

**Universidad Nacional
Facultad Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Determinación de la presencia de brucelosis en el Hato Caprino
Costarricense**

**Tesis para optar por el Grado Académico de Licenciatura en Medicina
Veterinaria**

Andrea Esquivel Suárez

**Tutor: Dr. Danilo Montero Caballero
Co-tutora: Dra. Gabriela Hernández Mora**

Lectores:

**Dr. Edgardo Moreno Robles
Dr. Juan José Romero Zuñiga**

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2015

Tribunal Examinador:

M.Sc. María Antonieta Corrales Araya (Decana) Firma _____

Dra. Laura Bouza Mora (Subdirectora) Firma _____

Dr. Danilo Montero Caballero (Tutor) Firma _____

Dra. María Gabriela Hernández Mora (Co-tutora) Firma _____

Dr. Juan José Romero Zúñiga (Lector) Firma _____

Fecha: _____

DEDICATORIA

Primeramente a Dios por ser mi motivación y mi fortaleza, sin Él no hubiera podido realizar mi gran sueño de ser médica veterinaria y por haberme dado una Palabra para poder estudiar esta carrera, la cuál fue la que me dio la fuerza y esperanza en momentos difíciles.

“El temor y el miedo de vosotros estarán sobre todo animal de la tierra, y sobre toda ave de los cielos, en todo lo que se mueva sobre la tierra, y en todos los peces del mar, en vuestra mano son entregados”. Génesis 9:2

A Maikel, mi esposo por ser mi gran compañero, amigo, consejero, y por siempre ayudarme y motivarme para seguir adelante.

A mis padres por su ayuda y apoyo para poder estudiar esta carrera.

A mi hermana por su compañía y aliento, para nunca desfallecer.

A Hansell y Martha (mis pastores) por siempre orar por mí, por sus sabios consejos y enseñanzas.

A todos los amo mucho...

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Gabriela Hernández y personal del SENASA por toda su ayuda brindada.

Al Dr. Danilo Montero por haberme dado la oportunidad de hacer este proyecto y por toda su colaboración para la coordinación de las giras a campo.

A mis lectores Dr. Edgardo Moreno y Dr. Juan José Romero por el tiempo que dedicaron para ayudarnos a realizar esta investigación.

A mis amigos Osvaldo, Martita y Fernanda por compartir tantos momentos inolvidables de la carrera.

A todos mis profesores y personal de la Escuela de Medicina Veterinaria, por todas sus enseñanzas, consejos y cariño.

A Pily, Brandon, Cirilo, Lulú, Mirrus, Hilary, Bruno, Sammy, Manchas, Kala, Sofy, y todos los demás animalitos que Dios ha puesto en mis manos a lo largo de mi carrera, gracias por haberme enseñando tanto, especialmente gracias por haber dejado una marca tan grande en mi corazón y el deseo de querer ser una excelente médica veterinaria.

RESUMEN

Brucella melitensis es la especie más virulenta dentro del género *Brucella* para los seres humanos, y es el principal agente causal de la brucelosis en cabras. En Costa Rica no se ha notificado caprinos con aislamiento de esta u otras especies de *Brucella*; sin embargo, tampoco se hace vigilancia pasiva o activa de estos hatos a nivel nacional. El objetivo de este estudio fue conocer la presencia o ausencia de brucelosis en los caprinos del país. Para este fin se analizaron 424 cabras procedentes de las diferentes regiones a nivel nacional.

El diagnóstico serológico se llevó a cabo utilizando la técnica de aglutinación Rosa de Bengala (RB), ELISA competitivo (c-ELISA), ELISA indirecto (i-ELISA) y la prueba de Polarización de Fluoresceína (FPA).

Del total de los animales analizados, utilizando la prueba de RB (30 µl de reactivo con 30 µl de suero) seis cabras (1.4%) resultaron positivas, mientras que realizando la modificación recomendada por la OIE para caprinos (25 µl de reactivo y 75 µl de suero), 17 cabras (4.0%) resultaron positivas. Ninguna de las muestras resultó positiva para las pruebas i-Elisa, c-Elisa y FPA y por lo tanto, se estima que de existir brucelosis en el hato caprino nacional estaría en menos de 0.5% de los animales. Estos resultados confirman la importancia de realizar pruebas complementarias a la hora de realizar el diagnóstico de una enfermedad, y a su vez justifica la necesidad de realizar una vigilancia continua en esta especie, estableciendo medidas de

prevención y control de brucelosis, fortaleciendo dicho sector productivo lo cual favorece la comercialización de estos animales y sus subproductos a nivel nacional y regional.

ABSTRACT

Brucella melitensis is the most virulent specie within the genus *Brucella*, the main causative agent of zoonosis and brucellosis in goats. Costa Rica has not been reported with isolations of this and other species of *Brucella*. However neither passive or active monitoring for brucellosis has been performed these herds. The aim of this study was to determine the presence or absence of serological evidence of brucellosis in goats in Costa Rica. For this purpose 424 goats from different nationwide were analyzed.

Serological diagnosis was performed using Rose Bengal agglutination test (RB), competitive ELISA (c-ELISA), indirect ELISA (i-ELISA), and Fluorescein test Polarization (FPA).

From all the animals tested, 6 goats (1.4%) were positive by, using the RB (30 ul of reagent with 30 ul of serum), while using the same test with the OIE modification (25 ul of reagent and 75 ul of serum), 17 goats (4.0%) were positive. None of the goat samples resulted positive in the i-ELISA, c-ELISA and FPA tests. According to the results brucellosis if present at all would be less than 0.5% of national goat herds. These results confirm the relevance of using various tests for the diagnosis of brucellosis, and justifies the need for continued vigilance in of *Brucella* infections in order to keep, prevention and control measure. These measures would help to improve the health conditions of the goat herds and support the productive sector, favoring marketing of these animals and their products at national and regional level.

INDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Antecedentes.....	1
1.1.1	<i>Distribución</i>	1
1.1.2.	<i>Etiología</i>	2
1.1.3.	<i>Signos Clínicos en Caprinos</i>	3
1.1.4.	<i>Epidemiología y Transmisión</i>	4
1.1.5.	<i>Patogénesis</i>	5
1.1.6.	<i>Diagnóstico</i>	5
1.1.7.	<i>Realidad Nacional y Comercialización</i>	11
1.2	Justificación.....	14
1.2.1	<i>Importancia</i>	15
1.2.2	<i>Hipótesis</i>	18
1.3.	Objetivos.....	18
1.3.1	<i>General</i>	18
1.3.2	<i>Específicos</i>	19
2.	METODOLOGÍA.....	20
2.1	Materiales y Métodos.....	20
2.1.1	<i>Recopilación de datos de productores caprinos del país.</i>	20
2.1.2	<i>Encuesta Telefónica</i>	20
2.1.3	<i>Muestreo</i>	21
2.1.4	<i>Encuesta en la finca</i>	25
2.1.5	<i>Procesamiento de las muestras</i>	27
2.1.6	<i>Banco de sueros</i>	30
2.1.7	<i>Análisis de Datos</i>	31
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.	CONCLUSIONES.....	47
5.	RECOMENDACIONES	49

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
7. ANEXOS	61
7.1 Anexo 1	61
7.2 Anexo 2	63

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Número de Fincas y animales muestreados por región.....	24
Cuadro 2. Resultados de las pruebas de laboratorio por finca	34
Cuadro 3. Resultados de i-ELISA, c-ELISA y FPA de las muestras positivas y negativas aportadas por el PIET.....	36
Cuadro 4. Probabilidad de resultados positivos globales por prueba.....	37
Cuadro 5. Probabilidad de resultados positivos en cada una de las fincas por prueba.....	38
Cuadro 6. Factores de riesgo por finca	40

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fincas muestreadas por regiones.....	23
Figura 2. Frecuencia de Factores de Riesgo presentes en la finca con respecto a características de la finca y población animal.....	42
Figura 3. Frecuencia de Factores de Riesgo presentes en la finca con respecto al manejo de sanitario y reproductivo.....	43
Figura 4. Frecuencia de Factores de Riesgo presentes en la finca con respecto al manejo de reemplazos	44
Figura 5. Frecuencia de Factores de Riesgo presentes en la finca con respecto a la historia clínica del hato.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ASOOVIAMCO	Asociación Ovicaprina Ambientalista Costarricense.
c-ELISA	Inmunoensayo Enzimático Competitivo.
COOPECAPRINA	Cooperativa de Productores de Leche de Cabra de la Zona Norte. R.L.
D.O	Densidad óptica.
ELISA	Inmunoensayo Enzimático.
FAO	Organización para los Alimentos y la Agricultura.
FPA	Prueba de Fluorescencia Polarizada.
i-ELISA	Inmunoensayo Enzimático Indirecto.
IgG 1	Inmunoglobulina G1.
IgM	Inmunoglobulina M.
LANASEVE	Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios.
LPS	Lipopolisacárido.
mAb	Anticuerpo monoclonal de ratón.
mP	Unidades de polarización.
nm	Nanómetros.
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
pH	Coficiente del grado de acidez o basicidad de una solución acuosa.
PI	Porcentaje de inhibición.
RB	Prueba Rosa Bengala.
SCAHAW	Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare.
SENASA	Servicio Nacional de Salud Animal.
SIREA	Sistema Integrado de Registro de Establecimientos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 Distribución

La brucelosis es una enfermedad zoonótica causada por bacterias del género *Brucella* que afecta a mamíferos terrestres, mamíferos marinos y al ser humano (Moreno y Moriyón, 2002; Blasco, 2004). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización para los Alimentos y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), es una de las zoonosis más importantes en el mundo, responsable de uno de los más grandes problemas sanitarios actuales especialmente en los países mediterráneos, en el norte y este de África, en el Oriente Medio, en Asia Central y Sur, en Centro y Sur América (Crespo, 1994; FAO et al., 2006).

En Estados Unidos, aunque es un país declarado libre de la enfermedad, durante el 2002 se reportó un brote de *B. melitensis* en Texas y Colorado (Pugh, 2002). Otros países como Ecuador, durante abril del 2012, detectaron la bacteria en muestras de leche de cabra, sin hervir, en ventas callejeras (USFQ, 2012). Además, se han reportado casos de *B. melitensis* en cabras de países del medio oriente como Pakistán, India, y sur de Europa, África, así también en México y varias regiones de América del Sur (Matthews, 2009).

Con respecto a México que es un país que presenta altos porcentajes de brucelosis, en las diferentes explotaciones ganaderas, en los hatos caprinos se reporta de un 9.8 a un 63.7% de prevalencia de esta enfermedad (Moreno et al., 2002; Solorio et al., 2007). En Paraguay en el 2002 se reportó la presencia de *B. melitensis* biovar 1 y 2 y se notificó casos de esta zoonosis con un aislamiento identificado como *B. melitensis biovar 1* en un paciente humano adulto (Moreno, 2002). En Argentina, la prevalencia de brucelosis en caprinos alcanza el 25%, donde ha sido aislada *B. melitensis* biovar 1 (Samartino, 2002). En Centroamérica *B. melitensis* ha sido aislada de ovinos y humanos en Guatemala y se sospecha de su presencia en Panamá (Moreno, 2002). En el Salvador, el 80% de la población ovina y caprina no tiene anticuerpos contra *Brucella* spp., lo que sugiere la ausencia de *B. melitensis* en este país (Moreno, 2002). Con lo que respecta a España, desde hace una década se registran 1500 casos de brucelosis humana al año, ésta enfermedad infecciosa, afecta a casi todas las especies de animales de granja y se transmite muy fácilmente al hombre (López, 2010).

