



**EFFECTIVIDAD DE TRES PROTOCOLOS DE
VACUNACION CONTRA BRUCELOSIS BOVINA EN
HATOS LECHEROS DE LA SABANA DE BOGOTA.
2009-2016**



Nilgen Farley Barrera Estrada
Eliana Mireya Gallo Castro
María Camila Rodríguez Zorro

Asesor Metodológico: Daniel Alejandro Buitrago Medina
Asesor Temático: Juan Bernardo Villegas Hurtado

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

UNIVERSIDAD CES
Facultad de Medicina

Especialización en Epidemiología
Bogotá D.C, 25 de abril de 2018



**EFFECTIVIDAD DE TRES PROTOCOLOS DE
VACUNACION CONTRA BRUCELOSIS BOVINA EN
HATOS LECHEROS DE LA SABANA DE BOGOTA.
2009-2016**



Trabajo de investigación para optar al título de
ESPECIALISTA EN EPIDEMIOLOGÍA presentado por:

Nilgen Farley Barrera Estrada
Médico Cirujano

Eliana Mireya Gallo Castro
Médico Veterinario

María Camila Rodríguez Zorro
Química Farmacéutica

Asesor Metodológico: Daniel Alejandro Buitrago

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

UNIVERSIDAD CES
Facultad de Medicina

Especialización en Epidemiología
Bogotá D.C, 25 de abril de 2018

Nota de Salvedad de Responsabilidad Institucional

“Las Universidades del Rosario y CES no se hacen responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

TABLA DE CONTENIDO

1	RESUMEN	7
	ABSTRACT	8
2	FORMULACION DEL PROBLEMA	9
2.1	Planteamiento del problema	9
2.2	Justificación.....	10
2.3	Pregunta de investigación	12
3	MARCO TEÓRICO.....	13
3.1	Brucella spp.	13
3.2	Brucelosis: Enfermedad Zoonótica.....	13
3.2.4	Diagnóstico y Tratamiento de la enfermedad	16
3.3	Medidas de control - Vacunación	17
3.3.1	Vacuna Cepa 19 de Brucella Abortus.....	17
3.3.2	Vacuna cepa RB51	18
3.4	Impacto de la brucelosis en la economía y la salud pública.....	19
3.5	Situación mundial de la brucelosis	20
4	HIPÓTESIS	22
4.2	Hipótesis General.....	22
4.3	Hipótesis Nula	22
4.4	Hipótesis Alterna	22
5	OBJETIVOS	23
5.1	Objetivo General	23
5.2	Objetivos Específicos	23
6	METODOLOGÍA.....	24
6.1	Enfoque metodológico de la investigación.....	24
6.2	Tipo de estudio.....	24
6.3	Población	24
6.3.1	Población o Universo	24
6.3.2	Población Blanco.....	24
6.3.3	Población Elegible.....	24
6.3.4	Criterios de inclusión:	25

6.3.5	Criterios de exclusión:	25
6.4	Diseño muestra	25
6.5	Muestreo y Selección de los Individuos.....	26
6.6	Descripción de las variables.....	27
6.6.1	Diagrama de Variables.....	27
6.6.2	Descripción de las Variables	27
6.6.3	Técnicas de Recolección de información	28
6.7	Control de errores y sesgos	28
6.8	Prueba Piloto.....	30
7	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	32
8	RESULTADOS.....	30
9	DISCUSION.....	38
10	CONCLUSIONES.....	45
11	ANEXOS	46
12	REFERENCIAS.....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Descripción de variables.....	2
Tabla 2.	Distribución geográfica de las hembras bovinas en el estudio	30
Tabla 3.	Factores de riesgo.	31
Tabla 4.	Variables Edad y días de seguimiento.	31
Tabla 5.	Factores de riesgo y variables diagnóstico definitivo y positividad en tamizaje	34
Tabla 6.	Distribución de la población según el protocolo de vacunación.....	35
Tabla 7.	Efectividad de los protocolos de vacunación vs diagnóstico definitivo.....	36
Tabla 8.	Efectividad de los protocolos de vacunación vs diagnóstico definitivo.....	37

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1. Descripción de variables.....	27
Gráfico 2. Gráfico de sedimentación de las dimensiones.....	33
Gráfico 3. Perfiles de los bovinos en hatos lecheros de la sabana de Bogotá.....	34
Gráfico 4. Gráfico de error efectividad de los protocolos de vacunación.....	37

1 RESUMEN

Introducción: La brucelosis bovina es una enfermedad zoonótica causada por *Brucella abortus* que impacta negativamente en la productividad de los hatos, la prevención se realiza mediante vacunación masiva, diagnóstico y eliminación de animales positivos; en Colombia la vacunación es obligatoria en todas las terneras en edades entre 3 y 8 meses de edad con cepa 19 y cepa RB51. Los protocolos de vacunación usados en Colombia son: A: primo-vacunación con **cepa 19**; B: primo- vacunación y revacunación con **RB51** a los 6 meses; C: por último, primo-vacunación con **cepa 19** y revacunación con **RB51** a los 6 meses. Este estudio tuvo como objetivo comparar la efectividad estos tres protocolos en lecherías pertenecientes al programa de certificación de predios libres de la enfermedad en la sabana de Bogotá y la asociación con otras variables del manejo sanitario de los predios.

Métodos: Mediante un muestreo aleatorio simple fueron seleccionadas 66 vacas para el protocolo A, 69 vacas para el protocolo B y 69 vacas para el protocolo C, se realizó la revisión en los archivos de los diagnósticos realizados para brúcela en el tiempo.

Resultados: La efectividad de la vacunación en estudio para el protocolo A y C fue del 100% mientras que para el protocolo B fue del 94,2% [IC 95%, 88,68%- 99,72%], con un valor de $p=0,035$. Se determinó que un diagnostico positivo Elisa Competitiva en vacas estuvo asociado a predios abiertos $p=0,004$ RR 4,25 [IC 95%: 3,31- 5,64]. La tasa de incidencia encontrada en este estudio fue de 8 casos por cada 1.000 bovinos en un año.

Conclusión: Estos hallazgos son consistentes con los reportados en otros estudios de otros países e indican que los diferentes protocolos, así como las cepas para la vacunación contra brucelosis bovina son efectivos para prevenir la enfermedad.

Palabras Claves: *Brucella abortus*, RB51, C19, bovinos, vacunación.

ABSTRACT

Introduction: Bovine brucellosis is known as a zoonotic, contagious disease, caused by *Brucella spp*, which has a negative effect in the milking herds production. The prevention measures are done through massive vaccination, followed by constant diagnosis and disposal of positive animals. In Colombia, the vaccination is mandatory for all the female calves between 3 and 8 months of age, with the following approved protocols: A. 19 strain once in life in female bovines, B. Strain RB51 in female bovines followed by strain RB51 6 months after the first vaccine, and C. Strain 19 in female bovines followed by strain RB51 6 months after the first vaccine. The aim of the study was to compare the effectiveness between those three protocols in milking herd which belong to the certification program of farms free of the diseases in the Bogota's Savannah and the relationship between other attributes with sanitary repercussion.

Methods: Based in a simple random sampling where 66 cows selected for the protocol A, 66 for the protocol B and 69 for the protocol C, with this subjects was made the review in the diagnosis files for the disease in that time.

Results: For the protocol A and C the effectiveness was 100%, whereas the protocol B was 94,2% [IC 95%, 88,68%- 99,72%], $p=0,035$. It was found that positive diagnosis by competitive ELISA in cows is associated to open herds $p=0,004$ RR 4,25 [IC 95%: 3,31-5,64]. The incidence rate was 8 cases per each 1.000 bovines in a year.

Conclusion: Those findings are consistent with the reported results in studies from other countries and indicate that the strains and protocol vaccination against brucellosis bovine are equally effective to prevent the disease.

Key Words: Brucella abortus, RB51, C19, bovines, vaccination

2 FORMULACION DEL PROBLEMA

2.1 Planteamiento del problema

La brucelosis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa de carácter zoonótico, barrera sanitaria para el comercio internacional y causa de grandes pérdidas económicas en los productores.(1) El impacto de la brucelosis en la salud pública, se debe a su carácter zoonótico; la infección al ser humano ocurre la mayoría de las veces por contacto directo o indirecto con animales infectados o sus productos. (2)

La manipulación de animales, fetos, placentas y canales infectados, es un riesgo ocupacional para los veterinarios, trabajadores de plantas de beneficio y trabajadores de fincas o ganaderos. También, es una de las infecciones más fáciles de adquirir en el laboratorio, en el manual de bioseguridad para los laboratorios la Organización Mundial de la Salud- OMS, se clasificaron los microorganismos del género *Brucella* en el grupo de riesgo III. (3, 4)

Sin embargo, un riesgo aun mayor para la población general, es la ingestión de productos lácteos contaminados sin pasteurizar en zonas donde la enfermedad es endémica. Las cifras sobre consumo de leche cruda en Colombia, evidencian un riesgo potencial de infección teniendo en cuenta que la prevalencia para *Brucella* spp en leche cruda se encuentra entre el 13.2% y 15.8%. En Colombia el consumo diario de lácteos en personas entre 5 y 64 años es del 61% y de leche específicamente corresponde al 48.7% por día. La producción diaria en el año 2009 fue de 15.752.509 litros de leche, de los cuales el 81% fue comercializada, el 9% fue procesado en finca y el otro 10% consumido en la misma. En el año 2013, el volumen diario de leche cruda que se comercializo para consumo humano directo en el país fue de 702.827 litros. (4-6)

La infección en el ser humano causa una enfermedad llamada fiebre de malta u ondulante, que puede convertirse en una forma más crónica y producir complicaciones graves que afectan el sistema musculo esquelético, sistema cardiovascular y sistema nervioso central. (4)

El acuerdo de la organización mundial de comercio - OMC sobre la aplicación de medidas sanitarias y fitosanitarias, tiene como objetivo aplicar restricciones a la importación de alimentos para garantizar inocuidad en el comercio e impedir la propagación de plagas y enfermedades animales y vegetales. La OMC reconoce a la OIE como la organización competente en materia de sanidad animal e insta a los países miembros a basar los reglamentos sanitarios animales de acuerdo a sus directrices. En el código sanitario para los animales terrestres de 2016, se encuentran consignadas la normas para la brucelosis, entendida como la infección por *Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, con el objetivo de mitigar la propagación de la enfermedad, así como del peligro para la salud humana. (7)

En Colombia, el Instituto Colombiano Agropecuario - ICA adelanta un programa de prevención, control y erradicación contra Brucelosis Bovina, actualmente las medidas sanitarias para el programa están reguladas por la resolución ICA 1332 de 2013 y se basa en tres aspectos: vacunación masiva, diagnóstico y eliminación de animales positivos. La situación actual para la certificación de zonas libres de brucelosis bovina, muestra que para el año 2014 se habían certificado 13.125 predios y 152.327 bovinos, lo que representa el 2,7% de cobertura del censo de predios ganaderos y 0,7% del censo bovino nacional. En contraste, la cobertura acumulada de vacunación contra brucelosis bovina en el país para el ciclo II- 2014 fue de 95% en predios atendidos y 93% en terneras vacunadas, lo que indica que la vacunación es la herramienta más usada en el programa de prevención, control y erradicación de la brucelosis bovina.(8, 9)

El ICA establece dos ciclos de vacunación anual obligatorios contra brucelosis bovina a todas la hembras bovinas y bufalinas en edades entre 3 y 8 meses de edad con vacunas aprobadas (cepa19 y cepa RB51), los protocolos de vacunación contra brucelosis bovina usados actualmente son: primovacunación con cepa 19 en hembras bovinas en edades de 3 a 8 meses por una vez en la vida del animal, primovacunación con RB51 en hembras bovinas en edades de 3 a 8 meses y re-vacunación con RB51 a los 6 meses, por ultimo primovacunación con cepa 19 en terneras de 3 a 8 meses de edad y revacunación con RB51 a los 6 meses.(8)

La vacuna cepa 19 es la más ampliamente usada en el mundo para prevenir la brucelosis bovina y es la vacuna de referencia para comparar el resto de las vacunas, induce buena inmunidad frente a desafíos moderados por microorganismos virulentos. La efectividad de la RB51 frente a la cepa 19 aún es motivo de discusión.(4)

Teniendo en cuenta que la vacunación es la medida contra la brucelosis bovina de obligatorio cumplimiento con mayor cobertura en el país, se hizo indispensable comparar los tres protocolos de vacunación y evaluar la asociación de cada uno con la incidencia de la enfermedad. Esta investigación comparó la efectividad de tres protocolos de vacunación contra brucelosis bovina para contribuir a la evaluación de esta medida sanitaria y aportar con bases científicas a la toma de decisiones sobre las políticas sanitarias del programa de prevención, control y erradicación de brucelosis bovina.

