVINA POR CADA ZONA ESTUDIADA A TRAVÉS DE ELISA-COMPETITIVA

Al separar las hembras por rangos de edad 24 a 35 mes, 36 a 59 mes y mayores de 60 mes se encontró que a medida que aumenta la edad, en términos generales, la prevalencia se hace mayor (TABLA I).

Los resultados obtenidos sobre brucelosis bovina en el Altiplano Boyacense utilizando la prueba RB modificada mostraron para esta área una prevalencia de 5,69%; esto indica que en el Altiplano Boyacense el perfil epidemiológico de la enfermedad es alto, a sabiendas que existe vacunación, al comparar este resultado con un estudio de Aricapa y col. [1], en la zona de Caldas, Colombia, donde obtuvieron un 1,97%. Al utilizar la prueba RB convencional, la prevalencia es de 5,05% mientras que para Aricapa y col. [1] fue de 0,32%. Al utilizar la prueba de FP, la prevalencia fue de 4,14% al utilizar la prueba de Ei, la prevalencia fue de 3,25% y al confirmar los sueros por Ec la prevalencia fue de 1,75%.

Al estudiar cada zona, se encontró que en la zona norte la prevalencia por Ec fue de 0,17 %, y el Municipio que muestra mayor prevalencia es Duitama con el 0,06 %.

En la zona centro la prevalencia fue del 0,70 % y el Municipio con mayor prevalencia fue Sotaquirá con el 0,43%. En la zona sur la

TABLA I
SEROPREVALENCIA DE BRUCELOSIS DETERMINADA A TRAVÉS DE ELISA
COMPETITIVO, SEGÚN EDAD EN CADA ZONA EVALUADA

| | Hembras entre 18 a 35 meses | Hembras entre 36 a 59 meses | Hembras mayores de 60 meses | Machos |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------|
| | % | % | % | % |
| Norte | 0,46 | 0,63 | 1,23 | 2,45 |
| Sur | 0,76 | 1,97 | 3,38 | 3,80 |
| Centro | 1,35 | 2,07 | 3,12 | 6,61 |
| Oriente | 0,65 | 1,00 | 1,09 | 5,26 |
| Occidente | 1,69 | 3,91 | 4,84 | 8,33 |

prevalencia fue del 0,34 % y el Municipio con mayor prevalencia fue Ventaquemada con el 0,29%. En la zona Oriente la prevalencia fue del 0,14% y el Municipio con mayor prevalencia fue Guateque con el 0,07%. En la zona Occidente la prevalencia fue del 0,40 % y el Municipio con mayor prevalencia fue Chiquinquirá con el 0,21 %.

Ferlmer y col. [7] en estudios realizados en Chile aplicaron en predios lecheros el sistema de análisis por ELISA de tanques prediales, lo que permitió la vigilancia y el monitoreo predial a un bajo costo, de enfermedades, como la brucelosis, la leucosis, la diarrea viral y la rinotraqueítis infecciosa bovina, contando con un diagnóstico precoz y de alerta temprana ante la introducción de algunos patógenos en los predios. La prevalencia predial a brucelosis no superó el 5%, situación que se explica por el programa de control y de erradicación, implementado en ese país. Estas cifras son inferiores a las de un estudio de Tique y col. [24], que alcanzaron el 12,7% y que incluyó 4.922 predios ganaderos en el departamento de Córdoba-Colombia, mientras que para el presente estudio la prevalencia predial fue del 3%.

Quijada y col. [23], en Venezuela, estimaron una seroprevalencia de 0,84% en 592 bovinos de doble propósito, por la técnica de RB, al igual que en Perú [13], en la provincia de Puerto Inca la prevalencia fue de 0,031% en 3.221 animales; cifras inferiores a las del presente estudio y que demuestran los resultados favorables obtenidos por la implementación de los programas de erradicación en esos países. Mientras que para México, Peña y col. [20] encontraron una prevalencia del 6,8 en zonas de alta producción láctea en Jalisco, por la técnica de RB, prevalencia alta si se compara con la obtenida por el presente estudio (1,75% por RB).