1.1.2. Etiología

Las especies de *Brucella*, morfológicamente son cocobacilos de 0.5 a 0.7 μm de diámetro y 0.6 a 1.5 μm de longitud, aeróbicos, inmóviles, no esporulados, no encapsulados, oxidasa positivos, catalasa positivos y productores de ureasa y ácido sulfhídrico (Carter y Wise, 2004; Romero, 2007). Las diez especies reconocidas actualmente dentro de este género poseen

especificidad por su hospedero natural; sin embargo, puede afectar a otras especies de mamíferos de manera accidental. *Brucella melitensis* infecta, principalmente, a las cabras y las ovejas, además es la especie que posee mayor patogenicidad para los seres humanos. Otras dos especies con importancia zoonótica son *B. abortus* y *B. suis* que infectan a vacas y cerdos respectivamente. *Brucella canis* infecta a perros y posee una patogenicidad baja en seres humanos, *Brucella ovis* infecta ovejas y *Brucella neotomae* infecta roedores de desierto, estas dos especies no han sido reportadas como zoonóticas (Moreno, 2002; Carter y Wise, 2004).

Hasta el momento se han descrito dos especies de *Brucella* que infectan mamíferos marinos, la primera de ellas *B. pinnipedialis* en pinnípedos (focas, leones marinos y morsas) y la segunda *B. ceti* causando enfermedad en cetáceos (delfines, ballenas y marsopas) (Foster et al., 2007). En el año 2008, se describe las dos últimas especies incluidas dentro del género *Brucella*, *B. microti* aislada de un roedor (*Microti arvalis*) y *Brucella inopinata* aislada de implantes de seno de una mujer, así como otro paciente con una infección pulmonar. Hasta el momento su reservorio se desconoce (De et al., 2008; Scholz et al., 2008).

1.1.3. Signos Clínicos en Caprinos

En el caso de *B. melitensis*, las cabras presentan signos clínicos como abortos durante el último trimestre de la gestación, fiebre, depresión, letargo, pérdida de peso, diarrea, mastitis,

metritis, placentitis, disminución de la producción de leche, laminitis, higroma y problemas de orquitis en los carneros (Pugh, 2002; Matthews, 2009).

1.1.4. Epidemiología y Transmisión

En el caso de los machos *Brucella* se excreta por el semen y en el caso de las hembras por leche. La bacteria se localiza también en la sangre, orina, heces, placenta, fetos y descargas vaginales (dos o tres meses tras el parto o el aborto), por lo que se encuentra muy comúnmente en el suelo y pasto, donde pueden infectar a otros animales al ingerir agua o pasto contaminado, ya que la bacteria es muy resistente y puede permanecer viable durante mucho tiempo en el pasto, suelo, polvo, alimentos y estiércol (Smith y Sherman, 2009). Se debe destacar que en condiciones de humedad la bacteria sobrevive por más tiempo.

Los recién nacidos que sobreviven pueden encontrarse infectados ya que la bacteria puede transmitirse de manera intrauterina (Songer y Post, 2005) o durante el parto por el consumo de leche, y al nacer se convierten en portadores que pueden almacenar dicha bacteria, convirtiéndose en una fuente de contaminación (Crespo, 1994).

B. melitensis es considerada como la bacteria causante de cuadros más severos en los seres humanos (SCAHAW, 2001), quienes se infectan cuando entran en contacto con animales infectados o sus secreciones como anteriormente se había mencionado, por lo que los veterinarios y finqueros constituyen uno de los grupos que presentan mayor riesgo de contagio

(SCAHAW, 2001; Blasco, 2004). El público en general puede contaminarse por consumo de leche y sus derivados no pasteurizados (Moreno y Moriyón, 2006).

1.1.5. Patogénesis

En los animales adultos, el organismo ingresa, por la membrana mucosa como por ejemplo al ingerir la placenta infectada, también puede hacerlo por vía conjuntival, por inhalación de polvo o aerosoles, por penetración directa en la piel y ocasionalmente ocurre por vía venérea. Una vez introducido el agente, se localiza en los ganglios linfáticos más próximos, ocasionando una hiperplasia reticuloendotelial y linfática, luego la bacteria se disemina vía linfática o por sangre causando una bacteremia. Posteriormente la bacteria se localiza en bazo, ganglios linfáticos, ubre, placenta, útero, testículos, epidídimo, ocasionando una inflamación granulomatosa, donde empieza a observarse los diferentes signos clínicos (Smith y Sherman, 2009).

1.1.6. Diagnóstico

Actualmente se cuenta con diversas técnicas para el diagnóstico de la brucelosis. Todas estas técnicas se encuentran dentro de las pruebas prescritas, las cuáles se exigen en el Código Sanitario para los animales terrestres de la OIE, para el transporte internacional de animales y productos de origen animal. Además se consideran como las más adecuadas para determinar el

estado sanitario de los animales, dichas pruebas son: BBAT (Prueba con antígeno de *Brucella* tamponado), ELISA (Inmunoensayo Enzimático) y por último, la prueba de FPA (Prueba de Polarización de la Fluoresceína) (OIE, 2012).

Los métodos de diagnóstico indirectos se basan en la respuesta inmunológica frente a antígenos de *Brucella*, dentro de estos métodos se incluyen las técnicas serológicas como las pruebas de Aglutinación en placa con antígeno de Rosa de Bengala (RB), válida para detectar anticuerpos anti-*Brucella* en caprinos.

La técnica de RB, sumada a otras pruebas complementarias, permite su aplicación como prueba calificativa de diagnóstico y vigilancia epidemiológica en áreas y hatos libres de infección brucelar (Acosta y Ortiz, 2005). Además, constituye actualmente la base del diagnóstico serológico de la brucelosis animal en los laboratorios oficiales del SENASA y se aplica a todos los sueros como método de tamizaje, que permite discriminar rápidamente entre los animales seronegativos de los animales seropositivos, con la finalidad de que a estos últimos se les apliquen las pruebas confirmatorias (Crespo, 1994; OIE, 2012).

Esta prueba utiliza un antígeno tamponado con un pH de 3.65 ± 0.05 , (éste pH se obtiene por la adición de ácido láctico), posteriormente es teñido con colorante rosa bengala. Este antígeno posee un contenido celular de *B. abortus* de las cepas en fase lisa, comprendido entre el 8 y el 15% de su volumen total (Crespo, 1994; OIE, 2012). El fundamento de esta prueba se basa en la inhibición- inactivación de algunas aglutininas inespecíficas a pH bajo (factor determinante

de la especificidad de la prueba, ya que el bajo pH de este antígeno evita la actividad de los anticuerpos que aglutinan inespecíficamente su contenido celular, interviniendo solo los específicos pertenecientes a los isotopos IgM e IgG1) (Crespo, 1994; OIE, 2012). Es una prueba cualitativa, muy sensible y su positividad o negatividad persiste por mucho tiempo. Los anticuerpos tienen la capacidad de unirse a dos antígenos y éstos a su vez se unen a varios anticuerpos, formando una malla entrelazada, la cual se observa como una aglutinación en la muestra (Acosta y Ortiz, 2005). Según la Unión Europea, se recomienda aumentar su sensibilidad para sueros caprinos y ovinos utilizando tres partes de suero por una parte del reactivo (SCAHAW, 2001; OIE, 2012).

Otra prueba es el ensayo enzimático indirecto (i-ELISA), ésta se basa en la detección de anticuerpos, en particular de la clase IgG1 contra el lipopolisacárido (LPS), que se usa como antígeno. Esta molécula situada en la membrana externa, es común para todas las especies de brucelas lisas, por lo que se puede usar para el diagnóstico de cualquier infección causada por estas especies (Gall et al., 1998). El LPS es altamente inmunogénico y constituye el antígeno más importante de las brucelas, generándose gran cantidad de anticuerpos contra esta molécula durante las infecciones (Moreno, 2004). Esta molécula es anfipática y está constituida por tres secciones: la cadena O de carácter hidrofílico, que es la porción que posee los epítomos comunes de N-formil perosamina con los que reaccionan los anticuerpos, el

oligosacárido central de ketosas y aminoazúcares, y el lípido A hidrofóbico. Esta última sección es la que permite que el LPS se adhiera sin dificultad a los platos de ELISA, para ser detectado luego por anticuerpos (Moreno, 2004).

Si la muestra es positiva los anticuerpos anti- *Brucella*, formarán un complejo antígeno-anticuerpo; un conjugado multi-especie marcado a la peroxidasa (HRP) es distribuido en los pocillos, éste se fija a los anticuerpos anti- *Brucella* formando un complejo antígeno-anticuerpo-conjugado-HRP. Luego la reacción es revelada mediante una solución de revelación (TMB), la coloración que resulta está ligada a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en las muestras a analizar. La lectura es realizada con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Otra prueba utilizada para el diagnóstico de Brucelosis es el Elisa Competitivo (c-ELISA), esta prueba consiste en un ELISA de competición que utiliza un anticuerpo monoclonal específico para una porción de la cadena “O” del S-LPS de *Brucella*, que compite con los anticuerpos del suero por el antígeno fijo en el soporte sólido. Este procedimiento está basado en la detección de anticuerpos séricos contra brucelas lisas incluídas *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*, y es un ensayo multi-especie que permite la detección de anticuerpos de *Brucella* específicos en especies domésticas y salvajes (Acosta y Ortiz, 2005; SVANOVA, 2014). En esta prueba, la muestra se expone al lipopolisacárido liso de *Brucella abortus* (S-

LPS), en conjunto con un anticuerpo monoclonal de ratón (mAb) específico para un epitopo en la parte de-o polisacárido del antígeno S-LPS (SVANOVA, 2014). Después de un periodo de incubación, la microplaca se lava y se le adiciona el conjugado, que se une al mAb unido a la S-LPS en la placa. Luego se realiza la lectura a 450 nm (SVANOVA, 2014).

A diferencia del ELISA indirecto en el que el desarrollo de color indica la presencia de anticuerpos en la muestra, en el ELISA competitivo el desarrollo de color indica la ausencia de éstos y la unión, por lo tanto, del mAb al LPS (SVANOVA, 2014).

La prueba de fluorescencia polarizada (FPA), es una prueba cualitativa de diagnóstico de brucelosis, utilizada para determinar la presencia de anticuerpos contra especies lisas del género *Brucella*. El fundamento de esta prueba consiste en la habilidad de las moléculas de rotar con una velocidad determinada, utilizando el antígeno que se marca con isocianato de fluoresceína y luego es excitado por un plano de luz polarizada a una longitud de onda apropiada. El rango de rotación de la molécula del antígeno disminuye cuando se une a los anticuerpos (Lucero et al., 2008; Diachemix, 2010). Este ensayo se expresa en unidades de polarización (mP) que indican la presencia de anticuerpos en la muestra (Lucero et al., 2008).

Existen reportes de patógenos con similitudes antigénicas que pueden producir reacciones serológicas cruzadas con especies del género *Brucella*, dificultando el diagnóstico de dicha

bacteria (Crespo, 1994; Blasco, 2004), entre ellas se menciona *Francisella tularensis*, *Pseudomona maltophila*, los serotipos del grupo N del género *Salmonella*. Además, la literatura describe que mediante el análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución, se establecieron similitudes de determinados epitopos situados en la porción O-polisacáridica del LPS de *B. abortus*, *B. melitensis*, *E. coli* O 175: H7 y cepas de *E. hermannii* (biogrupo atípico de *E. coli*), y sobre todo con el serotipo 9 de *Yersinia enterocolítica*, el cual posee una cadena O idéntica a la de *B. abortus* biovariedad 1, así como algún determinante antigénico similar de *B. melitensis* biovariedad 1 (Crespo, 1994; Carlos, 2012). Sin embargo, Costa Rica carece de investigaciones para poder establecer la presencia o prevalencia de estos patógenos en el país.

Dentro de estas bacterias que causan reacciones cruzadas mencionadas anteriormente, se encuentran algunas que ocasionan también trastornos reproductivos y abortos, similares a los producidos por *B. abortus* o *B. melitensis*, como los son: varias especies de *Salmonella* y *E. coli* (Diab y Uzal, 2007).

