

Revista Científica y Tecnológica UPSE

Monitoreo de *Brucella mellitensis* en la población de cabras “Chuscas” de la provincia de Loja-Ecuador

Monitoring of *Brucella mellitensis* in the "Chuscas" goat population in the province of Loja-Ecuador



Franklin A. Román-Cárdenas¹ <https://orcid.org/0000-0003-4382-5558>, Melania L. Uchuari-Pauta¹ <https://orcid.org/0000-0002-1598-5952>,
Edgar L. Aguirre-Riofrío² <https://orcid.org/0000-0002-3251-5805>

¹Centro de Biotecnología,

²Carrera de Medicina Veterinaria Universidad Nacional de Loja, Ecuador.

Resumen

*La Brucelosis es una enfermedad infecciosa producida por *Brucella mellitensis*, siendo la causa más importante de aborto en cabras. En la provincia de Loja, al sur del Ecuador, se encuentra la mayor población de caprinos del país, que también reporta la presencia de abortos; en razas de tipo especializado se han realizado trabajos aislados para determinar la presencia de esta bacteria, sin embargo, del nicho de animales criollos no se dispone de información sanitaria realizada, el presente estudio se realizó con el objetivo de monitorear si una de las causas de los abortos en la cabra chusca criolla es la *B. mellitensis*, se levantó información epidemiológica por tres meses registrándose el 66.5% de abortos en los animales muestreados, se realizó el diagnóstico de *B. mellitensis* por medio de técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR, amplificando un fragmento de 731 pb sin registrarse amplificación del fragmento de *Brucella* investigado.*

Abstract

*Brucellosis is an infectious disease produced by *B. mellitensis*, being the most important cause of abortion in goats. On the province of Loja in southern Ecuador is the largest population of goats in the country, which also reports the presence of abortions, in breeds of specialized type isolated works have been carried out to determine the presence of this bacterium, however, from the niche of creole animals there is no health information available, the present study was carried out with the aim of monitoring if one of the causes of abortions in The Creole Chusca goat is *B. mellitensis*, epidemiological information was collected for three months registering 66.5% of abortions in the sampled animals, the diagnosis of *B. mellitensis* was made using the PCR polymerase chain reaction technique, amplifying a fragment of 731bp without recording amplification of the brucella fragment investigated.*

Palabras clave:

Brucella mellitensis, abortos, cabra chusca

Keywords:

Brucella mellitensis, abortions, chusca goat

Recibido: 11/05/2020

Aceptado: 12/06/2020

Publicado: 30/06/2020

Forma de citar: Román-Cárdenas, F.; Uchuari-Pauta, M.; Aguirre-Riofrío, E. (2020). Monitoreo de *Brucella mellitensis* en la población de cabras “Chuscas” de la provincia de Loja-Ecuador. Revista Científica y Tecnológica UPSE, 7(1) pág. 8-13. DOI: 10.26423/rctu.v7i1.525

* Autor para correspondencia: franklinroman11@gmail.com

1. Introducción

En la provincia de Loja, en la región Sur del Ecuador, se encuentra la mayor población de caprinos del país, su crianza se da a nivel de pequeños productores en sistemas extensivos, en donde el productor aprovecha la carne, la leche, la piel, el excremento; en estos ambientes prolifera la cabra “Chusca” de la provincia de Loja, que es un animal criollo, de gran rusticidad adaptada perfectamente al medio árido y semiárido del bosque seco, la conservación de este recurso ha generado en los últimos años investigaciones de gran importancia en la caracterización faneróptica, morfológica, genética, sin embargo no existe información sanitaria o de métodos o técnicas utilizadas para el diagnóstico de enfermedades.