2.2 Justificación

Prevenir adecuadamente una enfermedad zoonótica como la brucelosis bovina impacta positivamente en la salud pública al disminuir el riesgo sobre los trabajadores expuestos a esta enfermedad de difícil tratamiento(4). Los productores se benefician económicamente al certificar sus hatos como libres de la enfermedad, dado que reciben una bonificación de 10 pesos por litro de leche, contribuye con las metas de abrir puertas a mercados internacionales teniendo en cuenta la barrera sanitaria establecida de brucelosis para el

comercio internacional(10), además impacta positivamente en los índices reproductivos que favorecen la productividad de los hatos.

El impacto económico de la brucelosis varía según la zona geográfica y el grado de desarrollo de los países; es así como los más afectados con esta enfermedad son aquellos en vía de desarrollo; por ejemplo, se cuenta con los datos de Argentina, donde con una prevalencia del 5% de la enfermedad se estimaron pérdidas económicas de 60 millones USD por año, es decir 1,20 USD por bovino(11). Así pues, considerando que la prevalencia en Colombia de la enfermedad es de un 8%(12), el efecto en la economía, que aún no está determinado podría resultar bastante alarmante.

La vacunación con C19 y RB51 es una herramienta usada para el control de la Brucelosis bovina; sin embargo, en Colombia no hay estudios sobre la efectividad del programa de vacunación establecido. Actualmente se cuenta con información de ensayos clínicos que comparan la eficacia protectora de las dos cepas, encontrando un 90% y 85% para la C19 y RB51 respectivamente(13).

Así pues, evaluar las medidas preventivas de un programa de vacunación se puede realizar desde dos perspectivas; La determinación de la eficacia evalúa la intervención preventiva en los individuos en condiciones ideales mediante Ensayos Clínicos, y la efectividad evalúa la acción preventiva de la vacuna sobre la población objeto de dicha intervención en condiciones reales o habituales de los programas sanitarios, mediante estudios observacionales analíticos(14)

El presente proyecto de investigación pretende comparar la efectividad de tres protocolos de vacunación contra brucelosis bovina autorizados por el "Programa Nacional de Prevención Control y Erradicación de Brucelosis Bovina", considerando que en Colombia no se encontraron este tipo de estudios en este campo, además busca que los datos obtenidos permitan considerar estrategias de mejora para el programa y orientar al ganadero para escoger el protocolo más adecuado.

Este estudio se realizará con apoyo de una organización gremial ganadera de Cundinamarca, la cual es una entidad ejecutora de vacunación contra Fiebre Aftosa y Brucelosis Bovina autorizada por el ICA. Esta organización también es Organismo de Inspección Autorizado por el ICA, que mediante la ejecución de actividades de campo e inspección directa verifica los requisitos establecidos para el programa de prevención, control y erradicación de Brucelosis Bovina. Esta organización ha establecido amplio interés para la realización de esta investigación, puesto que los resultados que se obtengan presentan un insumo para la toma de decisiones.

Los resultados de esta investigación deben ser usados como herramientas para la construcción de evidencia respecto a la protección de los protocolos de vacunación contra brucelosis bovina en Colombia que orienten al ganadero para escoger el protocolo de vacunación más efectivo, así como también se presentarán las respectivas recomendaciones al ente regulador ICA teniendo en cuenta los resultados.

Se evaluaron las consideraciones éticas de esta investigación buscando un beneficio, no se maltrató ningún ser vivo y adicionalmente se revisó información del pasado, para buscar beneficios a futuro.

2.3 Pregunta de investigación

¿Cuál es la efectividad en la prevención de animales positivos a *Brucella abortus* de tres protocolos de vacunación contra brucelosis bovina utilizado en hatos lecheros de la sabana de Bogotá pertenecientes al programa de certificación de predios libres durante el periodo 2009 a 2016?

3 MARCO TEÓRICO

3.1 *Brucella* spp.

La brucelosis es el nombre genérico usado para la infección en humanos y animales causada por varias especies del género *Brucella*, endémica en la mayor parte del mundo, principalmente *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*, las cuales han sido descritas como las más patogénicas para el ser humano y el ganado(13). En los bovinos la infección es causada por *Brucella abortus* principalmente, sin embargo *B. melitensis* y *B. suis* también causan infección en los bovinos(15).

La *Brucella* es una bacteria gram negativa, facultativa, cocobacilo, intracelular, inmóvil, aerobio estricto, productor de ureasa y ácido sulfhídrico. Su desarrollo en el organismo hospedero es lento y como característica adicional no poseen capsulas ni forman esporas. Tienen un metabolismo oxidativo, ya que utilizan los nitratos como receptor de electrones, adicionalmente son catalasa y oxidasa positivos, no fermentan los azúcares por lo tanto no modifican la leche, es así como su presencia en la leche no afecta el sabor y apariencia de esta y se requiere de pruebas para su identificación(16).

Las diferentes especies de *Brucella* obtenida en medio de cultivo se clasifican en rugosas y lisas. Este aspecto que adquieren las colonias es debido a la expresión del lipopolisacárido LPS en la superficie bacteriana, LPS-S en las lisas y LPS-R en las rugosas. De esta manera esa diferencia química hace que las cepas de *Brucella* en fase lisa sean las más virulentas y adicional a esto su estructura es similar a la de las enterobacterias. Las cepas de *Brucella* en fase lisa son *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae*(17).

El componente celular principal para el mecanismo infeccioso de la bacteria se encuentra en la pared celular su composición consta de una capa externa y una interna. La capa externa es una membrana rica en fosfatidilcolina, donde su componente mayoritarios es el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina de 9 nm de espesor, este a su vez contiene tres regiones: 1. El lípido A, inserto en la hoja externa de la membrana, 2. El oligosacárido intermedio llamado núcleo y 3. El polisacárido "O" (Cadena "O"; la capa delgada consiste en un complejo entrecruzado muramilo-mucopeptido asociado con lipoproteínas. Las proteínas porinas y de matriz penetran la capa de peptidoglicano de la célula de la membrana, algunas de estas proteínas son de interés diagnóstico como la glicoproteína A2 termoresistente, involucrada en la síntesis de riboflavina que aparece en la etapa de activa de la infección y la proteína periplasmática BP26, que forman parte de un antígeno denominado CP, empleado en pruebas de ELISA(17, 18).

3.2 Brucelosis: Enfermedad Zoonótica

La brucelosis es una enfermedad zoonótica altamente contagiosa, con elevada prevalencia en regiones occidentales de Asia, el sur de Europa y Latinoamérica(19) y se encuentra en la lista de enfermedades epidémicas, según la Organización Animal de Salud (OIE); por tanto, es una enfermedad transmisible importante desde el punto de vista sanitario y socioeconómico con repercusiones considerables en el comercio internacional de animales y productos de origen animal(20).

3.2.1 Transmisión y dispersión

En los animales, la transmisión de *B. abortus* ocurre principalmente por vía oral porque las vacas tienden a lamer los fetos y las descargas genitales que se producen durante el aborto. La exposición a la bacteria, también puede ocurrir en el útero o cuando los terneros nacidos de vacas sanas, son alimentados con calostro o leche de vacas infectadas. La contaminación de los corrales o pasturas ocurre cuando las vacas infectadas abortan o paren normalmente al término de la gestación. Aunque es ampliamente aceptado que *B. abortus* no es excretada por un tiempo considerable previo al aborto, la excreción en la descarga vaginal de vacas infectadas puede ocurrir tan temprano como a los 39 días después de la exposición. Una masiva excreción de *Brucella* comienza después del aborto y puede continuar por 15 días. Aunque la descarga del tracto genital usualmente se libera de microorganismos después de 2-3 meses de la infección, algunas vacas pueden quedar como portadoras y excretar bacterias de manera intermitente y por muchos años(3, 18).

3.2.2 Factores de Virulencia

La capacidad infecciosa de la *Brucella*, está en su capacidad de entrar, sobrevivir y replicar dentro de los macrófagos, células dendríticas (DCs) y tromboplastos de los mamíferos hospederos(18). Esta bacteria logra sobrevivir dentro de la célula ya que evade el sistema inmune del hospedero, limitando las respuestas inmunes propias del organismo, y generando efectos secuestrantes sobre los antibióticos. En los roles de supervivencia y replicación se encuentra involucrado significativamente el sistema tipo IV (T4SS), LPS y BvrR/BvrS(21). Es así como el patógeno tiene la habilidad de replicarse en una amplia variedad de células, incluyendo la microglia, fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales(22).

Biológicamente la *Brucella* es translocada a través de la capa mucosa del epitelio in vivo y es endocitado por los macrófagos de la mucosa, donde sobrevive y se replica mediante un mecanismo de internalización de cremallera. La patogénesis está dividida principalmente en tres fases; primero se encuentra la incubación, periodo en el cual los síntomas clínicos no son evidentes, esta etapa ocurre cuando la *Brucella* ingresa, se reproduce y se prepara para salir de la célula e invadir a otras; posteriormente sigue una fase aguda, durante el cual el patógeno invade y se disemina dentro de los tejidos del huésped, allí se inicia la respuesta inmune y proinflamatoria y sobrevive menos del 10% de las bacterias que se adaptan reduciendo sus mecanismos moleculares asociados a

patógenos; y finalmente la fase crónica en donde se presenta daño severo y hasta muerte de los organismos del hospedero, dada la diseminación de la *Brucella*. La persistencia de la enfermedad está relacionada con la capacidad del microorganismo de sobrevivir en el sistema linforeticular y causar enfermedad allí como a nivel cardiovascular, hepático, neurológico y osteoarticular(18, 21).

La sigilosa naturaleza con la que *Brucella* ingresa a la célula del hospedero, se ha atribuido en gran parte a la estructura lisa de lipopolisacarido (LPS) en la superficie de la célula, puesto que la presencia de ácidos grasos elongados en la porción lipídica A, ha mostrado reducir la toxicidad del LPS de *Brucella* y reducir la respuesta inmune sirviendo como un agonista pobre para los receptores de peaje TLR4, consistente con que el patógeno invade con mínima activación de la célula hospedera. Sin embargo, la *Brucella* rugosa que no contiene el polisacarido "O" es citotóxica para los macrófagos(21).

3.2.3 Respuesta inmune hacia *Brucella spp*

Las acciones de protección del huésped están descritas por la célula Th1, resumida por los roles de las células TCD4+ y TCD8+(21). Los neutrófilos son las primeras células del huésped que se ponen en contacto con *Brucella*. La acción de los neutrófilos bovinos frente a estas cepas lisas es mayor que la de los neutrófilos humanos, no registrándose diferencias entre los dos últimos frente a las cepas rugosas(18).

Otras células que reaccionan ante la presencia de *Brucella* son los macrófagos. El ingreso de la bacteria se produce a través de la interacción entre la molécula CD14 y el LPS, lo que induce la producción de IL12 que estimula las células NK y los linfocitos T colaboradores o helper (LTH) CD4+, que secretan IFN γ favoreciendo el desarrollo de una respuesta inmune mediada por LTH1. Este subgrupo de linfocitos T estimula fundamentalmente la respuesta de tipo celular y participa en forma directa en la protección contra microorganismos intracelulares. El hierro presente en los macrófagos tiene un papel predominante en la eliminación de los microorganismos ya que cataliza una reacción metabólica destinada a incrementar la producción de intermediarios reactivos del oxígeno eliminando los patógenos intracelulares. Una vez fagocitada la bacteria, los macrófagos poseen la capacidad de destruirla inmediatamente, pero la *Brucella* es capaz de inhibir estos mecanismos de destrucción, continuando así con su proceso infeccioso sutil(18, 21).

Los linfocitos también son impactados por distintos antígenos de *Brucella*. Las proteínas de las bacterias son procesadas dentro de la célula presentadora de antígenos y sus péptidos asociados a moléculas CMH clase I y II son presentados a los LTH CD4+ y LT citotóxicos (LTC) CD8+. Estos últimos son capaces de lisar macrófagos y otras células infectadas con *Brucella*(18).