En la prueba de Rosa Bengala se podrían dar resultados falsos positivos por la presencia de flora bacteriana como por ejemplo: *Francisella tularensis*, *Pseudomona maltophila*, *Salmonella* spp., *E. coli* y *Yersinia enterocolítica* en los animales analizados; sin embargo, al

realizar también pruebas complementarias como los ELISAS, los que presentan una elevada especificidad, se disminuye sustancialmente la probabilidad de encontrar falsos positivos en los resultados analizados (Crespo, 1994).

1.1.7. Realidad Nacional y Comercialización

En Costa Rica la brucelosis es considerada como endémica en hatos bovinos; sin embargo, se desconoce la prevalencia de esta enfermedad en los hatos caprinos, por lo tanto, no se sabe si alguna de las especies de *Brucella* podría ser responsable por abortos y problemas reproductivos en caprinos a nivel nacional (Fensterbank, 1986). A pesar de esto, los productos lácteos y subproductos de leche caprina se consumen en el mercado nacional, algunos de ellos sin pasteurizar, lo que implica un riesgo para los consumidores.

La comercialización de la leche caprina en Costa Rica se realiza, principalmente, mediante dos canales de distribución: productor – consumidor y productor – detallista . El primer canal de distribución es el más utilizado y es un mercado informal, que muchas veces se realiza sin el tipo de manejo adecuado (venta en casas, mercados locales y ferias del agricultor). En los últimos años algunos productores y empresas han incursionado en mercados formales con cantidades limitadas de producto (Montero et al.,2006).

A pesar de que en Costa Rica no existe la costumbre de consumir productos caprinos, en los últimos años se ha observado un incremento en el mercado de productos lácteos caprinos (leche y queso), debido principalmente a dos factores: un mayor conocimiento de la población sobre las características nutricionales de los productos caprinos y un incremento en la población inmigrante proveniente de Europa, Norteamérica y Sur América, con una mayor cultura de consumo de estos productos (Montero et al., 2006).

La leche de cabra es un alimento que posee muchas cualidades, por ejemplo, posee un alto valor nutritivo, y ha sido recomendada tradicionalmente por pediatras y geriatras en la alimentación de niños y ancianos, además es de fácil digestión y de composición constante, sus niveles de lactosa son muy bajos y no contiene caseína alfa 1, esta característica es muy importante ya que existe un gran porcentaje de la población que posee intolerancia a la lactosa y sobre todo a la caseína alfa 1, además es rica en hierro, vitaminas y se recomienda en el tratamiento de úlceras estomacales y gastritis (Crespo, 1994; Montero, 2009).

Los subproductos de la leche de cabra, por ejemplo: yogurt, queso y helados, han conquistado, cada vez más, el gusto de los consumidores costarricenses, lo que augura un notable crecimiento por parte de ese sector productivo. En los últimos años se ha introducido

tecnología de alta calidad en el sector caprino lo que ha permitido obtener productos que han llegado a competir con los provenientes de Europa y Estados Unidos (Barquero, 2011).

Además, se debe fortalecer la implementación de prácticas correctas de higiene en hatos caprinos que ayuden al cumplimiento de las distintas normativas y que eviten, en la medida de lo posible, cualquier incidencia con la Seguridad Alimentaria; ofreciendo las suficientes garantías de seguridad en la producción de los alimentos tanto a los propios operadores como a terceros (CCAIE, 2007).

En Costa Rica la mayoría de los animales utilizados en los sistemas de producción caprina presentan rasgos de razas especializadas en la producción de leche, predominando las razas Saneen y Toggenburg, y en menor porcentaje de las razas la Mancha, Franco Alpino y Nubiana (Montero et al., 2006). En cuanto a la producción de leche de cabra a nivel nacional, se estima una productividad promedio de 1.65 litros / cabra por día.

El precio de los productos lácteos caprinos no tiene ningún tipo de regulación, la botella o litro de leche son vendidos por los caprinocultores de acuerdo a sus propias necesidades. Existen algunas instituciones, asociaciones y fábricas de queso, que compran el litro de leche a los productores a un precio que oscila entre 250 y 275 colones el litro (\$0.6 / litro). Si el

productor comercializa directamente la leche, el precio es establecido por cada productor, variando entre 415 y 625 colones (\$1 a \$1.5 / litro) (Montero et al., 2006).

1.2 Justificación

Debido a la ausencia de un censo agropecuario, no se conoce con exactitud el número de cabras que existen en el país, ni su correspondiente ubicación en las diferentes regiones, así también se desconoce el estatus sanitario de dichos animales con respecto a brucelosis, únicamente se tienen los datos que aportan las asociaciones caprinas del país como: ASOOVIAMCO (Asociación Ovicaprina Ambientalista Costarricense), COOPECAPRINA (Cooperativa de Productores de Leche de Cabra de la Zona Norte. R.L) y la Asociación de Cabreros de Costa Rica, los cuales permiten tener una aproximación de estos datos, por lo que es de vital importancia realizar estudios que nos permitan tener clara dicha información.

Costa Rica se caracteriza por tener sistemas de producción caprinos similares en cuanto al manejo y bioseguridad, por ejemplo, existe una implementación insuficiente en cuanto a las medidas de bioseguridad, ya que en la mayoría de las fincas no se llevan a cabo acciones de vigilancia y control veterinario.

Además, se realiza trasiego de animales de una finca a otra, sin llevar acabo los debidos exámenes clínicos, muestras de sangre, muestras de heces, etc; para conocer el estado de salud de los mismos, sumado a esto, no se realizan las cuarentenas para ver el estado de los animales que están por ingresar al nuevo establecimiento, muchas veces los animales son comprados en subastas sin realizarles los debidos análisis para conocer su estado sanitario.

Otro aspecto importante es que se presentan fincas, en las cuales las cabras no tienen identificación, por lo que se dificulta llevar un adecuado manejo y control individual de los animales. Todos estos aspectos son los que facilitan una rápida diseminación de las enfermedades de una finca a otra, entre ellas brucelosis dada la naturaleza y la ecología de la enfermedad (Crespo, 1994; D. Montero, comunicación personal, 02 de Abril 2014).

Conocer los diferentes factores de riesgo que están presentes en cada finca con respecto a brucelosis son vitales para mejorar el manejo y las medidas de bioseguridad de los hatos caprinos del país para la prevención de la brucelosis caprina.

1.2.1 Importancia

La brucelosis es una enfermedad en la que el país tiene la potestad de diseñar, dictar, ejecutar, delegar, autorizar, prohibir u ordenar todas aquellas acciones, que el particular deberá realizar

por su cuenta y que garanticen la salud de las personas, los animales y el comercio (SENASA, 2013).

En el SENASA existe el Programa Nacional de Brucelosis bovina; este programa consta de actividades en campo que son ejecutadas por los médicos veterinarios oficiales del SENASA y por médicos veterinarios oficializados.

Para el control de la enfermedad se ha creado el decreto ejecutivo N 34858-MAG, el cual declara a esta enfermedad de combate particular obligatorio, bajo normativa y fiscalización del SENASA. El Programa de control se basa en el diagnóstico y sacrificio de reactivos, uso de vacunas y la declaración de hatos libres.

SENASA ofrece el servicio de diagnóstico de brucelosis en el laboratorio central y los tres laboratorios regionales, utilizando la prueba de Rosa de Bengala para tamizaje y prueba ELISA indirecto para confirmación (Hutter, 2012).

En el año 2012, el SENASA realizó la determinación de la prevalencia de brucelosis bovina en Costa Rica según el sistema de producción, y se determinó que la enfermedad existe a nivel

nacional con una prevalencia de 3.1% para el estrato de carne, 4.4% en los hatos de leche y de 4.6% para doble propósito (Bonilla, 2013).

Según el Servicio Nacional de Salud Animal, Costa Rica ante la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) se reporta como un país en el que ninguna información ha sido entregada con respecto a *B. melitensis*, debido a que no se ha realizado formalmente un estudio que describa la enfermedad en hatos caprinos a nivel nacional.

Por lo tanto, es de suma importancia realizar esta investigación, para poder estimar la presencia o ausencia de brucelosis (*B. abortus* o *B. melitensis*) en los hatos caprinos y en caso de hallar animales seropositivos intentar el aislamiento en estos animales, para poder clasificarla, o en caso de no encontrarla, seguir realizando pruebas y fortaleciendo las medidas de manejo y bioseguridad adecuadas. De esta forma en un futuro poder declarar el país libre de dicha enfermedad, lo cual traería ventajas a nivel de exportaciones de productos de cabra con socios comerciales importantes.

Otro de los beneficios de conocer la presencia de animales positivos a anticuerpos anti-*Brucella* en el hato caprino consiste en que de ser muy baja o nula, el país podría establecer políticas de comercialización para la aceptación o no, de animales vivos importados

procedentes de países endémicos con dicha enfermedad, los cuales constituirían un gran riesgo para el país. Además, el conocer este tipo de información es fundamental para reforzar el Programa Nacional de Salud en Rumiantes Menores del SENASA, el cual dio inicio durante el año 2013 para la implementación de la estrategia sanitaria con respecto a esta enfermedad.

1.2.2 Hipótesis nula

En el hato caprino nacional, existe animales reactivos a *B. melitensis* o *B. abortus*, en una prevalencia mayor al 1%.

1.3. Objetivos

1.3.1 General

Realizar un estudio epidemiológico de base que permita establecer la presencia o ausencia de animales seropositivos a *B. abortus* o *B. melitensis* en los hatos caprinos del país.

1.3.2 Específicos

1.3.2.1 Determinar la presencia o ausencia de anticuerpos contra brucelas lisas en hatos caprinos de Costa Rica.

1.3.2.2 Confirmar en caso de encontrar algún animal seropositivo, la presencia de dicha bacteria, aislarla, clasificarla y confirmarla en tejidos de caprinos positivos utilizando técnicas de inmunohistoquímica.

1.3.2.3 Conformar un banco de sueros de caprinos a nivel nacional, que sirva para estudios posteriores sobre otros agentes infecciosos.

2. METODOLOGÍA

2.1 Materiales y Métodos

2.1.1 Recopilación de datos de productores caprinos del país.

Se utilizó la información aportada por asociaciones caprinas del país como: ASOOVIAMCO, COOPECAPRINA y la Asociación de Cabreros de Costa Rica. Además, se trabajó con datos aportados por las Direcciones Regionales de SENASA en las regiones Huetar Norte, Central Occidental, Huetar Caribe, Chorotega, Pacífico Central, Central Sur y Brunca. Dentro de la recopilación de información se utilizó una encuesta sobre productores caprinos de San Carlos, realizada por la Finca Santa Lucía de la Universidad Nacional y también se empleó la base de datos de productores caprinos registrados bajo el sistema del SIREA (Sistema Integrado de Registro de Establecimientos) del SENASA, e información aportada por el Dr. Danilo Montero Caballero, (Coordinador del Programa Nacional de Salud de Rumiantes Menores del SENASA), sobre productores independientes del país.

2.1.2 Encuesta Telefónica

Una vez que se recopiló la base de datos de productores caprinos del país, se realizó una encuesta telefónica con el fin de estimar el número de cabras que existe en el país. Con base en esta información, se clasificó el total del número de fincas en tres estratos. La información recolectada en la encuesta telefónica fue sobre datos generales de la finca y el propietario, así

como la historia clínica del hato relativa a la sintomatología y epidemiología relacionada con brucelosis (Anexo 1).

En total se contactó por vía telefónica a propietarios o encargados de 164 fincas, lo que representa un total de 4626 cabras a lo largo de todo el país.