La brucelosis es una enfermedad infecciosa abortiva, causada por una bacteria del género *Brucella*, la OIE [1] ha reportado *B. melitensis.*, en ovejas, cabras y en otras especies animales, entre el 2006 y 2015, 931.913 casos a nivel mundial, en este periodo Europa registra el mayor número de casos 614.266, en los animales afecta el tracto reproductor, ocasionando infertilidad, abortos o nacimiento de crías débiles [2-3]. Es también considerada la zoonosis más importante [4] que se transmite por contacto directo con animales o a través de fluidos como orina, sangre, semen, secreciones vaginales, heces, luego de abortos o partos a término por fluidos uterinos y la placenta [5-3], por aerosoles infectantes, consumo de leche y subproductos lácteos no pasteurizados, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informa que 4 de cada 10 habitantes viven en zonas donde se reconoce la presencia de la enfermedad [7].

El elevado porcentaje de abortos, el desconocimiento de las causas, la conservación de este recurso genético en condiciones sanitarias adecuadas, la investigación de esta bacteria por las afectaciones que ocasiona y su carácter zoonótico, son razones de importancia para realizar este estudio constituyéndose en el primer trabajo de investigación en los caprinos criollos.

2. Materiales y métodos

Área geográfica en estudio

Las muestras obtenidas para este estudio se recolectaron del bosque seco de la provincia de Loja, en el cantón Zapotillo, que tiene una temperatura promedio anual de 25.6 °C., del cantón Paltas en el valle de Casanga que tiene una temperatura promedio anual de 24 °C., del cantón Sozoranga, con una temperatura promedio anual de 18°C., y, del cantón Macará, de temperaturas entre 19 a 31°C

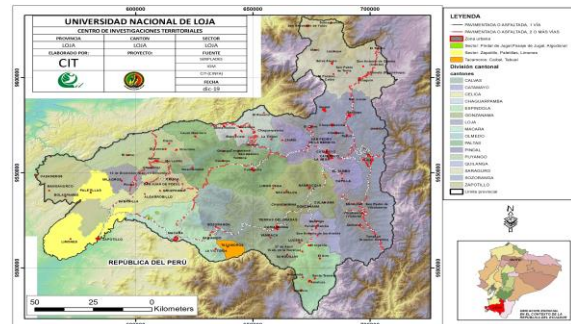


Figura 1. Área geográfica del estudio

Población estudiada

Según ESPAC [8] 2018 la población de caprinos en la provincia es de 14953 de esta población, el 15% corresponden a animales criollos, lo que da una población de 2243 animales, de esta población el 65% son hembras (1346), las cabras en edad reproductiva corresponden al 40% (538). Para el cálculo de la muestra se utilizó el programa Epidad 4.2, con un margen de error de 12% y un NC DEL 95%, correspondiendo muestrear 60 cabras con un método de muestreo por conveniencia.

Toma de muestras

De cabras se extrajeron muestras de sangre total, con agujas de doble punta estéril, en tubo plástico tapa lila con vacío, para las pruebas de biología molecular, antes de tomar la muestra, se rotulo el tubo y se ingresó a la plantilla la respectiva identificación del animal, se llenó el tubo de sangre en sus 2 (dos) tercios tomando la muestra de la vena yugular y evitando movimientos bruscos, se colocaron en gradillas de espuma flex, se llevaron a conservación a -20 °C hasta su procesamiento

Extracción de ADN

Se realizó en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Nacional de Loja, mediante el procedimiento manual de extracción según Romero y colaboradores 1995 [9], con adaptaciones a partir de 200 ul de sangre entera, la cuantificación se realizó en el Nano Drop 2000 y las pruebas de integridad de ADN se realizó en gel de agarosa al 1%

Detección de *B. melitensis* mediante PCR

Se optimizó la PCR en la que se utilizaron primers que amplifican un fragmento de 731 pb. *B. melitensis-specific primer 5'-AAA, TCG, CGT, CCT, TGC, TGG, TCT, GA-3'*. IS711-specific primer 5'-TGC, CGA, TCA, CTT, AAG, GGC, CTT, CAT-3' [10]. La preparación de la PCR se realizó a 25 ul en base a los siguientes parámetros.