Los primeros anticuerpos que se generan en el curso de una infección son de clase IgM, seguidos de IgG e IgA. Estudios efectuados en bovinos han demostrado que una elevada

concentración de IgG durante una infección activa resulta perjudicial ya que inhibe la lisis complemento dependiente, promueve la fagocitosis de los microorganismos e incrementa la localización intracelular y la diseminación hacia los distintos tejidos. El TNF- α parece contribuir a la formación de los granulomas que se observan en los tejidos infectados(18, 21).

3.2.4 Diagnóstico y Tratamiento de la enfermedad

Los síntomas observados en bovinos son los abortos mientras que los síntomas observados en humanos son similares a aquellos presentados en un contagio de un virus de influenza entre los que se encuentran, fiebre, diaforesis, fatiga, anorexia, mialgia y artralgia. Adicionalmente la evidencia ha sugerido que dada esta exposición en humanos, aumenta el riesgo de aborto en humanos(22, 23).

El diagnóstico con certeza únicamente puede ser determinado mediante el aislamiento del microorganismo en cultivos de sangre, médula ósea u otros tejidos, lo que se denomina pruebas directas pueden emplearse los métodos de ELISA, inmunofluorescencia directa, hemaglutinación reversa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Distintas pruebas serológicas indirectas o pruebas tamiz, se realizan previas a la determinación directa, dada la dificultad del aislamiento del microorganismo entre las que se encuentran la de rosa de bengala, la prueba de fijación del complemento, Aglutinación lenta en tubo de Wright (SAT), prueba de aglutinación con y sin 2-mercaptuetanol (2-ME), Antígeno Tamponado en Placa (BPA), Prueba de Coombs , inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la Elisa Indirecta; después de obtener prueba positiva para alguna de las anteriores, se realiza una prueba confirmatoria o test de alta especificidad como los nombrados inicialmente(18, 23).

Cuando se utilizan los métodos serológicos de diagnóstico deben tenerse en consideración la reactividad cruzada, y el tipo de anticuerpo que predomina en cada etapa. En la etapa aguda se generan anticuerpos aglutinantes La IgM e IgA irán descendiendo progresivamente hasta negativizarse antes de los 6 meses, mientras que la IgG podrá permanecer detectable durante 2 ó 3 años. Los anticuerpos de clase IgG permiten seguir el curso de la infección. Dado lo anterior se pueden generar falsos positivos, es por eso que es indispensable el adecuado manejo y diagnóstico con este tipo de pruebas(18).

Para lograr un diagnóstico inicial correcto se recomienda efectuar pruebas que evidencien la presencia de anticuerpos totales, tanto completos como incompletos. La prueba de Coombs puede ser reemplazada por los métodos de IFI y ELISA que cumplen con este requisito y permiten discriminar además los isotipos de inmunoglobulinas involucrados. ELISA presenta pocos inconvenientes ya que es altamente sensible y específica y detecta

los isotipos de IgG y IgM en el suero, adicionalmente este test requiere mínima cantidad de muestra en sueros(18, 24).

Respecto al tratamiento indicado para esta infección, en hembras bovinas infectadas no se aplica tratamiento, es decir se realiza la disposición de esta, es decir eliminación del predio; mientras que en humanos el tratamiento de la infección es por medio de una combinación de antibioterapia; aunque la respuesta clínica no es rápida ya que la ubicación intracelular reduce la eficacia del antibiótico. El tratamiento dura al menos 30 días con medicamentos clase C (rifampin) y D (tetraciclina y doxiciclina) que no se pueden usar en mujeres embarazadas(25).

3.3 Medidas de control - Vacunación

La prevención de la brucelosis se basa en la administración de vacunas atenuadas vivas, se han utilizado cepas bacterianas atenuadas y componentes propios de la *Brucella*(26).

Las vacunas atenuadas aseguran la inducción de una respuesta inmunitaria completa contra un gran número de componentes y una sobre estimulación del sistema inmune gracias a la replicación de la bacteria. Las cepas que actualmente se emplean en la mayoría de los países para el control de la brucelosis bovina y de pequeños rumiantes son: *B. abortus S19* (*B. abortus cepa 19*) y *B. melitensis Rev.1*, respectivamente. Estas cepas son capaces de establecer una infección limitada imitando el proceso de infección natural por cepas silvestres y confiriendo de esta manera protección contra el aborto y la infección. Sin embargo, el empleo de estas vacunas puede ocasionar abortos en las hembras gestantes e infertilidad por infección genital. Por otro lado, estas vacunas (también denominadas aglutinógenas) inducen anticuerpos que interfieren con las pruebas serológicas de rutina, impidiendo la diferenciación entre animales infectados y vacunados(27).

3.3.1 Vacuna Cepa 19 de Brucella Abortus

La cepa 19 de *Brucella abortus* es una cepa lisa que posee la cadena O del LPS, por ello, en animales inmunizados con esta cepa se pueden observar anticuerpos específicos contra este antígeno del tipo IgG1, IgG2b e IgM. El defecto genético que permite la atenuación de esta cepa aún no ha sido definido, pero hace que pierda un mecanismo de virulencia esencial(28).

Es la vacuna de referencia con la que se compara el resto de las vacunas y una de las más utilizadas. Se utiliza como una vacuna viva las edades recomendadas de vacunación son entre 3 y 6 meses como una dosis única subcutánea de $5-8 \times 10^{10}$ microorganismos viables. Administrar al ganado adulto una dosis reducida de la vacuna puede inducir el

desarrollo de títulos duraderos de anticuerpos, abortar y excretar la cepa vacunal por la leche. Alternativamente, se puede administrar a ganado de cualquier edad en dos dosis de $5-10 \times 10^9$ microorganismos viables por vía conjuntival; esto produce protección sin una respuesta duradera de anticuerpos y reduce los riesgos de aborto y de la excreción en la leche(29).

La vacuna debe prepararse a partir de inóculos derivados del USDA – United States Department of Agriculture y cada lote ha de probarse para pureza (ausencia de microorganismos extraños), viabilidad (bacterias vivas por dosis) y homogeneidad (determinación de la fase de disociación). La virulencia residual y la inmunogenicidad de los lotes de inóculo para la producción de vacuna S19 deben comprobarse regularmente en ratones(29).

Se considera que la vacunación de los terneros con una dosis completa de vacuna S19 confiere inmunidad duradera, y no se recomiendan dosis posteriores. Sin embargo, no existe evidencia probada de esto y en áreas endémicas puede ser aconsejable la revacunación(27).

3.3.2 Vacuna cepa RB51

La vacuna cepa RB51 es una mutación derivada de la cepa virulenta *Brucella abortus* 2308, es una cepa rugosa, resistente a rifampicina. Esta cepa es utilizada desde 1996 contra la brucelosis bovina en Estados Unidos y en otros países, como Chile. Es administrada en dosis que fluctúan entre 1×10^{10} y 4×10^{10} UFC por mililitro (Unidades Formadoras de Colonias) en bovinos no menores de 4 meses de edad(29).

La protección que proporciona la vacunación con esta cepa se debe a la activación de linfocitos T. La vacunación induce altos niveles de IFN- γ , lo cual es fundamental en las etapas primarias de la infección. La inoculación intraperitoneal de *B. abortus* RB51 en ratones resulta en una colonización del bazo que desaparece luego de cuatro semanas. La vacunación con cepa RB51 permite la diferenciación entre bovinos vacunados y aquellos infectados con cepas silvestres debido a que no induce anticuerpos contra la cadena O del lipopolisacárido. Se ha determinado que puede causar placentitis, endometritis e infección fetal, en vaquillas adultas que han sido vacunadas durante la preñez(27).

El estudio del comportamiento protector de la Cepa19 y de la Rb51 ha sido ampliamente estudiado mediante ensayos clínicos. Un estudio realizado por Peniche et al el cual evalúa la eficacia de las dos vacunas en dos hatos cada uno con un grupo vacunado y otro no vacunado conociendo la prevalencia de la enfermedad al inicio del estudio. La RB51 se evaluó en un hato con una seroreacción inicial del 5%, se realizó seguimiento durante 18 meses y se encontró en el grupo no vacunado un incremento en la tasa de seroreacción del 10% al 12.5%, en el grupo vacunado la tasa de seroreacción se mantuvo en 0%, por tanto, se concluyó que la eficacia vacunal es del 100%. La Cepa19 se evaluó

en un hato con una seroreacción inicial del 1.2% después de 18 meses de seguimiento se encontró en el grupo no vacunado una seroreacción del 5.8% y en el grupo vacunado de 0.8%; así la eficacia vacunal fue del 86%. Este estudio concluye que bajo las características de producción evaluadas tanto la Rb51 como la C19 son biológicos eficaces para el control de *Brucella abortus*(13).

Sin embargo, la evaluación de los programas de vacunación contra brucelosis bovina no es ampliamente estudiada, Martins et al realizo un estudio donde reporta los resultados de un programa de vacunación masiva con Rb51 contra *Brucella abortus* en la región de Azores un archipiélago en el atlántico, región autónoma de Portugal. La vacunación masiva inicia en el 2002, la cobertura para hatos y animales logra el pico más alto en el 2005, manteniéndose entre el 60% y el 80% respectivamente hasta finales del 2007. La tendencia muestra una disminución regular en la incidencia en hatos, prevalencia en hatos y prevalencia en animales individuales desde el inicio del programa hasta el final del periodo de estudio. La disminución para incidencia en hatos, prevalencia en hatos y prevalencia en animales individuales disminuyo un 69.26%, 39.26% y 75.41% respectivamente. El estudio mostro que la vacuna Rb51 puede ser usada como herramienta de erradicación de la brucelosis bovina con unidades epidemiológicas bien controladas siempre y cuando la vacunación mantenga las coberturas en un periodo largo de tiempo y en combinación con un adecuado programa de diagnóstico y eliminación de los animales positivos(30).

3.4 Impacto de la brucelosis en la economía y la salud pública

La brucelosis bovina es relevante desde los puntos de vista socioeconómico y sanitario a nivel nacional e internacional. La OMS afirma que esta patología provoca un gran impacto en la economía de las regiones a nivel de producción pecuaria y el valor de sus derivados, afecta de manera importante a los bovinos lecheros, presentándose como manifestaciones más sobresalientes: el aborto, la infertilidad y la baja producción láctea(31, 32).

La incidencia de la enfermedad varía con valores inferiores a 0.01 por 100.000 habitantes en los países desarrollados hasta cifras superiores a 200 por 100.000 habitantes en los países menos desarrollados, con una distribución geográfica de brucelosis humana en estrecha relación a la distribución de brucelosis animal(33).

En Colombia los estudios realizados para brucelosis humana se han limitado a la determinación de prevalencias en personal de alto riesgo: trabajadores de mataderos, veterinarios; se han estimado prevalencias en diferentes estudios que varían desde 4 a 8%(2).

La forma inespecífica con que cursa la enfermedad, los problemas en la captación a nivel local y el bajo porcentaje de enfermos que acuden a los centros de salud o clínicas,

conlleven a una subnotificación y subregistro de los casos que realmente ocurren en el país, por ende, los estudios existentes sobre *Brucella* son esporádicos(34).

La repercusión en la economía es grande; en América Latina se reportan pérdidas en Argentina de 60 millones de dólares americanos (USD), en Centro América, de 25 millones de USD(29). En Colombia se han realizado algunos análisis respecto a pérdidas económicas, en 1993 por valores de hasta de 27.000 millones de pesos al año y en 1999 las pérdidas económicas estimadas fueron calculadas en 42.000 millones de pesos anuales(35) debido a la apertura económica y la globalización y ante la eliminación de las barreras arancelarias en el mercado internacional, se han diseñado políticas gubernamentales para fortalecer la competitividad del sector lácteo colombiano, dentro de estos lineamientos establece la misión del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) de proteger la salud de la ganadería en Colombia, manejar, coordinar y supervisar el programa nacional de vacunación y de Buenas Prácticas Ganaderas(36).

3.5 Situación mundial de la brucelosis

La brucelosis bovina se encuentra controlada en la mayoría de los países desarrollados, sin embargo la enfermedad clínica es común en el Medio Oriente, Asia, África, América central, América del sur, Cuenca Mediterránea y el Caribe.

Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda son considerados libres, así como, países del norte y centro de Europa. En el año 2008, 12 países de la Unión Europea fueron declarados como indemnes y para el año 2014 16 países tenían el estatus de indemnes de brucelosis bovina; España aún no cuenta con dicho estatus y se encuentra en un programa de erradicación de brucelosis financiado por la Unión Europea.

En EE. UU la erradicación de los hatos bovinos es casi completa, todos los estados están clasificados como libres de *B. abortus*, sin embargo en la fauna silvestre persiste la infección en regiones como el área mayor de Yellowstone, con una diseminación ocasional hacia los hatos bovinos(37).