2.1.3 Muestreo

2.1.3.1 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra estuvo determinado por la capacidad del laboratorio de Brucelosis del SENASA, así como por el presupuesto para materiales, siendo aproximadamente en este caso de 400 animales. Este número coincide con el análisis estadístico que se realizó utilizando la fórmula de Cannon y Roe con el programa Win Episcopo, para un estudio de detección de enfermedad, manejando una confianza de 95%, prevalencia mínima esperada del 0.7%, siendo de 413 cabras (Cannon y Roe, 1982).

2.1.3.2. Selección y muestreo de las fincas

Para la selección de las fincas, se clasificó el total del número de fincas contactadas en tres estratos, según las siguientes características:

- Estrato N° 1: Son fincas productoras de pie de cría para su hato y para la venta a otros hatos, pesan la leche que se ordeña.
- Estrato N° 2: Producen su propio pie de cría, pero compran los machos de otros hatos (estrato 1), pesan la leche que se ordeña.
- Estrato N° 3: Estos hatos están conformados por cabras procedentes de los estratos 1 y 2, en muchos casos el propósito de la producción de cabras es el de subsistencia para auto consumo de la familia.

Este muestreo se orientó a la posibilidad de encontrar algún animal seropositivo con *Brucella* spp, por lo que solo se utilizaron las fincas del estrato 1 y 2. El estrato 3 está conformado por fincas de hatos muy pequeños y que en su mayoría están compuestos por animales que fueron adquiridos por las fincas de los estratos 1 y 2.

Cada estrato se muestreó proporcionalmente al número de población que contenía. La selección de fincas se realizó al azar (aleatorio simple, con afijación proporcional de la muestra) por región hasta finalizar con el tamaño de la muestra. En la figura 1 se observa las fincas muestreadas por región.

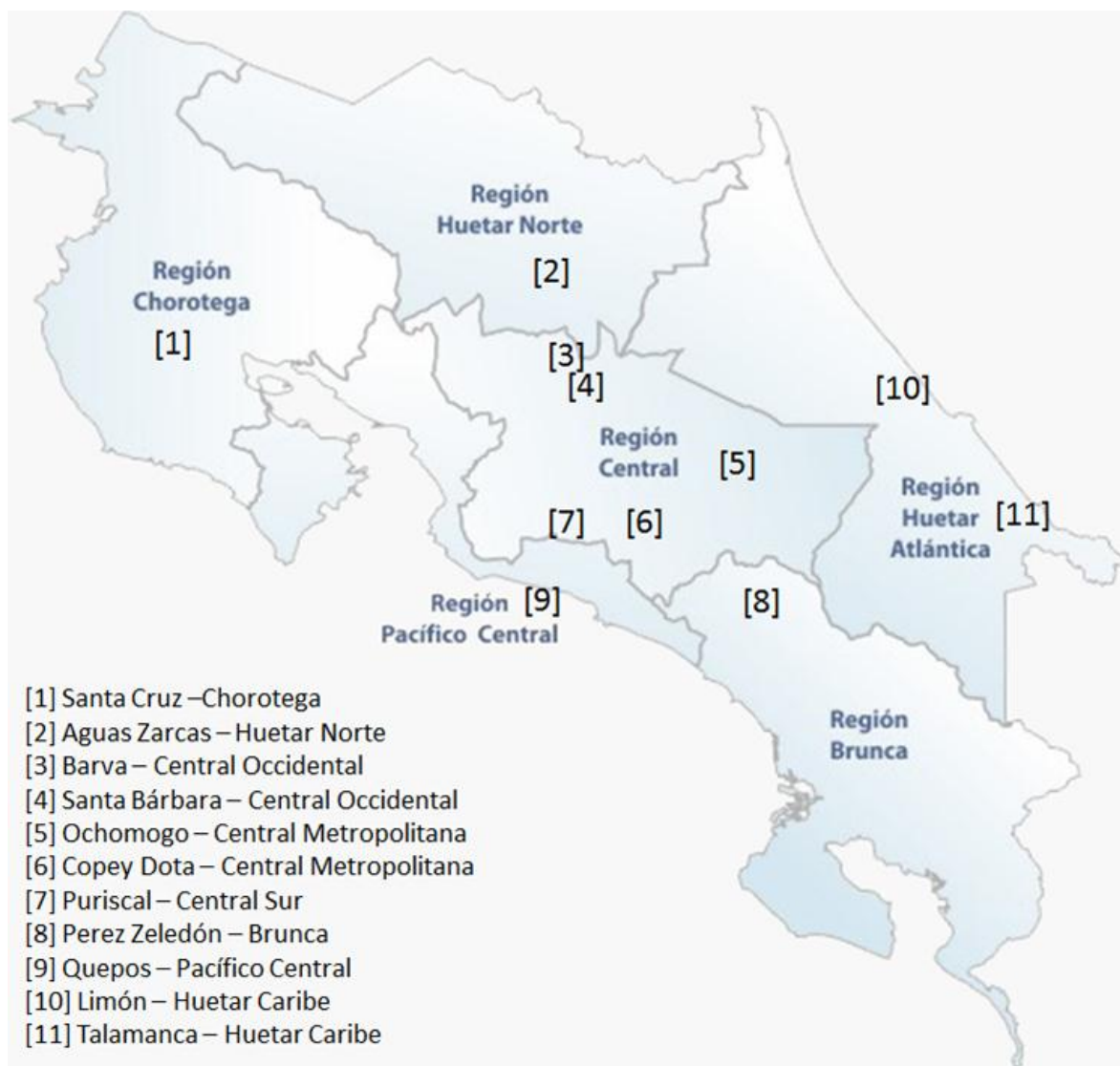


Figura 1. Fincas caprinas muestreadas por región.

Para determinar el número de animales que se muestreó en cada finca se utilizó la fórmula de Cannon y Roe (Cannon y Roe, 1982), que indica la cantidad de animales que se necesitan para

un estudio de detección de enfermedad, utilizando una confianza del 95% y una prevalencia esperada de 5%.

En el cuadro 1 se observa el detalle del número de fincas y animales seleccionados por región.

Cuadro 1. Clasificación de número de fincas y cantidad de animales por región

Región	Estrato 1		Estrato 2	
	Fincas	Animales	Fincas	Animales
Brunca			1	10
Central Metropolitana	2	68		
Central Occidental	2	91		
Central Sur			1	23
Chorotega			1	50
Huetar Caribe			2	25
Huetar Norte	1	47	2	92
Pacífico Central			1	18
Total	5	206	8	218
Total	13 Fincas y 424 cabras muestreadas			

2.1.3.3 Selección de animales

Una vez en la finca se consultó por los animales con más alta probabilidad de infección por *Brucella*, estos fueron los que presentaron historia de: abortos, infertilidad, retención placentaria, natimuertos, nacidos débiles, disminución en la producción de leche, orquitis o condiciones que los convierten en animales más susceptibles como baja condición corporal, mucosas pálidas. Estos fueron muestreados por conveniencia.

En caso de no cubrir, con esta cantidad, la totalidad de animales a muestrear en la finca, se hizo una selección aleatoria dentro de los restantes animales del hato.

2.1.3.4 Toma de la muestra

Se realizó la visita a las fincas, para la recolecta de las muestras de sangre de los animales seleccionados, con el apoyo logístico de las Direcciones Regionales del Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA). La toma de la muestra sanguínea se realizó por vía yugular, con las debidas medidas de higiene como lo son la correcta limpieza y desinfección del animal, así como también el uso de implementación adecuada tal como: guantes desechables, botas limpias, bolsas plásticas de autoclave para los desechos, etc. Así también para la recolecta de las muestras se utilizaron tubos sin anticoagulante, correctamente rotulados con la identificación de cada animal. Una vez tomada la muestra se colocaron en cajas de espuma de poliestireno o hieleras y se le colocó gel refrigerante para mantener una temperatura entre 4°C y 10°C. Posteriormente, las muestras fueron llevadas al laboratorio de Brucelosis del SENASA, donde se almacenaron en refrigeración hasta su procesamiento 24-48 horas post recolección.

2.1.4 Encuesta en la finca

Una vez realizado el muestreo se procedió a realizar una encuesta sobre aspectos específicos del manejo del hato y aspectos clínicos- epidemiológicos de la brucelosis (Anexo 2).

Con base en la información dada por la encuesta, cada una de las finca fue analizada mediante los siguientes aspectos: características de la finca y población animal, manejo sanitario y reproductivo, reemplazo de cabras, plan de vacunación, historia clínica del hato y cada uno de éstos contemplan diferentes factores de riesgo, los cuáles van a ser analizados en cada finca. En caso de presentarse el factor de riesgo en la finca éste se denominó con un uno, y en caso de su ausencia, este se representó con cero.

Mediante la encuesta, se analizaron los diferentes factores de riesgo, mencionados en la literatura los cuáles se clasificaron en las siguientes categorías:

Características de la finca y población animal: La finca limita con áreas de vida silvestre, la finca limita con hato bruceloso, el agua de la finca drena a otra finca, la finca recibe drenaje de otra finca, en la finca se utilizan heces sin tratar como abono orgánico, presencia de especies domésticas, presencia de mamíferos silvestres.

Manejo sanitario y reproductivo: Utiliza los servicios veterinarios para salud, utiliza servicios veterinarios para reproducción, se maneja cabras jóvenes con recién paridas, se aísla a las hembras próximas al parto, las cabras poseen problemas nutricionales o parasitarios.

Manejo de reemplazos: Realiza prueba de brucelosis a los reemplazos ya sea provenientes de otros hatos o producidos por la propia finca, previo al ingreso, realiza cuarentenas a los reemplazos.

Historia clínica del hato: Presencia de abortos en las cabras en el último año, retenciones placentarias en el último año, cabritos nacidos débiles en el último año, presencia de natimuertos en el último año, casos de orquitis observados recientemente, y por último ha realizado pruebas diagnósticas de brucelosis en su hato.

2.1.5 Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Brucelosis del SENASA, donde fueron refrigeradas y centrifugadas a 3500 rpm (revoluciones por minuto) durante ocho minutos, para la debida separación del suero y la posterior realización de las pruebas para el diagnóstico de brucelosis.

2.1.5.1 Pruebas

Rosa Bengala:

Esta prueba tiene una sensibilidad de 94.1% y una especificidad de 98.0 % (Carlos, 2012). A cada muestra se le realizó la prueba de RB, para determinar la presencia o ausencia de

anticuerpos contra brucelas lisas, tanto por el método tradicional como la modificación sugerida por la Unión Europea (Alton et al., 1988; Moriyón y Gamazo, 1990).

Para la realización de la prueba de RB, se utilizó un aglutinoscopio para poder evidenciar más fácilmente las reacciones de aglutinación (Lucero et al., 2008). En la placa de vidrio se colocó la gota del suero (30 μ L) de las muestras y la gota del reactivo (30 μ L) de RB. Una vez hecho esto con todas las muestras y llena la placa de aglutinación, se mezclaron rápidamente ambas gotas, se dejó reposar en la cámara por cuatro minutos, luego de pasado este tiempo se observó la reacción.

ELISA indirecto:

Se utilizó el **ELISA indirecto (i-ELISA)** de la marca ID Vet® según las instrucciones del fabricante. Esta prueba posee una sensibilidad del $94.44 \pm 2.2\%$ y una especificidad del $96.35 \pm 3.1\%$ (Acosta y Ortiz, 2005). Para la realización de esta prueba se colocó 190 μ L de la solución de diluyente dos en cada pocito de la placa, junto con 10 μ L de los respectivos controles y muestras, luego se llevó a cabo la incubación de la placa por 45 minutos, luego de pasado este tiempo, se realizaron tres lavados de 250 μ l con la solución de lavado. Posteriormente se preparó la solución con el conjugado y se depositó 100 μ l en los pocillos y se volvió a incubar por 30 minutos y lavó de igual forma como se mencionó anteriormente.

Luego, se colocó 100 μ l de la solución de revelación, la cual también se dejó incubar por 15 minutos y por último se adicionó la solución de parada para detener la reacción. Finalmente se realizó la lectura en el lector de ELISA a 450 nm.