Tabla 1. Cantidades requeridas de los reactivos para la preparación de la PCR [10].

Reactivo	C. Stock	C. Requerida	Mix (uL)	xn *1
Buffer	10 X	1x	2.5 uL	
dNTPs	10mM	0.3mM	0.5 uL	
MgCl2	25mM	1.5 mM	1.5 uL	
Primer F	10uM	2 uM	0.5 uL	
Primer R	10uM	2 uM	0.5 uL	
Taq P	5 U/uL	1 U	0.2 uL	5.7 uL
ADN	50 ng/uL	30 ng/uL	2 uL	2 uL
H2O			17.3 uL	17.3 uL
				25 uL

Los parámetros de amplificación fueron: Desnaturalización inicial 95°C/ 3 min. 35 ciclos de desnaturalización a 95°C/1 min, alineamiento a 64 °C/1 min, extensión a 72°C/ 1 min; y con una extensión final a 72°C/ 5 min, [10]. la amplificación se la realizó en el termociclador Bio Rad Icycler.

Para la electroforesis, se preparó un gel con TBE al 1X, agarosa al 1,5 %, adicionando 0.7 ul de Syber safe, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb y los productos de PCR 0,8 ul de cada uno se combinaron con 0,2 ul de blue juice para ser depositados en cada pocillo del gel. Se programó la fuente de poder y se realizó la corrida durante 80 min a 80 voltios. La visualización del gel de electroforesis se realizó mediante el sistema de documentación ENDURO™ GDS Touch.

3. Discusión y resultados

Encuesta epidemiológica

De los sesenta animales muestreados, cuarenta registran abortos

Tabla 2. Abortos registrados en las cabras muestreadas

Animales muestreados	X Edad	Raza	Total Hembras con aborto	%	X abortos por animal
	Años				
Total					
60	3.1	Chusca	40	66.7	1.05

Detección de *B. mellitensis* por PCR

De las 60 muestras procesadas no se obtuvieron reactores positivos a la prueba de biología molecular

Tabla 3. Detección de *B. mellitensis* en cabras chuscas

Raza	Cantidad	%	Negativos	%
Chusca	60	100	0	0

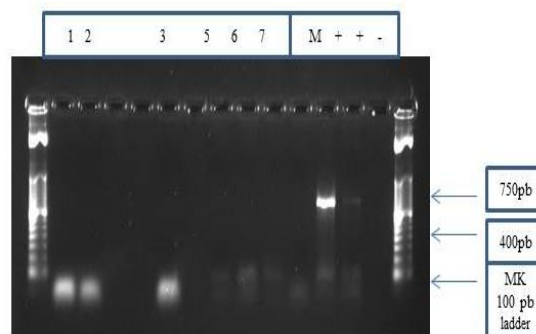


Figura 2. Amplificación del fragmento de 731 pb

En un estudio realizado en los años 2009-2010 en cabras del sector periurbano de Quito registró una seropositividad a brucelosis del 0.05 % [11]. Zabala y colaboradores [12]. investigando *Brucella spp* en la ciudad de Quito obtuvieron un 9,0 % de positividad en leche (PCR), 8,0 % en ganglios (PCR) y 17,8 % en suero (prueba de aglutinación), resultados que confirmaron la presencia de la bacteria en las cabras analizadas

Díaz-Lamiña [13] reportan el 0% de seroprevalencia de brucelosis caprina en Loja, mediante pruebas de biología molecular, en el 2015 Luna-Trueba [14], detectaron, por primera vez, *B. melitensis* (2% de las muestras), en este estudio no se detectó la presencia de *B. mellitensis* en las muestras procesadas por PCR, sin embargo, se da cuenta de un problema abortivo de consideración en estos animales que debe ser investigado.