Los países de América Latina y el Caribe, con ayuda de la cooperación técnica de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), han reconocido y abordado las zoonosis como un problema social, económico y sanitario. Se han emprendido programas para prevenir, controlar y erradicar enfermedades, como la rabia, la tuberculosis, la brucelosis, entre otras. A pesar de estos esfuerzos en América del Sur existen cifras preocupantes de prevalencia de brucelosis bovina: Argentina, entre 10 y 14%; Venezuela, del 10,5%; Bolivia, 8,5%; Paraguay, 7,5%; Brasil, 4,7%; Colombia, 4,7%; Chile, entre 3 y 15%; Ecuador, 6% y, en Uruguay 0,5%(38).

En Colombia el Instituto Colombiano Agropecuario- ICA como autoridad sanitaria del país dicta las medidas para la prevención, control y erradicación de la brucelosis bovina, estas

medidas tienen soporte en la resolución 1332 de 2013. Establece dos ciclos de vacunación contra brucelosis bovina, campaña que se desarrolla en conjunto con la de Fiebre Aftosa. La vacunación es obligatoria para todas las hembras bovinas y bufalinas en edades entre 3 a 8 meses de edad con C19 o RB51, la vacunación de hembras adultas solo se realiza con previa autorización del ICA y está prohibida la vacunación de machos bovinos. El programa de certificación de predios bajo la resolución 1332 de 2013, se basa en el diagnóstico de animales positivos mediante pruebas autorizadas para el país. Las pruebas tamiz son Rosa de Bengala, Fluorescencia Polarizada, Fijación de Complemento y Elisa Indirecta; un resultados positivo a cualquier prueba tamiz será confirmado con Elisa Competitiva, los predios con al menos un animal con resultado positivo a la prueba confirmatoria es considerado positivo; la toma de las muestras para el diagnóstico solo puede ser hecha por funcionarios de sanidad animal del ICA o por Médicos veterinarios autorizados por el ICA.

La certificación de un predio como libre de brucelosis bovina se realiza con una serie de muestreos los cuales deben ser negativos, la primera renovación de la certificación es anual y las siguientes son bianuales. Los costos de este programa son asumidos casi en su totalidad por el ganadero, la vacuna C19 no tiene costo y es el único subsidio del programa(8).

4 HIPÓTESIS

4.2 Hipótesis General

La efectividad en la prevención de seropositividad para *Brucella abortus* de los protocolos Cepa 19, RB 51 y Cepa 19 + RB 51 es similar, en los bovinos del programa de prevención control y erradicación de Brucelosis Bovina durante 2009 a 2016.

4.3 Hipótesis Nula

La efectividad en la prevención de seropositividad para *Brucella abortus* de los protocolos Cepa 19, RB 51 y Cepa 19 + RB 51 es igual, en los bovinos del programa de prevención, control y erradicación de Brucelosis Bovina durante 2009 a 2016.

4.4 Hipótesis Alterna

La efectividad en la prevención de seropositividad para *Brucella abortus* de los protocolos Cepa 19, RB 51 y Cepa 19 + RB 51 es diferente (al menos uno de ellos), en los bovinos del programa de prevención control y erradicación de Brucelosis Bovina durante 2009 a 2016.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Comparar la efectividad en la prevención de seropositividad para *Brucella abortus* de los protocolos Cepa 19, RB 51 y Cepa 19 + RB 51 en hatos lecheros de la sabana de Bogotá que se encuentran en el programa de certificación de predios libres de la enfermedad, durante el 2009 a 2016.

5.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar los individuos pertenecientes a la población de estudio, según protocolo de vacunación contra brucelosis bovina utilizado, diagnóstico de brucelosis y estatus sanitario de predio.
- Describir la presentación de brucelosis bovina para los grupos vacunados con cada protocolo estudiado, en hatos lecheros que se encuentran en el programa de certificación de predios libres de la enfermedad en la sabana de Bogotá.
- Determinar la asociación entre la presentación de la enfermedad y los protocolos de inmunización para *Brucella spp.*, así como con otras variables individuales y colectivas en hatos lecheros que se encuentran en el programa de certificación de predios libres de la enfermedad en la sabana de Bogotá.

6 METODOLOGÍA

6.1 Enfoque metodológico de la investigación

Se planteó el desarrollo de una investigación desde el enfoque cuantitativo, por tanto, se eligió una muestra representativa de la población, de la cual se estudian las variables previamente establecidas y se propuso contrastar una hipótesis principal mediante análisis estadístico; Lo anterior con el objetivo de comparar tres protocolos de vacunación contra brucelosis en hembras bovinas de hatos lecheros que se encuentran en el programa de certificación de predios libres de la enfermedad en la sabana de Bogotá.

6.2 Tipo de estudio

Se desarrolló un estudio observacional analítico de cohorte retrospectivo, se tomaron tres cohortes cada una con diferente tipo de protocolo de vacunación contra brucelosis bovina, se siguieron en el tiempo mediante el diagnóstico de brucelosis bovina con pruebas serológicas tamiz y confirmatorias. Esta cohorte es dinámica, ya que los individuos ingresan y salen en cualquier momento del seguimiento. La cohorte retrospectiva se reconstruyó en el tiempo a través de los registros que se encuentran en el organismo de inspección ASOGANADEROS.

6.3 Población

6.3.1 Población o Universo

Hembras bovinas vacunadas contra brucelosis bovina de hatos lecheros en trópico alto.

6.3.2 Población Blanco

Hembras bovinas vacunadas contra brucelosis bovina de razas lecheras que estén en el programa de certificación de hato libre en la sabana de Bogotá, en el organismo de Inspección de ASOGANADEROS.

La caracterización de los predios fue el primer paso para establecer la población blanco, se obtuvieron 248 predios; la estimación de todas las hembras bovinas vacunadas y con diagnóstico serológico en los 248 predios no fue posible ya que todos los registros estaban en físico, lo cual requeriría la elaboración de una base de datos con 85.566 diagnósticos serológicos, debido a que estos fueron los que se realizaron entre el año 2009 y 2016.

6.3.3 Población Elegible

Hembras bovinas vacunadas contra brucelosis bovina de razas lecheras, que estén en el programa de certificación de hato libre en un organismo de inspección autorizado por el ICA y que tengan la información de las vacunas registrada en los archivos de la finca entre 2009-2016.

6.3.4 Criterios de inclusión:

- Hembras bovinas vacunadas en los ciclos establecidos por el ICA y que dicha información esté registrada en los archivos de la finca.
- Hembras bovinas negativas a las pruebas tamiz o confirmatorias al momento de la inclusión en el estudio (programa de hato libre).
- Hembras bovinas sometidas a mínimo dos muestreos de diagnóstico.

6.3.5 Criterios de exclusión:

- Hembras bovinas sin trazabilidad en los registros.
- Acceso a la información denegado por parte del ganadero.
- Hembras bovinas pertenecientes a predios que no vacunan con un único protocolo definido.

6.4 Diseño muestra

Este estudio se desarrolló con tres cohortes dinámicas, donde el factor de exposición o variable independiente es el protocolo de vacunación utilizado, definido de la siguiente manera:

Protocolo A: Vacunación de hembras bovinas en edades de 3 a 8 meses con Cepa 19.

Protocolo B: Vacunación de hembras bovinas en edades de 3 a 8 meses con RB51 y re-vacunación con RB51 al siguiente ciclo de vacunación autorizado por el ICA.

Protocolo C: Vacunación de hembras bovinas en edades de 3 a 8 meses con Cepa 19 y re-vacunación con RB51 al siguiente ciclo de vacunación autorizado por el ICA.

El diagnóstico para brucelosis bovina se realiza en hembras mayores de 24 meses, evitando así sero-positividad a anticuerpos provenientes de la vacunación. Esta es una directriz del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Las pruebas utilizadas para el diagnóstico son de tamizaje, como Elisa Indirecta y Rosa de Bengala; y como prueba confirmatorias Elisa Competitiva.

En este estudio las hembras bovinas ingresaron a cada una de las cohortes con diagnóstico negativo a *Brucella abortus*, a las cuales se les realizó un seguimiento por un periodo comprendido entre 2009 y 2016, con dos o más muestreos de diagnóstico para el diagnóstico por animal.

La variable de desenlace es un diagnóstico positivo a la prueba confirmatoria para *Brucella abortus*, lo que se traduce en un animal infectado o enfermo.

Para la muestra fueron seleccionadas las vacas de hatos en proceso de certificación o renovación de la certificación de predios libres de brucelosis bovina, que cuenten con el registro de la vacunación contra la enfermedad en los ciclos establecidos por el ICA y tengan un diagnóstico negativo.

6.5 Muestreo y Selección de los Individuos

La metodología utilizada para realizar el muestreo y la selección de los individuos se dividió en fases, debido a la disponibilidad de la información.

La primera fase comprendió la caracterización de los predios mediante el desarrollo de una base de datos con la información disponible que contiene el nombre del predio, ubicación, diagnóstico de brucelosis bovina (fecha, prueba y resultado) y tipo de protocolo de vacunación.

Se registraron todos los predios del organismo de inspección para un total de 248 predios, posteriormente se realizó una depuración de los predios que no cumplieron los criterios de inclusión por ubicación e información incompleta; finalmente quedaron 203 predios; de los cuales 159 corresponden al protocolo de vacunación A, 33 al protocolo de vacunación B y 11 vacunan con el protocolo C.

El tamaño de la muestra a utilizar se calculó mediante el programa EpiDat 4.1 para un estudio de cohortes, ya que se evaluará las diferencias en efectividad en cada uno de los protocolos. En el cálculo del tamaño de la muestra se tuvo en cuenta una potencia del 90% con un riesgo en expuestos (Protocolo A y C) del 58% (39), tomado de estudios de la literatura y con un riesgo en no expuestos (Protocolo 2) del 85% (40, 41), con una razón entre no expuestos/expuestos de 1:1. Como resultado, cada uno de los grupos se conforma por 60 individuos; así que el tamaño de la muestra total es 180 animales con 60 animales por protocolo. Aun así, teniendo en cuenta el porcentaje de pérdidas que se pueden generar al perder individuos por criterio de exclusión, se determinó un porcentaje

de pérdidas del 14%, por lo tanto, según el ajuste final se analizan 69 animales por protocolo de vacunación.

La selección de los individuos, teniendo en cuenta el tamaño de muestra calculado, se realizó mediante un marco muestral virtual dado por la mediana de animales por predio, así pues se realizó una lista de números del 1 al n, donde n es el número de animales por protocolo; es decir si para el protocolo A el predio 1 contaba con tres animales se listaba 1,2,3 (un número por celda), y si el predio B tenía 2 animales entonces se continuaba la lista con 4 y 5; una vez terminada la lista se asignaron números aleatorios en Excel y se seleccionaron de manera aleatoria los individuos a seleccionar por predio. La técnica correspondió a un muestreo aleatorio simple (M.A.S.)

De allí se ingresaron el número de individuos en el instrumento de recolección del cual se va a realizar el análisis, se ingresaron al instrumento de recolección las 210 hembras bovinas identificadas.