ELISA Competitivo:

El ELISA Competitivo (c-ELISA) Svanovir Svanova® de igual manera se ejecutó siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta prueba posee una sensibilidad del 98.3% y una especificidad de 99.7% (Lucero et al, 2008). Inicialmente se agregó 45 μ l de la solución de dilución de muestra en cada pocillo de la placa, colocando por duplicado 5 μ l de los controles y las muestras respectivas. Luego se añadió 50 μ l de la solución de anticuerpo monoclonal de competición, una vez incluidas ambas soluciones se mezclaron utilizando un agitador orbital electrónico por cinco minutos. Luego de la mezcla la placa se dejó incubar por 30 minutos. Posteriormente se realizaron cuatro lavados de 250 μ l a la placa con la solución de lavado, para luego agregar 100 μ l de la solución de conjugado, la cual se dejó incubar por 30 minutos y lavar como anteriormente se menciona. Una vez transcurrido este tiempo se le adicionó 100 μ l de la solución de sustrato, se dejó incubar por 10 minutos y por último se agregó 50 μ l de la solución de stop o de parada, se mezcló la placa durante dos minutos y se realizó la lectura utilizando un lector de ELISA a 450 nm.

Prueba de Polarización de la Fluoresceína (FPA):

Esta prueba tiene una sensibilidad del 96.1% y una especificidad del 97.9% (Lucero et al., 2008). Para la realización de esta prueba se siguieron las instrucciones del fabricante, las cuales describen inicialmente la colocación de 1 ml (100µl) de la solución de reacción en un tubo de ensayo de borosilicato nuevo y se le agregó 20 µl de cada control o muestra, en el caso del control negativo éste se realizó por triplicado, se mezcló y se dejó incubar por cinco minutos, se realizó la lectura del blanco conteniendo la solución y la muestra, posteriormente se colocó 10 µl de la solución de conjugado y se mezcló, se incubó por dos minutos, y se realizó la lectura del mismo, posteriormente se volvió a incubar por 30 minutos y 60 minutos y se realizó las lecturas respectivas.

Para la validación de los ensayos, se usaron 21 sueros de caprinos negativos (libres de la infección de *Brucella*) y 21 sueros positivos (con aislamiento de *B. melitensis*), los cuales fueron recolectados anteriormente para otros estudios de brucelosis en España (Díaz et al., 1997). Estos controles fueron aportados por el banco de sueros del Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET) de la Escuela de Medicina Veterinaria.

2.1.6 Banco de sueros

Una vez utilizados en las diferentes pruebas, los sueros recolectados de las 13 fincas fueron almacenados en congelación a -20°C con y sin glicerol para así tener una muestra

representativa de los sueros de caprinos a nivel nacional, para su posterior utilización en diferentes pruebas diagnósticas y en otras enfermedades de interés para el país en caprinos.

2.1.7 Análisis de Datos

Se calculó el número absoluto y relativo de animales seropositivos por prueba, y con diagnóstico definitivo según la definición de caso.

Ante la ausencia de animales positivos y fincas positivas, no fue posible cuantificar los factores de riesgo para positividad. Aun así, por medio de la encuesta realizada, se identificó la presencia de factores de riesgo citados en la literatura, en los hatos estudiados. Se calculó su frecuencia relativa (porcentaje).

Dado que el tamaño de la muestra no fue suficiente para una prevalencia esperada de menos de 1%, se calculó la probabilidad de resultados positivos globales y por finca, utilizando la siguiente fórmula (Cannon y Roe, 1982)

$$D = \{ 1 - (1 - NC)^{1/n} \} (N - (n - 1) / 2)$$

n= Tamaño de muestra requerido

N= Tamaño del rebaño

D=# animales enfermos en el rebaño

NC= Nivel de confianza en tanto por uno (p.e 0.95)

Para el cálculo de la probabilidad de infección en muestras con resultados negativos en forma global por prueba realizada y en forma individual por cada finca según la prueba efectuada, se utilizó una prevalencia de 0.05, la sensibilidad- especificidad de cada prueba, y para el primer caso el número total de animales muestreados (424 cabras) y para el segundo caso el número de animales muestreados en cada finca.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Utilizando la prueba de aglutinación de Rosa Bengala (Prueba tamiz en el diagnóstico de la brucelosis) se detectaron 418 muestras negativas (98.6%) y seis muestras positivas (1.4%), utilizando 30µl del reactivo y 30µl del suero. Con el fin de tener una mayor sensibilidad se realizó la prueba de RB utilizando la modificación recomendada por la Unión Europea y la OIE (75µl suero y 25µl reactivo) obteniéndose un resultado de 407 muestras negativas (96.0%) y 17 muestras positivas (4.0%). En el Cuadro 2 se indican estos resultados, clasificándose las aglutinaciones como débiles (1+), aglutinaciones moderadas (2+), y aglutinaciones fuertes (3+).

Específicamente, en la finca 4, el animal C 46, y en la finca 7, los animales C 112 y C 110, presentan resultados positivos en las 2 prueba de RB, lo cual corresponde a un 0.7%.

Una posible causa de estos resultados son las reacciones cruzadas descritas para otros patógenos que comparten componentes de membrana celular o de lipopolisacáridos, los que podrían estar presentes en la flora bacteriana en estos animales (Crespo, 1994; Blasco, 2004; Diab y Uzal, 2007; Carlos, 2012). En dichos casos no se sabe con exactitud cuál o cuáles son las bacterias que están afectando, porque no se realizó aislamiento bacteriano, ya que no había una sintomatología asociada a brucelosis y por lo tanto no tenía sentido para los objetivos de este trabajo.

Las otras pruebas utilizadas en este estudio (ELISA competitivo, ELISA indirecto y FPA) poseen alta sensibilidad y especificidad por lo que se disminuye la probabilidad de encontrar falsos positivos en los sueros analizados (Crespo, 1994). En el Cuadro 2 se indica el resultado de estas pruebas en comparación con las pruebas de tamizaje.

Cuadro 2. Resultados de las pruebas de laboratorio por finca muestreada.

Finca	Muestreo	Resultado de las Pruebas de Laboratorio								
		RB 30 µl: 30 µl			RB 75 µl: 25 µl			i-ELISA	c-ELISA	FPA
		(1+)	(2+)	(3+)	(1+)	(2+)	(3+)			
1	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	50	1	-	-	2	-	1	-	-	-
5	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	41	-	-	-	4	2	-	-	-	-
7	50	4	1	-	4	1	-	-	-	-
8	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	16	-	-	-	1	-	-	-	-	-
10	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	47	-	-	-	2	-	-	-	-	-
total	424	5	1	-	13	3	1	-	-	-

RB: Aglutinación leve 1+, Moderada 2+, 3+Fuerte. **c-ELISA** PI< 30% Negativo, ≥ 30 Positivo, **i-ELISA** % S/P ≤110% Negativo, 110% < %S/P<120% Dudoso, %S/P ≥ 120% Positivo. **FPA**< 10 mP Negativo, 10-20 mP Sospechoso, > 20 mP Positivo

Para la validación interna de las pruebas i-ELISA como c-ELISA se utilizaron como controles adicionales las muestras aportadas por el PIET, para el i-ELISA tanto las 21 muestras positivas (con aislamiento) resultaron efectivamente positivas y las 21 muestras negativas

resultaron negativas. En cuanto al c-ELISA estas muestras igualmente resultaron acorde a los títulos de anticuerpos esperados (Cuadro 3).

En la prueba de FPA, estos controles, mantuvieron su condición en el caso de las muestras negativas, pero de las 21 muestras control positivas, tres muestras dieron resultados sospechosas, tres muestras fueron negativas, y solamente 15 dieron los resultados positivos esperados. Obteniendo una sensibilidad para esta prueba de 71.4%. Los resultados se muestran en el Cuadro 3.

Las fluctuaciones en las lecturas obtenidas de la prueba de FPA durante estos ensayos hace a esta prueba un ensayo complementario pero sujeto a variaciones, por lo que si esta prueba es utilizada en caprinos, su interpretación debe ser evaluada cautelosamente.

Debido a los resultados obtenidos mediante este estudio, se rechaza la hipótesis nula.

Cuadro 3. Resultados de i-ELISA, c-ELISA y FPA de las muestras control positivas y negativas

Muestra	i-ELISA %S/P	Resultado	c-ELISA (PI)	Resultado	FPA (mp)	Resultado
Positivas						
CB3	441.31	+	93.6	+	21.94	+
CB5	364.41	+	91.3	+	8.34	-
CB10	437.64	+	92.1	+	13.81	S
CB11	454.38	+	96.9	+	113.31	+
CB13	448.46	+	96.9	+	23.44	+
CB14	360.55	+	95.5	+	-0.72	-
CB16	447.55	+	96.1	+	39.78	+
CB20	441.38	+	96.3	+	16.01	S
CB22	447.62	+	96.6	+	61.64	+
CB25	459.84	+	89.8	+	55.11	+
CB26	455.18	+	96.8	+	8.48	-
CB29	447.49	+	96.8	+	14.24	S
CB30	446.53	+	92.5	+	73.34	+
CB32	470.14	+	95.1	+	138.51	+
CB33	461.68	+	96.5	+	136.21	+
CB35	460.43	+	96.3	+	145.38	+
CB36	449.93	+	96.9	+	32.68	+
CB38	468.64	+	96.3	+	137.08	+
CB39	452.49	+	96.6	+	153.28	+
CB40	459.97	+	95.7	+	155.31	+
CB41	429.72	+	85.5	+	108.48	+
Negativas						
CBF1	5.66	-	-1.5	-	-6.60	-
CBF2	14.80	-	10.2	-	7.10	-
CBF3	35.26	-	4.8	-	-78.20	-
CBF4	9.65	-	2.4	-	-17.70	-
CBF5	9.72	-	-2.6	-	-81.04	-
CBF6	11.45	-	11.4	-	-9.00	-
CBF7	11.00	-	9.7	-	-14.90	-
CBF8	11.33	-	10.6	-	-11.90	-
CBF9	8.49	-	1.9	-	3.40	-
CBF10	37.84	-	12	-	-14.00	-
CBF11	5.73	-	6.2	-	-17.20	-
CBF14	11.88	-	-4.0	-	2.60	-
CBF15	8.73	-	3.0	-	-62.50	-
CBF16	18.31	-	7.1	-	7.80	-
CBF17	13.58	-	5.5	-	5.50	-
CBF18	13.58	-	-2.4	-	8.60	-
CBF19	14.50	-	0.6	-	8.10	-
CBF20	11.61	-	-4.1	-	-50.90	-
CBF21	13.91	-	-1.1	-	0.80	-
CBF22	10.43	-	10.7	-	2.80	-
CBF23	9.06	-	4.6	-	8.20	-

c-ELISA PI < 30% Negativa, ≥ Positiva. **i-ELISA** % S/P ≤ 110% Negativo, 110% < %S/P < 120% Dudoso, %S/P ≥ 120% Positivo.
FPA < 10 mP Negativo, 10-20 mP Sospechoso, > 20 mP Positivo. **Resultados** POSITIVO: +, NEGATIVO: -, SOSPECHOSO: S.

Se calculó la probabilidad de infección en muestras con resultados negativos, en forma global por prueba realizada y en cada finca por prueba efectuada (Cuadro 4 y 5).

Cuadro 4. Probabilidad de infección en muestras con resultados negativos en forma global por prueba realizada.

Prueba efectuada en este estudio	Probabilidad de infección
RB	0.7444
i-ELISA	0.7515
c-ELISA	0.3627
FPA	0.5974

(Cameron y Baldock, 1998; Cameron, 1999; Gardner, 2000).