D'Pool y col. [5], en Venezuela con 387 hembras bovinas mayores de 24 mes de edad determinaron por la técnica de Ec una prevalencia de brucelosis del 20,3% en rebaños y 9,1%, por animal. Demostró la alta especificidad de la Ec sobre la Ei, por lo cual, la utilización de la técnica en áreas endémicas, donde es muy probable la exposición a *Brucella* sin desarrollo de la enfermedad, sería ampliamente recomendada, teniendo en cuenta que permite distinguir anticuerpos inducidos por vacuna, de los anticuerpos inducidos por una infección natural.

El ICA [9] en el programa nacional de control y de erradicación de la brucelosis bovina ha establecido la vacunación obligatoria de las terneras entre 3 y 8 mes de edad, con las vacunas cepa 19 o cepa RB51, en dos ciclos de vacunación anual. La cobertura nacional para 2.017 alcanzó cifras del 83,8% y, en el departamento de Boyacá, para el ciclo II de vacunación, la cobertura de vacunación fue del 88,0%; se realizó la vacunación de animales en 10.027 predios, con cepa 19 (9.729), 97,02% y con RB 51 (298) 2,98%. Esta información permite establecer que, la vacunación es un mecanismo de saneamiento que es utilizado en esta zona, considerada como de prevalencia baja de la enfermedad [6, 16]

CONCLUSIONES

La prevalencia de brucelosis bovina determinada a través de Ec en el Altiplano Boyacense fue de 1,75 %. Se confirma la mayor sensibilidad y especificidad de la prueba Ec comparada con las otras pruebas RB Modificada, RB Convencional, FP y Ei, pudiéndose detectar y diferenciar hembras vacunadas de infectadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARICAPA, H.; JARAMILLO, A.; PÉREZ, J.; LONDOÑO, L.; CASTILLÓN, A. Prevalencia de brucelosis bovina, equina y humana en Caldas-Colombia-Suramérica. **Biosalud**. 7: 75-87. 2008.
- [2] DORNELES, E. M.; CARVALHO, A.T.; ARAÚJO, M.S.; SRIRANGANATHAN, N.; LAGE, A.P. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. **Vaccine**. 33: 3659-3666. 2015.
- [3] DUCROTOY, M.J.; CONDE, R.; BLASCO, J.M.; MORIYÓN, I. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. **Vet. Imm.** 171: 81-102. 2016.
- [4] DUCROTOY, M.J.; MUÑOZ, P.M.; CONDE, R.; BLASCO, J.M.; MORIYÓN, I. A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis. **Prev. Vet. Med.** 151: 57-72. 2018.