6.6 Descripción de las variables

- Diagrama de Variables

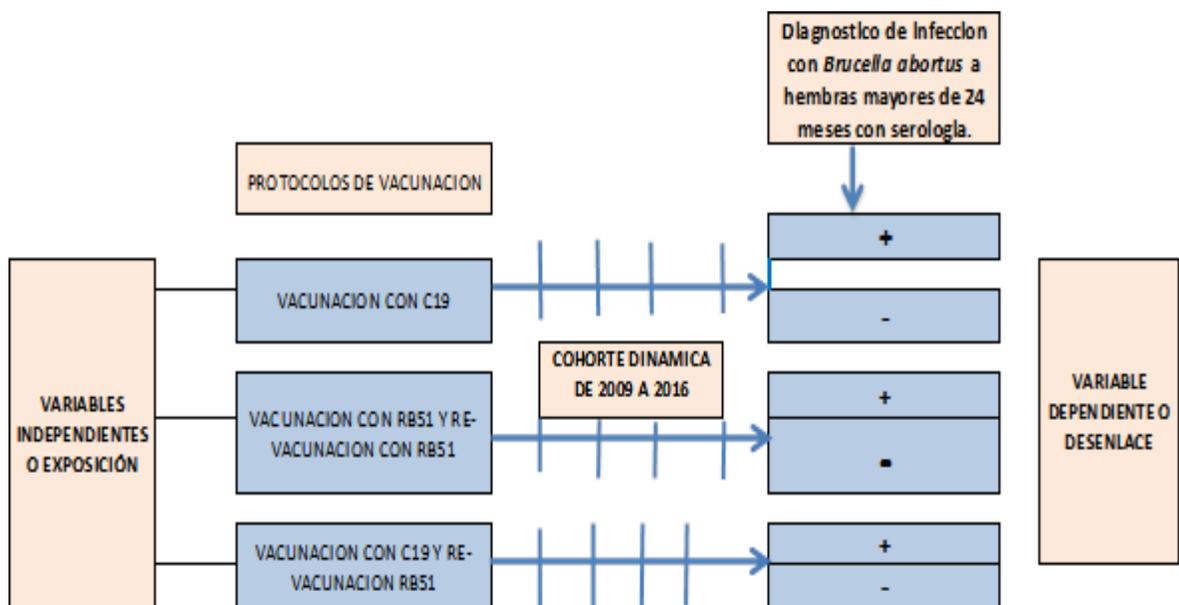


Gráfico 1. Descripción de variables

- Descripción de las Variables

Tabla 1. Descripción de las variables

Nombre	Código	Tipo de Variable	Clase	Escala de Medición	Descripción	Medida
Predio	Predio	Independiente	Cualitativa	Nominal	Nombre del predio	-
Municipio	MUN	Independiente	Cualitativa	Nominal	Nombre del Municipio	-
Vereda	VER	Independiente	Cualitativa	Nominal	Nombre de la vereda	-
Protocolo de vacunación	PV	Independiente	Cualitativa	Categórica	Protocolo A Protocolo B Protocolo C	1/2/3
Prueba Tamiz	TAM	Dependiente	Cualitativa	Categórica	Rosa de bengala, Elisa Indirecta	+ o -
Diagnóstico de brucelosis	DX	Dependiente	Cualitativa	Nominal	Elisa Competitiva	+ o -
Edad en diagnóstico positivo	AGE	Independiente (Confusión)	Cuantitativa	Razón	Edad en meses	meses
Estado del Predio	EP	Independiente (Confusión*)	Cualitativa	Categórica	Abierto/ Cerrado	1/2
Asistencias Técnicas	ASIST	Independiente	Cualitativa	Categórica	Si/No	1/2
Prácticas Reproductivas	REPR	Independiente	Cualitativa	Categórica	Monta Directa, Inseminación artificial, Mixta	1,2,3
Disposición adecuada del material abortado	ABOR	Independiente	Cualitativa	Categórica	Si/No	1/2
Lugar de parto	L_PAR	Independiente	Cualitativa	Categórica	Hato de producción/ Paridera	1/2
Tiempo de seguimiento	T_POS	Independiente	Cuantitativa	Razón	Días	Días

La variable estado de predio se refiere a aquellos predios en los cuales no ingresan bovinos de otros predios es decir las hembras bovinas son reemplazadas por sus crías hembras y no compradas en otros predios.

6.7 Técnicas de Recolección de información

La información analizada en esta investigación proviene de dos fuentes secundarias, que son: los registros de análisis de brucelosis y los registros de vacunación; los primeros

correspondieron a la información sobre el diagnóstico positivo o negativo a *Brucella abortus* de cada una de las hembras bovinas de un predio, esta información se encontraba en el Organismo de Inspección Autorizado ASOGANADEROS, ellos realizaron la toma de las muestras de sangre de los bovinos y las enviaron a los laboratorios autorizados para el diagnóstico de brucelosis bovina; también, procesaron la información de los resultados y presentaron los informes que requiera el ICA en el marco del programa de certificación de predios libres.

La segunda fuente de información es sobre la vacunación de cada una de las hembras bovinas de un predio, la cual se encontraba en el Organismo de Inspección Autorizado ASOGANADEROS, en los archivos propios de los predios.

Una vez recolectada la información que se encontraba en medio físico, se procedió a diligenciar las bases de datos, teniendo en cuenta cada una de las variables de análisis y la respectiva información para la identificación y trazabilidad de cada una de las hembras bovinas. Esta información fue digitalizada por las investigadoras.

La recolección de la información sobre el manejo sanitario del predio se realizó a través de ASOGANADEROS, un veterinario inspector autorizado por el ICA adscrito a este organismo de Inspección realizó el contacto con la persona encargada del manejo sanitario en los predios seleccionados y mediante una encuesta telefónica se recogieron los datos.

6.8 Control de errores y sesgos

- **Sesgo de Selección**

Para controlar errores en la selección de los sujetos se realizó la selección aleatoria de los sujetos incluidos en la muestra. así mismo, se calculó un tamaño de muestra adecuado a la diferencia que fue posible encontrar en la efectividad de los protocolos, el cual se realizó mediante el programa EpiDat 4.1 para un estudio de cohortes, determinando un porcentaje de pérdidas del 14%. En el estudio no se consideraron sesgos por pérdidas de seguimiento, ya que, si el sujeto elegido aleatoriamente no cumple con los criterios de inclusión, se descarta y se procede a tomar el siguiente individuo del registro.

- **Sesgo de información**

El presente estudio al tratarse de una cohorte histórica, utiliza fuentes de información secundaria, correspondiente a los registros de información del organismo de inspección. La información es confiable ya que está sujeta a auditorias permanentes por parte de la autoridad sanitaria y se encuentra en proceso de certificación de calidad ISO 17020; adicional a esto fue diligenciada adecuadamente dentro del proceso de certificación de hatos lecheros y con base en el programa de prevención control

y erradicación de Brucelosis Bovina. Como una estrategia de control una vez seleccionados los sujetos de investigación en cada grupo de exposición a los protocolos de vacunación se realiza confirmación del dato en los registros de vacunación. Adicionalmente, se consideró que dichos procesos de control harán la información válida y que, aunque sería deseable no se realizará depuración o verificación de la información por asuntos logísticos.

- **Sesgo de confusión y modificación del efecto**

En este estudio se realizó la revisión de diferentes variables de manejo sanitario del predio como asistencia técnica, buenas prácticas de disposición de material biológico abortado, estado sanitario del predio, raza del animal, prácticas reproductivas y lugar del parto, y así de ser posible determinar si existen asociaciones con la variable de desenlace.

6.9 Técnicas de procesamiento y análisis de los datos

Para el procesamiento y análisis de los datos se utilizó el programa "IBM SPSS Statistics", el análisis univariado incluyó de medidas de frecuencia, como: frecuencias absolutas y relativas para tipo de protocolo usado; vacuna usada; prueba tamiz usada; estados de predio; número total de vacas vacunadas e infectadas; número de predios infectados., también se calcularon medidas de tendencia central y dispersión.

Se realizó un análisis de correspondencias múltiples con el programa XLSTAT - Base para la población, con el fin de determinar hipótesis sobre aspectos que pudieran influir en la efectividad de los protocolo de vacunación.

Se calculó la tasa de incidencia de Brucelosis en la población objeto de estudio.

Se realizó análisis bivariado para determinar los factores asociados con las dos variables desenlace: positividad a la prueba tamiz y positividad a la prueba confirmatoria, se incluyó comparación de medias en las variables independientes continuas, tablas de 2x2 con pruebas χ^2 en el cruce de variables cualitativas y también cálculo de RR con intervalos de confianza de 95%.

Finalmente se realizó comparación de la efectividad de los protocolos por medio de tablas cruzadas utilizando una prueba estadística de χ^2 .

6.10 Prueba Piloto

Se realizó una prueba piloto para evaluar el instrumento de recolección de las variables del manejo sanitario de los predios para esto se realizaron unas llamadas a personas

encargadas del manejo sanitario de predios que no estaban en el estudio. Como resultado de la prueba se adiciono la variable lugar de parto y se ajustó la forma de las preguntas para que fueran concretas en la respuesta como por ejemplo si o no. También se decidió que las preguntas fueran hechas por máximo dos personas y desde ASOGANADEROS, para generar confianza en las personas que iban a responder ya que conocen la entidad y así mismo esto genera confianza en las respuestas.

7 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio sugiere consideraciones éticas debido a que requiere el uso de información oficial de entidades que planean, desarrolla y ejecutan el programa de prevención, control y erradicación de la brucelosis bovina como el Instituto Colombiano Agropecuario, los Organismos de Inspección Autorizados.

El ICA como autoridad sanitaria autorizo la presente investigación bajo condiciones de confidencialidad y manejo apropiado de la información del organismo de inspección ASOGANADEROS. Esta autorización fue dada mediante oficio físico a través de la dirección técnica de sanidad animal. Por tanto, no se reveló el estatus sanitario de los predios, adicionalmente este trabajo veló por el respeto del buen nombre y la confidencialidad de los datos de los propietarios de los predios.

El manejo de esta información solo fue utilizado para cumplir con los objetivos de esta investigación, no se sacaron conclusiones que no estén contempladas.

Las limitaciones y los sesgos serán controlados en todas las etapas del estudio diseño, ejecución y resultados para evitar conclusiones erróneas. Complementario a esto ASOGANADEROS realizó una encuesta a los predios seleccionados, quienes se les explico telefónicamente para que se les realizaba la encuesta y dieron su consentimiento para responder las 5 preguntas.

Todos los integrantes del grupo de investigación estarán prestos a dar información sobre el estudio a entes organizados, aprobados e interesados en conocerlo siempre y cuando sean de índole académica y científica, preservando la exactitud de los resultados y haciendo referencia a datos globales y no a pacientes o instituciones en particular.

Se mantendrá absoluta confidencialidad y se preservará el buen nombre institucional y profesional.

El estudio se realizará con un manejo estadístico imparcial y responsable.

No existe ningún conflicto de interés por parte de los autores del estudio que deba declararse.

8 RESULTADOS

Se realizó un estudio para comparar la efectividad de tres protocolos de vacunación contra brucelosis bovina en hatos lecheros de la sabana de Bogotá que se encuentran en el programa de certificación de predios libres de la enfermedad, mediante un estudio de cohorte retrospectiva de 2009 a 2016.

8.1 Descripción de la población objeto de estudio

8.1.1 Caracterización de los individuos

El tamaño de la muestra para esta investigación es de 204 unidades de análisis donde aquellas hembras bovinas seleccionadas debían ser pertenecientes a municipios de la sabana de Bogotá. La siguiente tabla muestra la distribución de los bovinos en los diferentes municipios, siendo los municipios de Funza y Facatativá en donde se encuentra la mayor parte de la muestra ambos con un 16,2%.

Tabla 2. Distribución geográfica de las hembras bovinas en el estudio

	Frecuencia	Porcentaje
FACATATIVÁ	33	16,2%
FUNZA	33	16,2%
EL ROSAL	16	7,8%
TABIO	16	7,8%
SUBACHOQUE	15	7,4%
TENJO	14	6,9%
MOSQUERA	11	5,4%
MADRID	9	4,4%
FACATATIVA	7	3,4%
SOACHA	7	3,4%
SUBA	6	2,9%
COTA	5	2,5%
SABANETA	5	2,5%
SUESCA	5	2,5%
TOCANCIPA	5	2,5%
CAJICÁ	4	2,0%
SESQUILE	4	2,0%
GACHANCIPÁ	2	1,0%
BOJACA	1	0,5%
FACATIVA	1	0,5%
GACHANCIPA	1	0,5%
SISGA	1	0,5%
USME	1	0,5%
ZIPACON	1	0,5%
ZIPAQUIRA	1	0,5%

Con respecto a las características en el manejo sanitario de los predios considerados factores de riesgo para infección de Brucelosis Bovina en las ganaderías de leche pertenecientes a la sabana de Bogotá; el objetivo de analizar estas variables es evaluar si interfieren con la efectividad de la vacunación ya que el desafío para la protección de vacunación podría ser diferente en los predios con mayor riesgo de infección.

El 75,0% de las hembras bovinas analizadas pertenecen a predios en los cuales no ingresan bovinos de otros predios es decir se consideran predios cerrados.

Se evaluó si los predios contaban con asistencia técnica profesional por un médico veterinario, encontrando que el 89,7% de las hembras bovinas evaluadas provenían de predios que cuentan con asistencia técnica permanente es decir existe un profesional responsable del manejo sanitario.

En cuanto a los tipos de prácticas reproductivas se encontró que la mayoría de las hembras bovinas analizadas pertenecen a predios donde se usa inseminación artificial con un 51,5%, aunque la combinación de ambas prácticas inseminación artificial y monta directa también se usa en buena parte de la muestra analizada con un 48,0%.