Cuadro 5. Probabilidad de infección en muestras con resultados negativos en cada finca según la prueba efectuada

Finca	RB	i-ELISA	c-ELISA	FPA
1	0.0713	0.0728	0.0241	0.0482
2	0.1264	0.1288	0.0437	0.0862
3	0.0317	0.0323	0.0106	0.0212
4	0.1486	0.1514	0.0517	0.1017
5	0.0563	0.0574	0.0189	0.0379
6	0.1236	0.126	0.0426	0.0872
7	0.1486	0.1514	0.0517	0.1017
8	0.0502	0.0512	0.0169	0.0338
9	0.0285	0.0291	0.0095	0.0191
10	0.0563	0.0574	0.0189	0.0379
11	0.1486	0.1514	0.0517	0.1017
12	0.1486	0.1514	0.0517	0.1017
13	0.1403	0.0154	0.0487	0.0959

(Cameron y Baldock, 1998; Cameron, 1999; Gardner, 2000).

Puesto que no fue encontrado ninguna finca ni animal positivo, no se logró cuantificar los FR presentes en la finca para positividad, pero se consideró muy importante observar cuáles

prácticas de manejo constituían factores de riesgo mencionados en la literatura, las cuáles se detectaron en las fincas muestreadas mediante las encuestas realizadas, esto con el fin de verificar que prácticas podrían constituir una amenaza en caso de que en un futuro se encontrara infección.

En el análisis global se evidencia que de las 13 fincas muestreadas, siete fincas presentaron 40% o más de factores de riesgo mencionados en la literatura. Siendo la finca N° 9 ubicada en Limón, en la Región Huetar Caribe la que obtuvo la mayor cantidad de factores de riesgo presentes (FR: 65%), mientras que la finca que obtuvo menor cantidad de factores de riesgo presentes (FR: 15%), es la finca N° 12, ubicada en Aguas Zarcas de San Carlos (Cuadro 6). En total se estudiaron 20 factores de riesgo, clasificados en diferentes categorías. De estos, aproximadamente seis estuvieron presentes en más del 50% de las fincas en estudio, otros siete factores de riesgo se encontraron en alrededor del 30% de las fincas, cuatro en menos del 25% de las fincas, además se encontraron dos factores de riesgo que no estuvieron presentes en ninguna finca.

Cuadro 6. Factores de riesgo por finca

FACTORES DE RIESGO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Total fincas	%
CARACTERÍSTICAS DE LA FINCA															
1. Limita con Areas Silvestres	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	4	30.8%
2. Limita con Hato Bruceloso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0%
3. El agua de la finca drena a otra finca	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	5	38.5%
4. Recibe drenaje de otra finca	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	4	30.8%
5. Usa heces sin tratar como Abono orgánico	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	10	76.9%
6. Presencia de otras especies domésticas	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	100.0%
7. Presencia de Mamíferos silvestres	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	10	76.9%
Total	4	3	3	5	3	3	4	4	5	4	4	2	2		
MANEJO SANITARIO Y REPRODUCTIVO															
8. Utiliza los servicios Veterinarios para Salud	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	3	23.1%
9. Utiliza los Servicio Veterinario para Reproducción	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	4	30.8%
10. Maneja Cabras jóvenes con recién paridas	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	4	30.8%
11. Aísla hembras próximas al parto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0%
12. Problemas nutricionales y/o parasitarios	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	6	46.2%
Total	1	2	1	0	3	1	0	3	4	1	1	0	0		
MANEJO DE LOS REEMPLAZOS															
13. Realiza prueba de brucelosis a los reemplazos previo al i	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	8	61.5%
14. Realiza cuarentenas a los reemplazos	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	9	69.2%
Total	1	2	2	2	0	2	0	2	2	1	1	0	2		
HISTORIA CLÍNICA DEL HATO															
15. Ha tenido abortos en su hato el último año	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	5	38.5%
16. Presenta retenciones placentarias en el último año	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	3	23.1%
17. Presenta cabritos nacidos débiles	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	4	30.8%
18. Presenta cabritos natimuertos	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	15.4%
19. Presenta de casos de orquitis observados en el último añ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	7.7%
20. Ha realizado pruebas diagnósticas de Brucelosis	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	7	53.8%
Total	2	1	1	4	0	3	3	0	2	1	3	1	1		
Total de factores de riesgo / finca	8	8	7	11	6	9	7	9	13	7	9	3	5		
% factores de riesgo / finca	40%	40%	35%	55%	30%	45%	35%	45%	65%	35%	45%	15%	25%		
0: Ausencia de FR															
1: Presencia de FR															

Estos factores de riesgo mencionados en la literatura fueron estudiados en cada una de las fincas muestreadas y fueron clasificados mediante las siguientes categorías:

Características de la finca y población animal: Todas las 13 fincas muestreadas presentaron al menos dos factores de riesgo, incluso dos fincas (Finca N° 4 y N° 9) presentaron los valores más altos (cinco factores de riesgo), lo que corresponde a un 71.4%, Las fincas con menores

factores de riesgo presentes (FR: 2) que corresponde a un 28.6% son la finca N° 12 y N° 13, ambas ubicadas en Aguas Zarcas de San Carlos (Cuadro 6 y Figura 2).

Dentro de los factores de riesgo más prevalentes que se identificaron se encuentran: Presencia de otras especies domésticas, encontrado en el 100% de las fincas muestreadas.

Con base en la literatura la presencia de otras especies domésticas, específicamente bovinos constituye un factor de riesgo importante, ya que estos animales pueden constituir un foco de infección debido a que las cabras pueden verse infectadas por las especies *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*, esto sumado a la alta prevalencia de brucelosis en el hato bovino nacional para estrato de carne, siendo aun mayor para el hato lechero e incrementándose aún más para el ganado de doble propósito. Otros factores de riesgo detectados son: presencia de mamíferos silvestres y uso de heces sin tratar como abono orgánico, ambos presentes en el 76.9% de las fincas (Cuadro 6).

Los factores anteriormente citados constituyen un peligro para la salud animal, ya que incrementan el riesgo de transmisión en caso de encontrarse un animal infectado. Otros factores de riesgo detectados en el 30% de las fincas aproximadamente son: La finca limita con áreas silvestres, el agua de la finca drena a otra finca y recibe drenaje de otra finca.

Con respecto a las aguas de abastecimiento de la finca y aguas residuales es muy importante que estas se mantengan en una excelente calidad ya que el consumo de agua contaminada con *Brucella* spp podría desencadenar infección en las fincas vecinas.

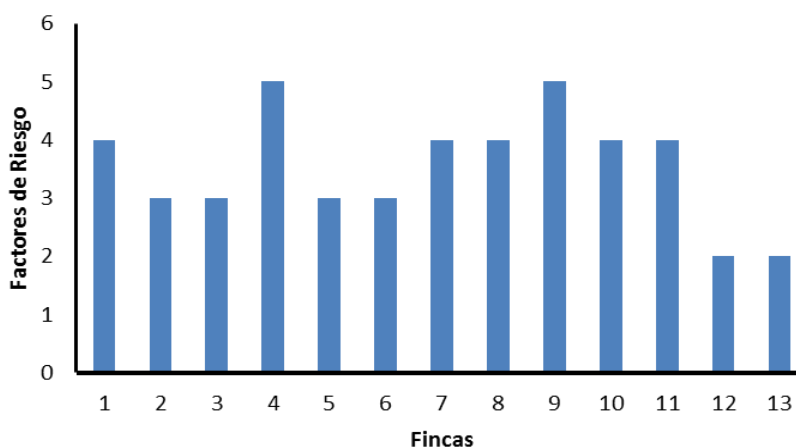


Figura 2. Frecuencia de Factores de Riesgo presente en la finca con respecto a características de la finca y población animal por finca caprina muestreada durante el año 2014.

Manejo sanitario y reproductivo: Se estudiaron en total cinco factores de riesgo, el 23% de las fincas presentó al menos tres factores de riesgo, al 38.5% de las fincas se les identificó solamente un factor de riesgo presente, y el 30.7% de las fincas no presentó ningún porcentaje de riesgo (Cuadro 6 y Figura 3). El factor de riesgo más comúnmente detectado es la presencia de problemas nutricionales y parasitarios en las cabras, éste factor de riesgo se encuentra presente en 46.2% de las fincas. Además, la no utilización de los servicios veterinarios en las fincas y el manejo de cabras jóvenes con cabras recién paridas, se encuentran presentes en un 30.8% de las fincas analizadas (Cuadro 6). Según la literatura estas prácticas de manejo constituyen un problema, ya que las fincas no cuentan con un buen programa de salud de hato

en cuanto al manejo, prevención y tratamiento de posibles enfermedades, lo cual podría incrementar la posibilidad de transmisión de la infección en dichos animales.

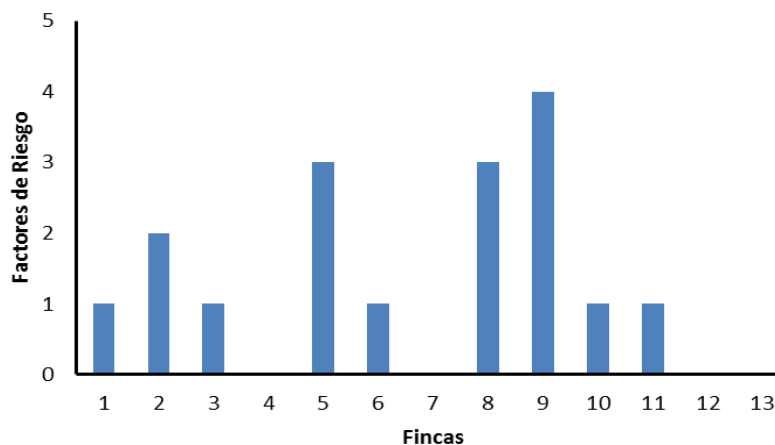


Figura 3. Frecuencia de Factores de Riesgo presentes en la finca con respecto al manejo de sanitario y reproductivo por finca caprina muestreada, durante el año 2014.

Manejo de reemplazos: Se investigaron dos factores de riesgo en total. El 23% de las fincas en estudio (tres fincas) no presentaron factores de riesgo, sin embargo en siete de las fincas lo que equivale al 53.8% de las fincas si se identificó la presencia de un 100% de los factores de riesgo estudiados dentro de esta categoría (Figura 4 y Cuadro 6).

Dentro de los factores de riesgo observados se evidenció la no realización de la prueba de brucelosis previo al ingreso de un animal en un 61.5% de las fincas y la ausencia en la implementación del periodo de cuarentena a los nuevos reemplazos en el 69.2% del total de

las fincas muestreadas (Cuadro 6). Según la literatura ambos factores de riesgo observados, son de gran relevancia, ya que constituyen una potencial amenaza para estas fincas, ya que carecen de un método de control para poder identificar posibles animales infectados que deseen ingresar a la finca, los cuales podrán constituir focos de infección para los demás animales de la finca.

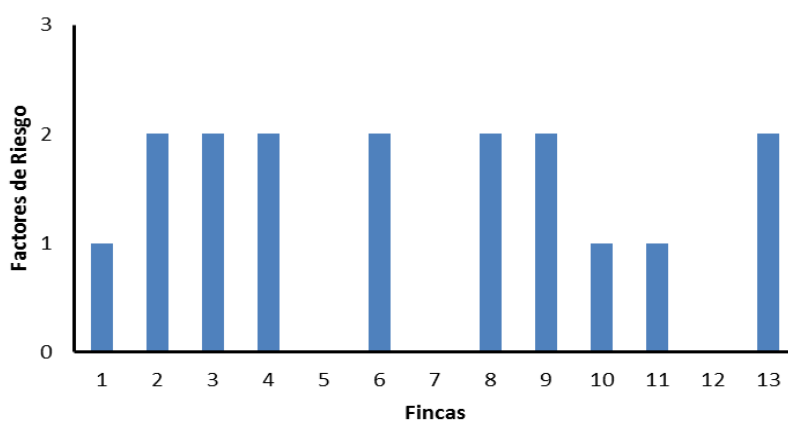


Figura 4. Frecuencia de Factores de Riesgo presentes en la finca con respecto al manejo de reemplazos por finca caprina muestreada, durante al año 2014.