El 66.5% de abortos registrados mediante la encuesta epidemiología se relaciona posiblemente con el reporte de Mellano [15] en México, que en las zonas áridas y semi áridas existen un máximo del 70% de pérdidas fetales. Mellano and Pastor, [16] mencionan que las pérdidas por abortos constituyen la principal falla reproductiva de los caprinos en sistemas extensivos donde se presenta una restricción alimenticia durante la gestación, que obedece a la particular estrategia reproductiva de la cabra, la cual “responde” al estímulo del macho, aun con bajas reservas corporales de energía, y una vez gestante, la cabra continúa o suspende la preñez, según la disponibilidad de nutrientes.

4. Conclusiones

Se determinó por medio de la encuesta epidemiológica el 66.5% de abortos en cabras criollas de las zonas estudiadas, mediante la prueba molecular no se detectó la presencia de *B. mellitensis*, que es la que ocasiona el mayor porcentaje de abortos en esta especie animal.

5. Recomendaciones

Los estudios posteriores deben investigar otras causas infecciosas sin dejar de lado las causas no infecciosas que podrían estar afectando la reproducción en las cabras criollas de la zona.

6. Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Loja y a los estudiantes de noveno módulo de la asignatura de manejo reproductivo en rumiantes, periodo abril – septiembre 2019 de la carrera de Medicina Veterinaria.

7. Referencias

- [1] OIE 2017 Sanidad Animal Mundial disponible en <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/sanidad-animal-mundial/>
- [2] Smith PB. 2010. Medicina interna de grandes animales. 4º ed. Madrid: Elsevier Mosby. 1868 p
- [3] Díaz A. 2013. Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. México DF. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 2013, 32 (1), 43-51
- [4] Román D., Martínez D., Villagómez J., Peniche A., Morales J., y Flores R., 2017 Epidemiología de la brucelosis caprina en la Zona Centro del Estado de Veracruz Gac Med Mex. 2017;153:26-30
- [5] Carlosama, M. 2013 Aislamiento y biotipificación de *Brucella* spp., de reservorios animales seropositivos, en el centro de faenamiento de Tulcán. Quito.
- [7] Paredes S. 2012. Determinar la prevalencia de brucelosis bovina y factores de riesgo en la parroquia Alluriquin, recinto Cristal de Lelia” Tesis ESPE Santo Domingo.
- [8] ESPAC Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua 2018 INEC <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>
- [9] Romero C, Pardo M, Grillo MJ, Diaz R, Blasco JM, López IG. Evaluation of PCR for diagnosis of brucellosis in diary cattle. J Clin Microbiol 1995;(33)12:3198–3200.
- [10] Bricker B.J. and 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.
- [11] Ron, J.; Barzallo, D.; Gonzalez P.; Minda E.; BervensD.; Benitez, W.; Brandt, J.; Saegerman, C. 2012. “Sero-prevalencia de *Brucella* spp., en cabras de los cantones Quito y Zapotillo.”II Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical. Junio 2012
- [12] Zabala, C.; Barragán V.; Trueba G.; Presencia de *Brucella* spp. en cabras de la ciudad de Quito, provincia de Pichincha, Ecuador Editado por/Edited by: D. F. Cisneros-Heredia Revista Ciencias e Ingenierías
- [13] Díaz L. and Lamiña O. 2013 Determinación de la seroprevalencia y análisis de factores de riesgo de brucelosis en bovinos, en las provincias de Zamora Chinchipe, Loja y el Oro Tesis UCE
- [14] Trueba G., Luna L. 2015 Detecting *brucella* species in Ecuador disponible en <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/4486>
- [15] Mellado, M.; Gonzalez, H.; Garcia, J. 2001 Body traits, parity and number of fetuses as risk factors for abortion in range goats. Agrociencia, v. 35, p. 124-128
- [16] Mellado M y Pastor F., 2006 Aborto no infeccioso en caprinos Departamento de Nutrición y Alimentos, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México.