La mayoría de las bovinas hembras analizadas corresponden a predios que realizan disposición adecuada del material abortado con un 81,4%.

El 91,7% de los animales pertenecen a predios que tienen un lugar aparte del hato de producción para el momento del parto.

Tabla 3. Factores de riesgo.

Variable	Categoría	Frecuencia	Porcentaje	IC 95%
Estado del Predio	Abierto	51	25.0%	19.0% - 30.9%
	Cerrado	153	75.0%	69.0% - 80.9%
Asistencia Técnica	Ocasional	21	10.3%	6.1% - 14.4%
	Permanente	183	89.7%	85.5% - 93.8%
Prácticas Reproductivas	Monta Directa	1	1.0%	0,0% - 1,4%
	Combinación	98	48.0%	41.1% - 54.8%
	Inseminación artificial	105	51.5%	44.6% - 58.3%
Disposición de material abortado	No	38	18.6%	13.2% - 23.9%
	Si	166	81.4%	76.0% - 86.7%
Lugar del parto	Hato	17	8.3%	4.5% - 12.0%
	Paridera	187	91.7%	87.9% - 95.4%

Se determinó la edad en años de los bovinos al momento del ingreso del estudio y los días de seguimiento en el estudio. Se obtuvo una distribución no normal para ambas variables; El 50% de la población tiene menos de 4,8 años al ingreso al estudio y menos de 733 días de seguimiento.

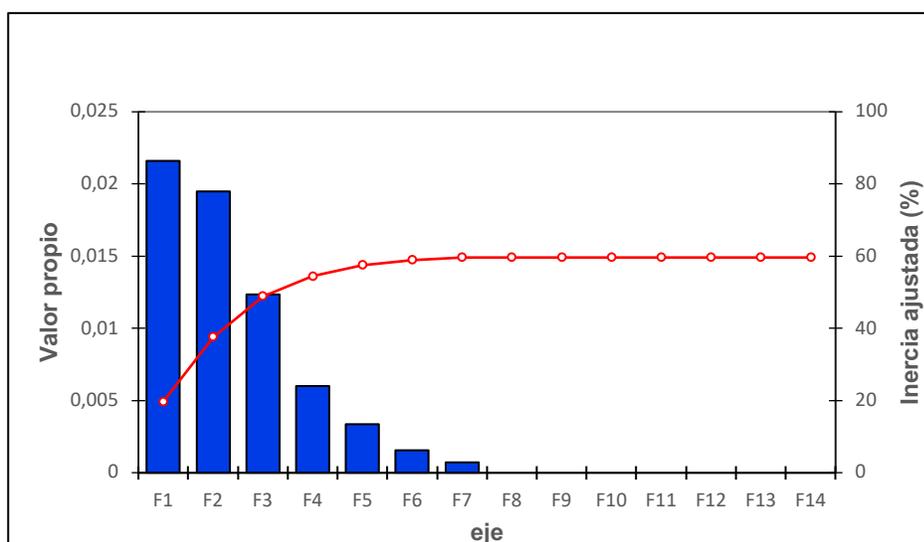
Tabla 4. Variables edad y días de seguimiento.

	Media	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Mín	Máx	Rango	Amplitud	,p*
Edad (Años)	5.2	3.2	4.8	6.1	1.7	12.4	10.7	2.9	0.00
Días de seguimiento	923.2	503	733	1,434.5	93	2,961	2,868	932	0.00

8.1.1 Análisis de correspondencias múltiples

Con el fin de determinar hipótesis sobre aspectos que pudieran influir en la efectividad de los protocolo de vacunación, se realizó un análisis de correspondencias múltiples para la población bovina objeto de estudio con el programa XLSTAT, se observó que las dimensiones 1 y 2 explican el 37,62% de la variabilidad de los datos, siendo el valor propio de la inercia en la dimensión 1 de 0.269 lo que corresponde a 19,76% y de la dimensión 2 0,263 que contribuye a 17,85%. Ver Gráfico 2.

Gráfico 2. Gráfico de sedimentación de las dimensiones.



El análisis de correspondencias múltiples permitió establecer los siguientes perfiles de acuerdo a las variables: (Figura 2)

Un primer perfil asoció de manera significativa las características: pertenecer a los municipios de Bojacá y Soacha con asistencia técnica ocasional y lugar de parto hato; el segundo perfil asoció de manera significativa las características: pertenecer al municipio de Mosquera, de predios categorizados como cerrados y quienes dentro de sus prácticas reproductivas utilizan exclusivamente la técnica de inseminación artificial. En el Perfil 3 se

densidad de incidencia de la enfermedad es de 8 casos por cada 1.000 bovinos en un año.

$$Tasa\ de\ Incidencia\ de\ Brucelosis = \frac{4}{188344} * 365 = 7,75$$

8.2 Factores asociados con diagnóstico definitivo para brucelosis y positividad en las pruebas tamiz

Se realizó un análisis bivariado para determinar los factores asociados con las dos variables desenlace consideradas como positividad a la prueba tamiz y positividad a la prueba confirmatoria; se encontró que la asistencia técnica, las practicas reproductivas, disposición del material abortado y lugar del parto no estaban asociados a la presentación de un diagnostico positivo a Brucelosis Bovina ($p > 0,05$) como se observa en la tabla 5.

El factor que se asoció con un diagnostico positivo a Brucelosis Bovina fue el Estado de Predio ($p = 0,004$), se estimó el riesgo relativo de la cohorte predio abierto (RR: 4, 25 IC: 3,314 – 5,64) y se evidenció que en los predios donde se ingresan vacas de otros predios, tienen 4 veces más probabilidad de tener vacas con un diagnostico positivo a brucelosis bovina.

Tabla 5. Factores de riesgo y variables diagnóstico definitivo y positividad en tamizaje

VARIABLE	Diagnóstico Definitivo		Positividad en Tamizaje	
	p	RR	p	RR
Estado de predio (Abierto o cerrado)	0,004*	4,2 IC: 3,3- 5,6	0,1	3,2 IC: 0,8-11,6
Asistencia Técnica (Permanente u Ocasional)	1,00	1,0 IC: 1,0-1,0	0,6	1,0 IC: 1,2-1,0
Practicas Reproductivas (Monta directa y combinación)	1,00	1,0 IC: 0,9-1,0	1,0	1,2 IC: 0,9-1,0
Practicas reproductivas (Monta directa e Inseminación artificial)	1,00	1,0 IC: 1,0-1,1	0,1	1,0 IC: 0,9-1,0
Practicas reproductivas (Combinación de ambas practicas e Inseminación artificial)	0,62	0,3 IC: 0,0-3,4	0,6	0,2 IC: 0,05-1,2
Disposición de material abortado. (Si o No)	1,00	1,2 IC: 1,0-1,0	0,1	1,0 IC: 1,0-1,1
Lugar de parto (Hato o paridera)	1,00	1,2 IC: 1,0-1,0	0,6	1,0 IC: 1,0 -1,0

Se realizó análisis de la variable edad con las variables desenlace diagnóstico definitivo y positividad a la prueba tamiz con la prueba estadística de Mann Whitney, se pudo establecer que las medianas de edad en el grupo que tuvo diagnóstico definitivo positivo para Brucelosis fueron diferentes a las medianas de edad en el grupo que presentaron diagnóstico definitivo negativo para brucelosis con un valor de $p=0,027$.

El análisis de los datos para los sujetos respecto a la edad y la positividad a la prueba tamiz no fueron estadísticamente significativos.

8.3 Comparación de la efectividad de los protocolos de vacunación

La distribución de los animales en las variables utilizadas para comparar la efectividad de los protocolos de vacunación se ve reflejada en la tabla 6, donde de acuerdo a la metodología y muestreo utilizado se aleatorizaron 69 animales para cada protocolo, y en el caso del grupo de Cepa 19, se presentaron 3 pérdidas.

El 2% de los animales muestreados dieron positivo a prueba diagnóstica definitiva para Brucella y 4,9% dieron positivo a prueba diagnóstica tamiz. Ver tabla 7 y 8.

Tabla 6. Distribución de la población según el protocolo de vacunación

	Frecuencia	IC 95%
Cepa 19	66 (32,4%)	25,9%- 38,8%
Protocolo RB51	69(33,8%)	27,3%- 40,2%
Cepa 19 + RB51	69(33,8%)	27,3%- 40,2%

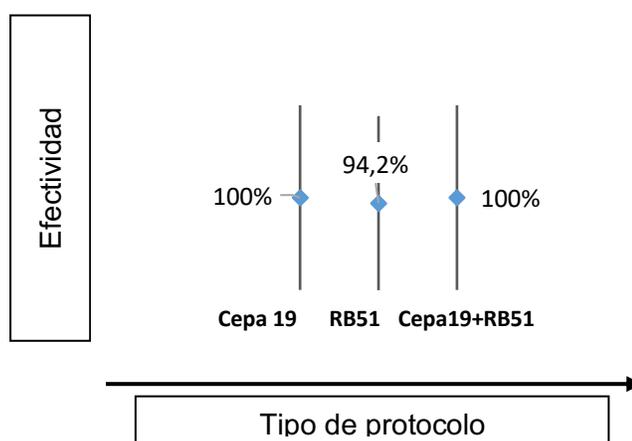
Se realizó comparación de la efectividad de los protocolos por medio de tablas cruzadas utilizando una prueba estadística de χ^2 , se obtuvo el valor de 0,035 el cual indica que existe una diferencia significativa; no obstante dicho estimador no permite concluir sobre las diferencias reales en los protocolos dado que existieron casillas en cero (0), es decir que para los protocolos de Cepa 19 y de Cepa19+RB51 ningún animal tuvo diagnóstico definitivo para la enfermedad, por lo tanto calcular la medida epidemiológica de riesgo relativo no fue calculada y se procedió a observar la variabilidad de los estimadores de efectividad comprándolos mediante un gráfico de error (gráfico 4).

Sin embargo, podemos obtener los resultados de la efectividad en cada uno de los protocolos.

Tabla 7. Efectividad de los protocolos de vacunación vs diagnóstico definitivo

		Diagnóstico Definitivo Positivo	IC95%	Diagnóstico Definitivo Negativo	IC95%	p
Protocolo	Cepa 19	0	0,00%	66 (100%)	100%	0,035
	RB51	4 (5,80%)	0,28%-11,32%	65 (94,2%)	88,68%-99,72%	
	Cepa 19 + RB51	0	0,00%	69 (100%)	100%	
Total		4		200		

Gráfico 4. Gráfico de error efectividad de los protocolos de vacunación.



Adicional a este análisis se determinó como segunda variable desenlace el diagnóstico positivo en pruebas tamiz, dando como resultado la tabla 8, donde se puede evidenciar que el 3% vacunados con Cepa 19 se enfermaron, el 7,20% con RB51 y el 4,30% con Cepa19+RB51. Sin embargo al calcular si existía alguna diferencia entre los resultados de los diferentes protocolos, se obtuvo un valor de 0,613 para un Test Exacto de Fisher, por lo tanto se puede determinar que no hay diferencias significativas entre los protocolos para obtener diagnóstico positivo en pruebas tamiz.

Tabla 8. Efectividad de los protocolos de vacunación vs diagnóstico Tamiz.

		Prueba tamiz positiva	IC 95%	Prueba tamiz negativo	IC 95%	p
Protocolo	Cepa 19	2 (3.0%)	-1.1%-7.1%	64 (97.0)%	92.8%-101.1%	0.613
	RB51	5 (7.2%)	1.10%-13.30%	64 (92.8%)	86.7%-98.9%	
	Cepa 19 + RB51	3 (4.3%)	-0.4%-9.0%	66 (95.7%)	90.9%-100.4%	

9 DISCUSIÓN

La presente investigación es la primera realizada en Colombia donde se evalúa la efectividad de la vacunación contra Brucelosis Bovina en el contexto del programa de prevención, control y erradicación donde la vacunación constituye una de las herramientas más importantes para la prevención de enfermedades transmisibles y estudiar la efectividad de un programa de vacunación corresponde evaluar los efectos sanitarios en los individuos vacunados en condiciones de aplicación no óptimas o las habituales de los programas de vacunación (42).