Y por último con respecto a la **Historia clínica del hato**: se estudiaron seis factores de riesgo, dos de las fincas (15%), no presentaron ningún factor de riesgo, al 30.7% de las fincas (cuatro fincas) en estudio se les identificó 50% o más de los factores de riesgo investigados (Cuadro 6 y Figura 5).

Dentro de los factores de riesgo más frecuentes se encuentran la no realización de pruebas diagnósticas de brucelosis, el cual estuvo presente en el 53.8% de las fincas, además de la

presencia de diferentes signos clínicos compatibles con brucelosis como por ejemplo la presencia de abortos en el hato durante el último año, presente en 38.5% de las fincas, retenciones, placentarias (23.1%), cabritos nacidos débiles (30.8%) y natimuertos (15.8%), la presencia de orquitis (7.7%) (Cuadro 6). Según la literatura todos estos factores de riesgo son importantes ya que esta sintomatología es muy característica en casos de brucelosis, además que facilitan la transmisión de la bacteria por medio del contacto con dichos animales o sus secreciones. Además la evidencia de dichos factores de riesgo en las fincas evidencia que no hay un buen programa de salud y reproducción en dichas fincas.

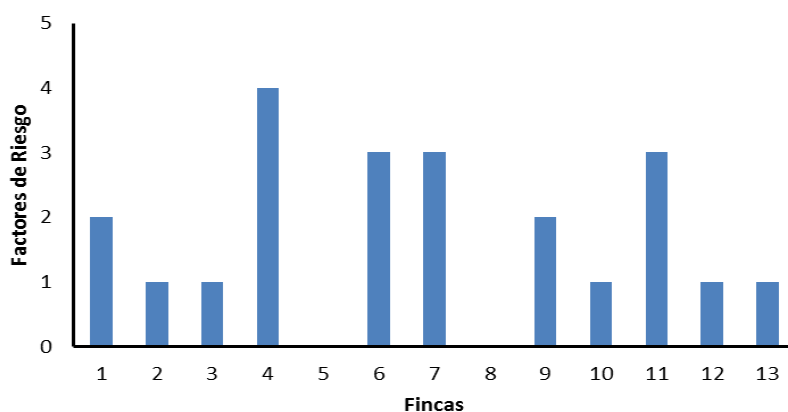


Figura 5. Frecuencia de Factores de Riesgo presentes en la finca con respecto a la historia clínica del hato por finca caprina muestreada, durante el año 2014.

Según la encuesta el factor de riesgo más común, que estuvo presente en el 100% de las fincas fue la presencia de especies domésticas dentro de la finca, y los factores de riesgo menos

comunes, los cuales no estuvieron presentes en ninguna finca son: limita con hato bruceloso (los productores de las 13 fincas analizadas coincidieron en esto, su argumento fue por ausencia de tormentas de abortos en las explotaciones vecinas) y no aísla las hembras próximas al parto (Cuadro 6).

4. CONCLUSIONES

1. Se determinó la ausencia de anticuerpos contra brucelas lisas en los hatos caprinos muestreados.
2. Dentro de los hatos caprinos muestreados no se encontró animales serológicamente positivos simultáneamente en ambas pruebas de tamizaje y confirmatorias, ni aun aumentando la sensibilidad con la modificación recomendada para este fin por la OIE y la U.E. Por lo tanto se podría inferir que la brucelosis no es la responsable de abortos y problemas reproductivos en caprinos a nivel nacional.
3. Según los resultados de este estudio la prevalencia de brucelosis en el hato caprino nacional es menor al 1%.
4. Se demostró la eficiencia de las técnicas de laboratorio empleadas en el diagnóstico de la brucelosis en los hatos caprinos, disponibles actualmente en el SENASA, las cuales incluyen la prueba de Rosa de Bengala para tamizaje y las pruebas confirmatorias como lo son la prueba de ELISA indirecto y el ELISA competitivo.

5. La prueba complementaria de FPA posee un comportamiento fluctuante en el diagnóstico de brucelosis caprina. Por lo que los resultados obtenidos en esta prueba deben ser interpretados cuidadosamente en conjunto con las otras pruebas disponibles para el diagnóstico de brucelosis de rutina en los laboratorios oficiales.
6. Este trabajo describe la situación epidemiológica de la brucelosis en caprinos de Costa Rica actualmente, lo cual demuestra la baja prevalencia de la enfermedad y por lo tanto da sustento científico para que las autoridades de sanidad animal, soliciten a los socios comerciales interesados en la importación de caprinos, que la situación sanitaria de estos animales con respecto a la brucelosis se conozca y que sea igual o menor a la presente en nuestro país.
7. Se conformó luego de este muestreo el banco de sueros para estudios posteriores sobre otros agentes infecciosos en caprinos a nivel nacional.

5. RECOMENDACIONES

1. No usar vacuna en caprinos hasta que no se demuestre que *B. melitensis* haya ingresado en el país.
2. Los Médicos Veterinarios oficiales y oficializados deben seguir realizando pruebas diagnósticas para Brucelosis en caprinos, además de fortalecer las medidas de manejo y bioseguridad adecuadas en las fincas caprinas. Con el fin de seguir constatando la ausencia de animales seropositivos con respecto a esta enfermedad en el país.
3. Se debe reforzar el Programa Nacional de Salud en Rumiantes Menores del SENASA, el cual dio inicio durante el año 2013, para la implementación de la estrategia sanitaria con respecto a esta enfermedad. Esto se puede hacer educando a los productores y público en general sobre el problema de salud pública que representa el consumo de productos lácteos no pasteurizados y sobre la importancia de rechazar la leche y subproductos de dudosa procedencia.
4. Los veterinarios oficiales y oficializados deben educar a los productores caprinos sobre la efectividad de las pruebas diagnósticas para detectar Brucelosis que dispone el SENASA. Esto debido a que durante el trabajo de campo fue evidente un

desconocimiento sobre este tema, ya que los productores piensan que estas pruebas solamente son efectivas para bovinos.

5. El monitoreo de brucelosis a nivel nacional por parte de las autoridades competentes de salud humana debe ser más riguroso y debe incluir el aislamiento de *Brucella* spp de rutina de los pacientes humanos para poder descartar que se trate de *Brucella melitensis*.
6. En caso que exista contacto directo con animales infectados con brucelosis o productos abortados en las fincas, deben desinfectarse las superficies y demás objetos con cloro al 1%. Debe usarse por lo tanto, guantes y evitarse el contacto o consumo de los productos de estos animales.
7. Un control más efectivo de la enfermedad se logra cuando se lleva a cabo la correcta separación de las diferentes especies animales presentes en la finca, esto puede ser mediante cercas en los lugares para la crianza de ganado (bovino, caprino, ovino).
8. Mantener a los animales en una zona ventilada para evitar el acúmulo de vapores irritantes y polvo que pudieran servir de medio de propagación de la enfermedad, ya que la bacteria puede entrar por inhalación de polvo o aerosoles.

9. Realizar dos veces al año como mínimo el sangrado de sus animales para conocer el estado sanitario de la finca con respecto a brucelosis.
10. Realizar prueba de diagnóstico de brucelosis previo al ingreso de animales nuevos a la finca y mantenerlo en un lugar aislado en cuarentena hasta la obtención de los resultados de la prueba.
11. Mantener en la finca un control sobre los animales silvestres que pueden ingresar a la finca, llevar a cabo las medidas de seguridad necesarias para que los caprinos no entren en contacto con los animales de vida silvestre del entorno.
12. Sepultar e incinerar todo desecho de los partos: placenta, sangre o en caso de abortos también fetos, ya que no es aconsejable que el animal que acaba de parir u otro animal se coma estos residuos que podrían estar infectados con *Brucella spp.*
13. Todo animal que presente aborto, nacidos débiles o natimuertos o machos con orquitis deben ser aislados de los demás animales y se les debe realizar el sangrado respectivo para poder determinar si está presente un caso de brucelosis en la finca. En el caso de que estos animales resulten positivos se debe hacer la declaración obligatoria de esta

enfermedad en la finca, el muestreo de todos los animales y el sacrificio de los animales seropositivos.

14. Comprar animales provenientes de fincas que cuenten con el certificado de hato libre de brucelosis.
15. Los animales que lleguen a la finca no deben provenir de una explotación caprina o zona que esté sujeta a una prohibición o restricción en el movimiento de animales.
16. Las fincas deben tener adecuadas medidas de bioseguridad tales como vados, calzas, pediluvios, programa de control de plagas, para un mejor control e higiene que proteja a los animales de diversos agentes.
17. Todas las explotaciones de caprinos a nivel nacional deben tener un sistema capaz de dar trazabilidad individual a los animales, desde su nacimiento hasta su muerte. Además debe existir un registro sanitario que incluya aparición de enfermedades, especialmente abortos, presencia de natimuertos, nacidos débiles, presencia de orquitis en machos, mastitis, enfermedades del aparato genital con flujo, de los mismos elaborado por un Médico Veterinario.

18. Las crías provenientes de madres positivas deben ser sacrificadas ya que son fuente de contaminación para los demás animales de la finca.
19. Proveer una zona de partos o maternidad de manera que las hembras próximas al parto se mantengan alejadas de las cabras más jóvenes.
20. Las paredes y suelo del lugar donde se ordeña (sala de ordeño) y de donde se almacena la leche (lechería) deben ser de fácil limpieza y desinfección y encontrarse en buen estado de uso.
21. Todo animal que resulte positivo en el diagnóstico de brucelosis debe ser marcado por los médicos veterinarios oficiales u oficializados del Programa Nacional de Brucelosis del SENASA y sacrificado en la finca o en matadero autorizado, con su respectiva guía de movilización. De esta manera se controla que dicho animal no sea un portador de la enfermedad a otros animales de la finca.
22. La leche de caprinos que se destine para la elaboración de productos o subproductos lácteos de consumo humano como yogurt, helados, queso etc, debe ser pasteurizada.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, M. & M. Ortiz. 2005. Brucelosis caprina. *Cien. Vet.* 21: 2.

Alton, G.G., L.M. Jones, R.D. Angus & J.M. Verger. 1988. *Techniques for brucellosis laboratory.* INRA, France.

Barquero, M. 2011. Ovejas y cabras ganan mercado con quesos, yogurt y carne fina. *La Nación.* Nov. 21: 1A.

Blasco, J.M. 2004. Estado actual de la brucelosis en España. *Prof. Vet. Salud Animal.* 58: 22-34.

Bonilla, R. 2013. Informe determinación de la prevalencia de brucelosis bovina en Costa Rica según el sistema de producción. SENASA, Heredia, C.R.

Cameron, A.R. & Baldock F.C. 1998. A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. *Prev. Vet. Med.* 34: 1-17.

Cameron, A.R. 1999. *Survey Toolbox for Livestock Diseases - A practical manual and software package for active surveillance of livestock diseases in developing countries.* Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.

- Cannon, R.M. & R.T. Roe. 1982. Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians. Australian Government, Publishing Service, Canberra, Aust.
- Carlos, L. 2012. Vigilancia epidemiológica [en línea]: brucelosis. UNED, España. http://sameens.dia.uned.es/Trabajos6/Trabajos_Publicos/Trab_8/Carlos_Santos_8/INI_CIO.htm (Consulta: 3 Sept. 2014).
- Carter, G.R. & D.J. Wise. 2004. Essentials of veterinary bacteriology and mycology. 6. ed. Iowa State Press,a, US.
- CCAIE (Confederación de Cooperativas Agrarias de España). 2007. Guías de prácticas correctas de higiene [en línea]: Caprino de carne y leche. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación, España. http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/ccaecaprino_tcm7-5980.pdf. (Consulta 13 Aug. 2014).
- Crespo, F. 1994. Brucelosis ovina y caprina: brucelosis caprina. Office International des Epizooties, París, Francia.
- De, B., L. Stauffer, M. Koylass, S. Sharp, J. Gee, L. Hesel, A. Steingerwalt, R. Vega, T. Clark, M. Daneshvar, P. Wilkins & A. Whatmore. 2008. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. J.Clin. Microbiol. 46: 43-49.