- [5] D'POOL, G.; RIVERA, PS; TORRES, T; PÉREZ, M. Prevalencia de Brucelosis bovina mediante Elisa Competitivo en el municipio La cañada de Urdaneta. Estado Zulia, Venezuela. **Rev. Científ. FVC-LUZ**. XIV (2): 168-176. 2011
- [6] FEDERACIÓN COLOMBIANA DE GANADEROS (FEDEGAN). Informe final ciclo II 2016. Coordinación regional Boyacá. (Ed) FEDEGAN. Tunja, Boyacá, Colombia. Pp 22. 2016.
- [7] FELMER, R.; ZÚÑIGA, J.; LÓPEZ, A.; MIRANDA, H. Prevalencia y distribución espacial de brucelosis, leucosis bovina, diarrea viral bovina y rinotraqueítis infecciosa bovina a partir del análisis ELISA de estanques prediales en lecherías de la IX Región, Chile. **Arch. Med. Vet.** 41:17-26. 2009
- [8] INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). Censo Nacional Agropecuario 2016. Bogotá, Colombia. En línea: <https://www.ica.gov.co/getdoc/8232c0e5-be97-42bd-b07b-9cdbfb07fcac/Censos-2016.aspx>. 13-04-2018
- [9] INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). Resolución 7231 "Por medio de la cual se establecen las medidas sanitarias para la prevención, control y erradicación de Brucelosis en las especies bovina, bufalina, ovina, caprina, porcina y equina en Colombia". Bogotá, Colombia. 2017. En línea: <https://www.ica.gov.co/getattachment/7a6ab972-d22d-4c70-9421-bb2a7199df88/2017R7231.aspx>. 17-04-2018
- [10] INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES (IDEAM). Consulta y descarga de datos hidrometeorológicos 2018. En línea: <http://www.ideam.gov.co/>. 05-05-2018
- [11] MÁLAGA, H. Cualificación y Cuantificación de la Enfermedad-Estudios Epidemiológicos de Factores de Riesgo. **Epidem. Vet.** 47: 191-193. 2010.
- [12] MARIÑO, O.C. Brucelosis metodologías diagnosticas e interpretación de resultados. **Rev. MVZ Córdoba**. 5: 57-60. 2005.
- [13] MEZA, C.; MORALES, S.; ARA, M.; MANCHEGO, A.; CALLE, S.; ANGULO, C. Seroprevalencia de brucelosis bovina en el distrito de Puerto Inca, Huánuco. **Rev. Investig. Vet. Perú**. 21: 223-226. 2010.
- [14] MORRIS, T. Multiple Experiments. **Experimental Design and Analysis in Animal Sciences**. CABI Publishing (Ed.). New York. USA. Pp. 156-165. 2015
- [15] NDEGU, M.; MATOPE, G.; WICHATITSKY, M.; TIVAPASI, M.; SCACCHIA, M.; BONFINI, B.; MUBIKA, D. Seroprevalence of brucellosis in cattle and selected wildlife species at selected livestock/wildlife interface areas of the Gonarezhou National Park, Zimbabwe. **Prev. Vet. Med.** 146: 158-165. 2017.
- [16] ORJUELA, R.; ANDREWS, E.; GONZÁLEZ, A.; DONOSO, G.; OÑATE, A. *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategia de prevención basadas en ácido nucleicos. **Arch. Med. Vet.** 38:7 – 18. 2016.
- [17] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Manual de Procedimientos. **Técnicas de diagnóstico de Brucelosis**. OMS. Pp 16-19. 2016.
- [18] CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (PANAF-TOSA/OPS/OMS). Análisis de Situación de los Programas Nacionales de Prevención de Brucelosis y Tuberculosis por *M. bovis*. Reunión Inter-Agencial. Informe final. Ciudad de México, DF. Pp.7-10. 2017
- [19] PATHAK, A.D.; DUBAL, Z.B.; KARUNAKARAN, M.; DOJAD, S.P.; RAORANE, A.V.; DHURI, R.B.; BALE, M.A.; CHAKURKAR, E.B.; KALOREY, D.R.; KURKURE, N.V.; BARBUDDHE, S.B. Apparent seroprevalence, isolation and identification of risk factors for brucellosis among dairy cattle in Goa, India. **Comp. Inm. Micr. Infec. Dis.** 47: 1-6. 2016.
- [20] PEÑA, A.; CERVINI, J.; PADILLA, L.; DELGADILLO, J. Prevalencia de Brucelosis bovina en la región de producción lechera de Jalisco, México. **Rev. Iber. Cien.** 1: 245-252. 2004.
- [21] PRAUD, A.; DURÁN, M.; FRETIN, D.; JAY, M.; O'CONNOR, M.; STOURNARA, A.; TITTARELLI, M.; TRAVASSOS, I.; GARIN, B. Evaluation of three competitive ELISAs and a fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis. **Vet. J.** 216: 38-44. 2016.
- [22] PUTT, S.; SHAW, A.; WOODS, A.; TYLER, L. Sampling techniques in epidemiological studies. **Veterinary Epidemiology and Economics in África**. Pp. 9-11. 2011.
- [23] QUIJADA, T.; GÓMEZ, G.; LÓPEZ, G.; GARCÍA, G.; MARCHÁN, V.; CARUCÍL P. Prevalencia serológica de Brucelosis en bovinos de la parroquia Moroturo, municipio Urdaneta, estado Lara. **Gac. Cien. Vet.** 10: 1-4. 2004.
- [24] TIQUE, V.; GONZÁLEZ, M.; MATTAR, S. Seroprevalencia de *Brucella abortus* en Bovinos del Departamento de Córdoba. **Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.** 12: 51-59. 2009.