La comparación de la efectividad de los protocolos de vacunación se realizó por medio de una prueba estadística de χ^2 obteniendo un valor de $p= 0,035$ indicando así que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tres protocolos de vacunación, si bien este valor de p es significativo al ser menor de $0,05$, las frecuencias de diagnóstico positivo para Cepa 19 y RB51+Cepa19 fueron 0 (Ver Tabla 7), de tal forma, las diferencias calculadas seguramente estarán relacionadas con RB51 que correspondió al protocolo que presentó los casos de brucelosis. En tal sentido, se asumió que dichas diferencias pueden ser derivadas de la imposibilidad de encontrar sujetos positivos en los otros 2 protocolos y por ello, se compararon las variabilidades de los estimadores de efectividad, encontrando que existe una muy alta probabilidad de que las efectividades sean iguales. así que no es concluyente, y al ahondar en los casos positivos se encontró que 3 de 4 correspondieron a un mismo predio y a un mismo muestreo serológico de diagnóstico, es decir que estos 3 animales al ser diagnosticados al mismo tiempo pueden corresponder a un foco de infección tratándose de casos que comparte un mismo espacio geográfico y por consiguiente los mismos factores de riesgo para la enfermedad, siendo así y teniendo en cuenta el análisis previamente reportado se concluye que no hay diferencias entre la efectividad de los tres protocolos.

Entre las características de las vacunas usadas para la prevención de brucelosis bovina una muy importante es la interferencia con el diagnóstico serológico de la enfermedad como es el caso de la Cepa 19 que contiene la cadena O- del lipopolisacárido y en los bovinos vacunados produce anticuerpos a esta cadena que son los mismos que se detectan en las pruebas serológicas para determinar infección por cepas de campo lo que dificulta diferenciar animales vacunados de infectados(43). El contexto de la brucelosis en cada región determina las pruebas diagnósticas a usar para identificar los animales infectados, en países como Colombia en el cual se usa cepa 19 y pruebas altamente sensibles como Rosa de Bengala se realizan pruebas confirmatorias más específicas para determinar si son anticuerpos vacunales o realmente infectados. Sin embargo, el concepto "prueba confirmatoria" no es absoluto, un bovino positivo a Rosa de bengala y negativo a la prueba confirmatoria puede ser un bovino en estado temprano de infección. La interferencia para discriminar entre animales vacunados e infectados en nuestro estudio se controló escogiendo hembras vacunadas entre 3 y 8 meses de edad y el diagnóstico fue realizado mínimo a los 24 meses e ingresaron seronegativas al

seguimiento. Lo que indica que los animales encontrados como positivos en nuestro estudio son animales realmente infectados.

El análisis de correspondencias indica que el manejo sanitario de los predios puede estar relacionado con el municipio al cual pertenecen; La asistencia técnica ocasional y el lugar de parto en el hato se asocia a bovinos pertenecientes a los municipios de Bojacá posiblemente porque allí la región se caracteriza por ser una zona de minifundio donde la tecnificación de los hatos es menor, donde el promedio de bovinos por predios es de 22, como consecuencia el manejo sanitario no es tan estricto. Estas mismas características en el manejo sanitario están asociadas al municipio de Soacha, es posible que por la cercanía a la ciudad la consecución de trabajadores con experiencia en el sector sea precaria y pueda generar que el manejo sanitario de las fincas no sea el óptimo. También afecta que muchas fincas se han urbanizado y algunas están en proceso de urbanización lo que puede influir en no tener un sistema de producción con proyección a futuro.

Mosquera ha sido un municipio productor de leche por excelencia el promedio de bovinos por predio es de 54 y se caracterizan por un manejo sanitario adecuado la producción es tecnificada y concuerda con usar Inseminación artificial y no permitir el ingreso de animales.

El municipio de Facatativá está asociado a usar practicas reproductivas combinadas y predios abiertos, este municipio es un corredor entre la región del Gualivá y la Sabana de Bogotá el comercio de ganado allí es importante lo cual puede sugerir que el ingreso de bovinos a los predios es una práctica común. La presencia de predios pequeños en este municipio es frecuente lo que puede sugerir que las practicas sanitarias no sean tan estrictas, por tanto, es posible que no todos los ganaderos tienen termo de congelación de pajillas y utilicen la monta directa también como alternativa.

El sistema de producción en el municipio de Funza se caracteriza por ser tecnificado y tal como se evidencia el manejo sanitario es adecuado, además son predios que cuentan con 46 bovinos por predio, se asocian con recibir asistencia técnica permanente y manejo de los partos aparte.

Datos precisos y actuales sobre la incidencia de la enfermedad en nuestra región no están descritos. Generalmente se encuentra información sobre la región asiática, ya que tanto allí como en Latinoamérica se encuentra la mayor prevalencia de Brucelosis Bovina. Como se ha determinado mundialmente según la OIE las zonas con más presencia de brucelosis bovina son Latinoamérica y Oriente Medio. En Colombia la incidencia varía entre 2% y superior al 5%, donde la región andina tiene un valor de 3,2%, estos datos corresponden a información del ICA del año 2008 y se ajustan con lo reportado por la OPS/OMS (18, 44, 45), Lo que concuerda con lo determinado en esta investigación para la sabana de Bogotá ya que durante 2009-2016 se enfermaron 4 animales de 204 lo que equivale aproximadamente al 2%.

En este estudio, las vacas fueron vacunadas de acuerdo al programa nacional de erradicación de brucelosis bovina, sin embargo, así pertenezcan al programa es imposible controlar todas las variables que afectan la efectividad de la vacunación. Existen reportes de la disminución de la enfermedad con vacunación masiva y eliminación de animales positivos; un estudio realizado en el archipiélago de Azores en Portugal zona que produce el 30% de la leche en ese país, reporta los resultados de la implementación de la vacunación masiva con RB51 integrada a dos estrategias de diagnóstico y eliminación de animales. Allí se observó que a medida que aumentaron en el tiempo las coberturas en los hatos y por animal de 60% y 80% respectivamente desde el año 2002 hasta el 2007, la incidencia en hatos disminuyó en un 69,26%, la prevalencia en hatos disminuyó en un 39,3% y la prevalencia en animales disminuyó en un 75,4%.(30) Concluyendo que una masiva vacunación combinada con estrategias como diagnóstico y eliminación de animales positivos puede ser una herramienta útil para erradicar la brucelosis bovina. Esto puede ser similar a lo encontrado en nuestro estudio en donde fueron analizados animales de unidades epidemiológicas "predios" que pertenecen al programa de certificación de fincas libres de brucelosis bovina, cuyas estrategias son las mismas vacunación masiva, diagnóstico periódico y eliminación de los animales positivos a las pruebas confirmatorias. Esta estrategia podría explicar que para la muestra analizada en este estudio la incidencia es baja con 8 casos por cada 1.000 bovinos en un año.(30)

Aunque la vacunación ha demostrado disminuir significativamente la prevalencia y la incidencia de la brucelosis bovina, la efectividad de esta puede verse afectada y retardada por la presencia elevada de la bacteria, la raza, edad como variables individuales, aunque también por las condiciones del entorno como los son el estado del predio, tamaño del predio (46-48), el lugar de parto, la frecuencia de las asistencias técnicas y las prácticas reproductivas, estos factores de riesgo fueron evaluados en un estudio realizado en Brasil en 2016 donde se obtuvo que en hatos grandes el riesgo de infección OR es de 3,42 [CI95% 2,98–3.91] comparado con hatos pequeños, el uso exclusivo de inseminación artificial es un factor protector versus las otras formas de reproducción con un OR de 0,57 [IC 95%0,40–0,81] y la asistencia veterinaria regular también actúa como un factor protector con un OR de 0,68 [0,60–0,77](49). Estas variables fueron evaluadas en la presente investigación, aunque dada la baja incidencia de la enfermedad no se pudo analizar extensivamente, pudiendo determinar que los cuatro animales que fueron positivos a la enfermedad pertenecen a predios abiertos, es decir aquellos predios que permiten ingreso de animales al hato. Otra variable que puede interferir con la efectividad de la vacunación es predio abierto, en este estudio fue significativo y está asociado con la presentación de bovinos positivos en los predios, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura. En Eritrea en la región de Asmara un país ubicado al norte de África, se realizó un estudio en un área donde se encuentra la mayoría de granjas lecheras intensivas del país; allí se observó que las granjas con razas mixtas tenían mayor riesgo de presentar animales positivos a brucelosis bovina debido a que son granjas en las cuales ingresan bovinos comprados lo cual aumenta el riesgo de ingresarlos infectados al hato. (48)

La comparación de la efectividad de tres protocolos de vacunación contra Brucelosis Bovina en un programa de vacunación no está reportada, sin embargo, la evaluación de las cepas vacunales C19 y RB51 se ha realizado en hospederos naturales mediante ensayos clínicos controlados con desafíos virulentos controlados. La eficacia de las vacunas en brucelosis bovina varía según el grado de exposición a la *Brucella abortus* patógena, así, la eficacia aumenta a medida que la exposición disminuye.(42)

Otros estudios indican que aproximadamente entre el 65% a 75% de los bovinos vacunados con cepa 19 ya sea en condiciones de campo o ensayos controlados tienen protección completa contra la mayoría de los tipos de exposición a brucelosis bovina y el 25% a 35% restante tendrá un grado variable de protección, resultados que son similares a los estudios realizados en bovinos vacunados con RB51.(39)

Varios reportes en la literatura científica tienen como objetivo demostrar las diferencias entre las C19 y RB51, sin embargo, la evaluación de la efectividad de la combinación de ambas cepas con primo vacunación con cepa 19 y revacunación con RB51 no es común, en la presente investigación se consideró como el protocolo C. En un estudio realizado en España en la región de Extremadura evaluaron el efecto de masiva revacunación con RB51 para la contención de un brote, la medida fue instaurada cuando las terneras de reemplazo entre 3 y 6 meses de edad estaban siendo vacunadas con cepa 19. Se evidenció que la tasa anual de disminución de la prevalencia en rebaños fue del 76.26% (C.I.95% 64.60-84.08). El control de este brote fue más rápido que otros reportados en donde se instauró vacunación masiva únicamente con RB51; lo cual es atribuido en parte a la combinación de cepa 19 y RB51 y frecuencia de las revacunaciones(47). Un experimento controlado en bovinos jóvenes demostró que la vacunación con dosis reducidas de RB51 es ineficaz y otras observaciones sugieren que la RB51 es ineficaz cuando la prevalencia de la enfermedad es alta en los hatos(50). A diferencia de nuestro estudio la aplicación con RB51 en terneras siempre se realizó mediante la revacunación con otra dosis de RB51 o con Cepa 19, por tanto, no se incluyeron terneras con una dosis única de RB51; lo cual puede sugerir la no diferencia encontrada en la protección de los tres protocolos dado que la estrategia de vacunación viene acompañada de una posterior revacunación.

Otros estudios han evaluado la protección de RB51 en hatos con brucelosis activa en México revacunando con dosis reducida de RB51 la cual protege en un 94% pero, produciendo una respuesta humoral atípica en los test serológicos convencionales (40), sin embargo otros investigadores indican que las múltiples revacunaciones con RB51 no inducen seroconversión en test serológicos (51, 52). Sin embargo en nuestros resultados obtenidos para la positividad en pruebas tamiz no se encontraron diferencias entre los tres protocolos.

IMPACTO

La efectividad de la vacunación bovina contra Brucelosis es determinante de la prevalencia de la enfermedad; la cual una vez presentada tiene un gran impacto en la

economía de las regiones, por tanto, en Colombia el Instituto Colombiano Agropecuario con el programa de control y erradicación de Brucelosis ha alcanzado una cobertura vacunal del 97% para el año 2016 y para el año 2017 aumento al 98% con 2.503.024 terneras vacunadas, realizada con Cepa 19 y cepa RB51 en hembras mayores de 8 meses de edad en dos ciclos de vacunación anuales (53); es así como estas investigaciones apoyan o sirven de soporte para que el ICA pueda tomar decisiones con resultados reales de la población bovina colombiana.

Los programas exitosos de erradicación de la brucelosis bovina se basan en Diagnostico, eliminación de bovinos positivos y vacunación masiva; En Colombia los predios certificados como libres de brucelosis bovina en los cuales se realizan estas medidas son 17.355 de 584.274 predios existentes en el país de acuerdo al censo en la vacunación contra Fiebre Aftosa ciclo II-2017, lo cual equivale al 3% de los predios existentes. Esto indica que la efectividad de los protocolos de vacunación puede ser diferente cuando se incluyan en estudios bovinos pertenecientes a predios que no están en el programa, lo cual acercaría aún más a la realidad la efectividad de los protocolos usados en Colombia para prevenir la brucelosis bovina.(53)

LIMITACIONES

En la presente investigación se analizó con una muestra proveniente de un organismo de inspección, en donde los predios inscritos garantizan que sus bovinos estén vacunados, por lo que se cuenta con individuos controlados bajo esta condición y otras medidas anteriormente descritas. Así pues, realizar un estudio a futuro con población no inscrita a un organismo de inspección puede brindar resultados para comparar con la presente investigación y así poder llegar a aportar a la autoridad sanitaria animal sobre los programas de vacunación.