- Diab, S. & F. Uzal. 2007. Diagnóstico de las causas más comunes de aborto infeccioso en ovidos y caprinos. [en línea]: Enfermedades infecciosas. University of California Davis, EE.UU. <http://www.produccionanimal.com.ar/sanidadintoxicaciones/metabolicos/infecciosas/ovinos/06-reproduccion.pdf>. (Consulta 29 Aug.2014).
- Diachemix. 2010. Fluorescence polarization. [en línea]. <http://www.diachemix.com/en/fluorescence-polarization>. (Consulta 22 Aug.2014).
- FAO (Organización de las naciones unidas para la alimentación y agricultura), OIE (Organización Mundial de Sanidad animal) & WHO (Organización Mundial de la Salud). 2006. Brucellosis in humans and animals. WHO, Geneva, Switzerland.
- Fensterbank, R. 1986. Brucellosis bovina, ovina y caprina: diagnóstico, control y vacunación. Sci. Tech 5: 619-633.
- Foster, G., B.S. Osterdam, J. Godfroid, I. Jacques & A. Cloeckart. 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 2688-2693.
- Gall, D., A. Colling, O. Mariño, E. Moreno, K. Nielsen, B. Pérez & L. Samartino. 1998. Enzyme immunoassays for the serological diagnosis of bovine brucellosis. Trial in Latin America. Clin. Diag. Lab. Immunol. 5: 654-661.

- Gardner, I.A. 2000. Application of diagnostic tests in epidemiologic studies. *Prev. Vet. Med.* 45: 43-59.
- Hutter, S. 2012. Informe sobre la situación sanitaria de Costa Rica, SENASA, Costa Rica.
- López, I. 2010. Enfermedades infecciosas. [en línea]: brucelosis. Universidad de Navarra, España. <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/enfermedadesinfecciosas/materia-les-de-clase-1/Tema%2010.pdf>. (Consulta 03 Sept.2014).
- Lucero, N., S. Ayala, G. Escobar & N.R. Jacob. 2008. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol. Infect.* 136:496-503.
- Matthews, J.G. 2009. Diseases of the goat: brucellosis. 3. ed. Wiley- Blackwell, U.K.
- Montero, D., I. Camacho & M. Campos. 2006. Comercialización de productos de rumiantes menores en Costa Rica. Instituto Nacional de Aprendizaje, San José, C.R.
- Montero, D. 2009. Rumiantes menores utilizados en la producción animal. Universidad Nacional, Heredia, C.R.
- Moreno, E. 2002. Brucellosis in Central America. *Vet. Microbiol.* 90: 31-38.
- Moreno, E. & I. Moriyón. 2002. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:1-3.

- Moreno, J.F., T. Rentería, R. Searcy & M.F. Montaña. 2002. Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la brucelosis bovina en hatos lecheros de Tijuana, Baja California. INIFAP. 3: 243-249.
- Moreno, E. 2004. Desarrollo y validación de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico de la brucelosis. Manual, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Costa Rica.
- Moreno, E. & I. Moriyón. 2006. The genus *Brucella*. p. 315-456. In M. Dorkin, S. Fallkow, E. Rosenberg, K. H. Schleider, and E. Stackebrandt (ed), The prokaryotes. Vol. 5. Springer-Verlag, New York, US.
- Moriyón, I. & C. Gamazo. 1990. Estructura antigénica de *Brucella melitensis* y *Brucella ovis*. 8:35-49.
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2012. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres: brucelosis caprina y ovina (no debida a *Brucella ovis*) 7. ed. OIE, París, Francia.
- Pugh, D. 2002. Sheep and goat medicine. Saunders Elsevier, Pennsylvania.US.
- Romero, R. 2007. Microbiología y Parasitología Humana: brucellosis. 3. ed. Médica Panamericana, México.

Samartino, L. 2002. Brucellosis in Argentina. *Vet. Microbiol.* 90: 71-80.

SCAHAW (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare). 2001. Brucellosis in sheep and goats: *Brucella melitensis*. European Commission. Brussels, Belgium.

Scholz, H., Z. Hubalek, J. Nesvadbova, H. Tomaso, G. Vergnaud, G. Le Fléche, A. Whatmore, S. Dahouk, M. Kruger, C. Lodri & M. Pfeffer. 2008. Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1316-1317.

SENASA (Servicio Nacional de Salud Animal). 2013. Reglamento brucelosis para rumiantes menores. SENASA, Heredia, C.R.

Smith, M. & D, Sherman. 2009. Goat medicine: reproductive system. 2. ed. Wiley- Blackwell, US.

Solorio, J., J. Segura & J. Sánchez. 2007. Seroprevalence of and risk factors for brucellosis of goats in herds of Michoacan, México. *Prev. Vet. Med.* 82:282-290.

Songer, J.G. & K.W, Post. 2005. Veterinary microbiology: bacterial and fungal agents of animal disease. Elsevier Saunders, St. Louis. Missouri.

SVANOVA. 2014. SVANOVIR *Brucella* Ab- C-ELISA [en línea]. Boehringer Ingelheim <http://www.svanova.com/products/ovine/op03.html>. (Consulta 22 Aug.2014).

USFQ (Universidad San Francisco de Quito). 2012. Investigación encuentra bacteria causante de fiebre ondulante en leche cruda de cabra expendida en Quito [en línea]. (Consulta: 25 Apr. 2013).

7. ANEXOS

7.1 Anexo 1

Encuesta Telefónica de Brucelosis Caprina en Costa Rica

Fecha realización:

Datos del Propietario:

Nombre:

Número telefónico:

Datos de la Finca:

Nombre:

Localización:

- Región:
- Provincia:
- Cantón:
- Distrito:
- Dirección Exacta:

Población del Hato Caprino:

Número de hembras:

Número machos:

Historia clínica de la finca:**Factores de Riesgo:**

- Ha tenido abortos en su hato el último año? Sí o No

- Hubo retenciones placentarias? Sí o No

- Se han presentado natimuertos en este último año? Sí o No

- Se han reportado nacidos débiles? Sí o No

- Se han observado problemas de orquitis (inflamación testículos)? Sí o No

- Como elimina los abortos, membranas fetales, desechos de parto y natimuertos? Sí No

Observaciones: _____

7.2 Anexo 2

Encuesta Brucelosis Caprina en Costa Rica

Nombre del Propietario:	Localización:	Fecha:
-------------------------	---------------	--------

1. Características de la finca.

Superficie en hectáreas	Ha.	Infraestructura	Sí	No	Manejo	Marcar con X
1.1 Área total de finca		1.5 Manga			1.9 Pastoreo	
1.2 Área potreros		1.6 Corral			1.10 Semiestabulado	
1.3 Área pasto corte		1.7 Cepo			1.11 Estabulado	
1.4 Otras áreas		1.8 Paridera				
1.12 La finca limita con áreas de vida silvestre		Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>			1.13 Limita con hato bruceloso	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> N/S <input type="checkbox"/>
1.14 La finca drena a otra finca		Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>			1.15 Recibe drenaje de otra finca	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
1.16 Usa heces sin tratar como abono		Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>				

2. Población animal

Población caprina	N°	Otras especies domésticas	N°	Otras especies de mamíferos silvestres	Marcar con X
2.1 Cabritas		2.9 Equinos		2.17 Coyotes	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> N/S <input type="checkbox"/>
2.2 Cabritos		2.10 Cerdos		2.18 Zorros	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> N/S <input type="checkbox"/>
2.3 Cabras jóvenes		2.11 Búfalos		2.19 Pizotes	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> N/S <input type="checkbox"/>
2.4 Cabros jóvenes		2.12 Ovinos		2.20 Mapaches	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> N/S <input type="checkbox"/>
2.5 Cabras		2.13 Bovinos		2.21 Pecaríes	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> N/S <input type="checkbox"/>
2.6 Cabros		2.14 Perros		2.22 Venados	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> N/S <input type="checkbox"/>
2.7 Cabros castrados		2.15 Gatos		2.23 Otros:	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> N/S <input type="checkbox"/>
2.8 Total		2.16 Aves de Corral			

3. Manejo sanitario y reproductivo.

3.1 Utiliza servicios veterinarios en:	Salud <input type="checkbox"/>	Reproducción <input type="checkbox"/>	Ninguna <input type="checkbox"/>
3.2 Utiliza para el servicio a hembras:	Monta natural <input type="checkbox"/>	Inseminación artificial <input type="checkbox"/>	Ambas <input type="checkbox"/>
3.3 Maneja las cabras jóvenes con cabras recién paridas:	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No	
3.4 Aísla las hembras próximas al parto:	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	

3.5 Hay problemas nutricionales y/o parasitarios que afecten la inmunidad. Sí No

4. Reemplazo de cabras.

4.1 N° cabras reemplazadas por año: _____ 4.2 Porcentaje anual de cabras reemplazadas: _____

4.3 Origen de reemplazos: Propios Externos Ambos

4.4 Compra los reemplazos en: Subasta comercial Subasta en finca de hatu puro
Finca de hatu puro Feria y/o exposición Finca cría comercial Comerciante

Otro: _____

4.5 Realiza prueba de brucelosis a los reemplazos previo ingreso al hatu: Si No

4.6 Realiza cuarentena a los reemplazos externos: Si No 4.7 Cuántos días: _____

4.8 Que hacen con los animales con problemas? Si las vende, llene lo siguiente:

Animales	Subasta	Otro ganadero	Matadero	Comerciante	Otro:
Hembras (Si/No)					
Machos (Si/No)					

5. Plan de vacunación.

5.1 Cuáles otras vacunas aplica.

Vacuna	Anticlostridial	Tétano	Otra:
(Sí/No)			
Frecuencia			

6. Historia clínica del hatu.

6.1 Ha tenido abortos en su hatu el último año: Si No 6.2 N° abortos: _____ 6.3 Porcentaje: _____

6.4 Edad aproximada abortos: Gestación Temprana Gestación media Gestación tardía

6.5 Qué hace con la cabra que aborta?

6.6 Hubo retenciones de placenta último año? Si No 6.7 N° casos: _____ 6.8 Porcentaje: _____

6.9 Cómo extrae las placentas retenidas: Manualmente Da tratamiento Aplica peso

Otro: _____

6.10 Quién extrae las placentas retenidas: Propietario Peón Mandador Vecino Veterinario

Otro: _____

6.11 Han nacido cabritos débiles el último año: Sí No 6.12 N°: _____ 6.13 Porcentaje: _____

6.14 Ha tenido cabritos natimuertos el último año: Sí No 6.15 N°: _____ 6.16 Porcentaje: _____

6.17 Cómo elimina los abortos, membranas fetales, placentas, desechos de partos y natimuertos:

Entierra Deposita en letrina Aplica cal Aplica desinfectante Otro: _____

6.18 Ha observado orquitis en sus cabros el último año:	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	6.19 N° casos
6.20 Ha realizado pruebas diagnósticas de brucelosis:	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	6.21 Cuánto hace
6.22 Separa los animales infectados con brucelosis:	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	6.23 Como elimina los animales brucelosos:
Subasta <input type="checkbox"/> Matadero <input type="checkbox"/> Comerciante <input type="checkbox"/> Otro: _____			

Encuestador	Teléfono oficina	Teléfono celular
-------------	------------------	------------------

OBSERVACIONES: _____