La mayoría de los hatos analizados al ser pertenecientes a la sabana de Bogotá venden su leche a grandes empresas que manufacturan productos lácteos, por lo que deben garantizar que sus fincas cumplan con ciertos estándares de calidad, por lo tanto, es importante realizar un estudio en hatos de bovinos para la producción cárnica o en otras regiones del país y así conocer cómo se comporta la vacunación contra brucelosis en esos sistemas de producción.

Por otro lado, teniendo en cuenta todos los factores de riesgo en la literatura para la presentación de la enfermedad no fueron incluidos en el análisis ya que no fue posible acceder a esa información. Por ejemplo, en un estudio realizado en la India se encontró que la raza afecta la efectividad de la vacuna; lo cual no fue determinado en este estudio y sería interesante analizarse a futuro con las razas bovinas lecheras presentes en Colombia.

Los resultados se infieren a la población definida como población objeto, por lo que los resultados no deben ser tomados de manera literal en contextos diferentes al estudiado.

10 CONCLUSIONES

La mayoría de los predios estudiados tienen un adecuado manejo sanitario, esto indica que, aunque la vacunación como medida preventiva de la enfermedad es obligatoria, no es la única actividad que se realiza en las fincas para evitar la entrada de la enfermedad lo cual es beneficioso para los ganaderos como para el programa.

La presentación de la enfermedad en los individuos estudiados fue muy baja y no se logró concluir alguna diferencia entre los tres protocolos descritos ya que todos presentaron una efectividad alta, esto indica la importancia de vacunar las terneras como lo establece el ICA ya que esta baja frecuencia de la enfermedad muy posiblemente se debe a la vacuna sin importar con que protocolo y al buen manejo sanitario de los predios que hacen los ganaderos del programa.

Las diferencias en el manejo sanitario en los municipios indica que, aunque el sistema de explotación es la misma lechería especializada, algunas características geográficas y culturales hace que el manejo varíe mínimamente entre municipios.

Los resultados del presente estudio sirven para ser evaluados por el organismo regulado, Instituto Colombiano Agropecuario ICA, ya que con los datos se pueden desprender series de investigaciones a futuro para comparar, robustecer o contrariar los resultados, todo con el fin de aportar a la salud pública animal, humana y a la economía del país.

11 ANEXOS

Anexo 1. Carta de aprobación ASOGANADEROS

ASOGANADEROS

Tenjo, 28 de Noviembre de 2016

Doctoras

NILGEN FARLEY BARRERA
MARIA CAMILA RODRIGUEZ
ELIANA MIREYA GALLO

Estudiantes Especialización en Epidemiología Universidad del Ces en convenio con Universidad del Rosario.

Bogotá, D.C.

De acuerdo a la carta recibida donde indican su interés de trabajar en la investigación: "Comparación de la efectividad en tres protocolos de vacunación contra brucelosis bovina en un estudio de cohortes" para optar por el título de Especialistas en Epidemiología de la universidad del CES en convenio con la universidad del Rosario, con el respaldo y la asesoría de nuestra institución.

Les informamos que la Asociación de Ganaderos Facativá- ASOGANADEROS como organismo de inspección Autorizado por el Instituto Colombiano Agropecuario- ICA, se interesa por desarrollar proyectos de investigación con bases científicas sólidas que solucionen problemas que afectan al sector ganadero y generen impacto en la sanidad animal, por tanto es de nuestro agrado poder acompañar y orientar el proceso investigativo mencionado. Teniendo en cuenta que la información para el desarrollo de la investigación en gran parte se encuentra en ASOGANADEROS y la cual está sujeta a unas cláusulas de confidencialidad se iniciara el debido proceso con la autoridad sanitaria y los ganaderos para gestionar dichos permisos.

ASOGANADEROS por tanto supervisara dicho proceso de investigación y podrá formular las observaciones del caso las cuales serán analizadas conjuntamente.



Juan Bernardo Villegas Hurtado
Gerente **ASOGANADEROS**

KM 4 VÍA AL TOPISTA MEDELLÍN BOJÓN POINT SIBERIA LOCAL 26 SEGUNDO PISO
TEL: 7432893

Anexo 2. Carta solicitud autorización estudio ICA.

ASOGANADEROS

Tenjo, 02 de Diciembre de 2016

Doctor
MARIO PEÑA
Dirección Técnica Sanidad Animal
INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO- ICA

Respetado Doctor:

El Instituto Colombiano Agropecuario- ICA ha establecido en el sector ganadero programas de prevención, control y erradicación de enfermedades que impactan en salud pública y son barrera sanitaria para comercio internacional, con el objetivo de ser más competitivos en el mundo globalizado. Por esta razón ASOGANADEROS como organismo de Inspección Autorizado para los programas de Brucelosis Bovina y Tuberculosis Bovina, se interesa por desarrollar proyectos de investigación con bases científicas solidas que aporten al avance en las campañas de erradicación para las enfermedades de impacto en sanidad animal.

Es de suma importancia para ASOGANADEROS poder acompañar y asesorar el proyecto de investigación "Comparación de la efectividad en tres protocolos de vacunación contra brucelosis bovina en un estudio de cohortes" estudio propuesto estudiantes para optar por el título de Especialistas en Epidemiología de la Universidad CES en convenio con la Universidad del Rosario.

La información para el desarrollo de esta investigación hace parte del programa de certificación de predios libres de brucelosis bovina, de los predios atendidos por ASOGANADEROS, sujeta a cláusulas de confidencialidad; por tal motivo solicito la autorización para usarla en la investigación. Esta información será usada con responsabilidad, confidencialidad y no podrá usarse para otros fines ni conclusiones que no estén estipuladas en este estudio.



Juan Bernardo Villegas Hurtado.
Gerente ASOGANADEROS



Anexo 3. Carta Autorización ICA.



Instituto Colombiano Agropecuario

11.2.8.2
Bogotá,

Doctor
JUAN BERNARDO VILLEGAS H
Gerente
ASOGANADEROS
Tel: 7432893
KM.4 VIA AUTOPISTA MEDELLIN ROUND POINT SIBERIA LOCAL 26 2 PISO
Tenjo, Cundinamarca

MINAGRICULTURA



I.C.A. 13/12/2016 17:44
Al Contestar cite este No.: 20162122260
Origen: Dirección Técnica de Sanidad Anim
Destino: ASOGANADEROS
Anexos: Fol:1

ASUNTO: Autorización Uso Información

Respetado Doctor Villegas:

Atendiendo su solicitud, recibida mediante oficio con fecha Diciembre 02 de 2016, la Dirección Técnica de Sanidad Animal considera que bajo las condiciones de confidencialidad y manejo apropiado de la información con la que cuenta Asoganaderos, es factible adelantar el proyecto de investigación sobre "Comparación de la efectividad en tres protocolos de Vacunación contra Brucelosis bovina en un estudio de cohortes".

Consideramos importante esta investigación, toda vez que en su desarrollo es posible que los datos obtenidos permitan considerar estrategias a implementar en el Programa nacional de Prevención, Control y Erradicación de la Brucelosis en Colombia.

Por tal motivo cuenta con la autorización para su uso, pero solicitamos formalmente participar en las reuniones programadas de inicio, seguimiento y conclusiones generadas sobre la investigación.

Cordial Saludo,

MARIO EDUARDO PEÑA GONZALEZ
Director Técnico de Sanidad Animal

Elaboró: Cmcl

Carrera 41 N°. 17 - 81 Zona Industrial de Puente Aranda. Bogotá
Conmutador: (571) 3323700 Fax: 2884169
www.ica.gov.co



Pág. 1 de 1 Rad: 20162122260

Anexo 4. Aprobación Comité operativo de investigaciones



UNIVERSIDAD CES
Un Compromiso con la Excelencia
Resolución del Ministerio de Educación Nacional No. 1371 del 27 de marzo de 2007

Medellín, 04 de mayo de 2017

Estudiantes
NILGEN FARLEY BARRERA ESTRADA
MARÍA CAMILA RODRÍGUEZ ZORRO
ELIANA MIREYA GALLO CASTRO
Especialización en Epidemiología
Bogotá

nfbarrera@hotmail.com
camilar24@gmail.com
elianagalloc@hotmail.com

Asunto: Comunicación del Comité Operativo de Investigaciones. **Código: Acta167Proy010**

Proyecto: Efectividad de tres protocolos de vacunación contra brucelosis bovina en hatos lecheros de la sabana de Bogotá. 2009-2016

Respetados Estudiantes:

En el Comité Operativo de Investigaciones de la Facultad de Medicina de nuestra Universidad se aprobó, como consta en el Acta No. 167 del 02 de mayo de 2017, su proyecto de investigación "EFECTIVIDAD DE TRES PROTOCOLOS DE VACUNACION CONTRA BRUCELOSIS BOVINA EN HATOS LECHEROS DE LA SABANA DE BOGOTA. 2009-2016".

De igual manera, el Comité reviso y aprobó desde el punto de vista ético dicho proyecto y este aval expedito se registra en el Comité de Ética correspondiente de la Dirección de Investigación e Innovación de la Universidad CES.

Cordial saludo,



MÓNICA M. MASSARO C, MD. MSc.
Jefe División Investigación e Innovación
Facultad de Medicina

Copia:
Dra. Angela Espinosa (angela.espinosa@urosario.edu.co) y Dra. Yolanda Torres (ytorres@ces.edu.co), Coord. Posgrados Epidemiología Convenio CES – Univ. Rosario
Dr. Hernán García. Jefe División de Salud Pública (hgarcia@ces.edu.co)

www.ces.edu.co Calle 10A No. 22-04 A.A. 054 591 Conmutador 444 05 55 fax 266 60 46 NIT 890.984.002-6 Medellín / Colombia

12 REFERENCIAS

1. Valera Y, Sánchez W, Sánchez G, Pérez F. Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET [Internet]. 2005. Available from: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090905/090503.pdf>.
2. Morales D, Combariza D. Seroprevalencia de brucelosis en trabajadores de mataderos de municipios del Tolima (Colombia). Revista Ciencias de la Salud. 2004(1):15.
3. Salud OOMdl. Brucellosis in Humans and animals: Ginebra (Suiza) World Health Organization. 2006.
4. Crespo F, Gutiérrez F, Rodríguez F, León L, Cuello F, Gimeno E, et al. The translation into Spanish of the OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees): problems, solutions and conclusions. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics). 2005;24(3):1095-104.
5. Salud. INd. Identificación de riesgos biológicos asociados al consumo de leche cruda bovina. In: Social. MdIP, editor. Bogotá DC2011.
6. Mercado M, González V, Rodríguez D, Carrascal A, Javeriana. PU. Perfil sanitario nacional de leche cruda para consumo humano directo. In: Ministerio de Salud y Protección Social OdIN, Alimentación Upl, FAO yIA, editors. Bogotá DC.2014.
7. Thiermann B. International standards: the World Organisation for Animal Health Terrestrial Animal Health Code. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics). 2015;34(1):277-81.
8. Resolución 001332 de 2013., (2013).
9. Ganaderos FNd. Programa de prevención, control y erradicación de la Brucelosis Bovina. Bogotá DC2012 [Available from: <http://www.fedegan.org.co/programas/programa-de-prevencion-control-y-erradicacion-de-la-brucelosis-bovina>].
10. Resolución número 000017 de 2012, por la cual se establece el sistema de pago de la Leche Cruda al Proveedor., (2012).
11. McDermott J, Grace D, Zinsstag J. Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. OIE Revue Scientifique et Technique. 2013;32(1):249-61.
12. B B, E J, D. R. Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de Brucelosis y Leptospirosis en los operarios de la planta de beneficio de Pasto, Nariño. Universidad y Salud. 2012(1):42.
13. Peniche C, Martínez H, Barradas P, Franco Z, Molina S, Gutiérrez R, et al. Evaluación en campo de la eficacia vacunal de las cepas RB51 y S19 de Brucella Abortus en hatos naturalmente infectados con brucelosis en clima tropical. VI Congreso Internacional de Epidemiología [Internet]. 2009. Available from: <https://www.uv.mx/veracruz/cienciaanimal/files/2013/11/Evaluacion-en-campo-de-la-eficacia-vacunal.pdf>.
14. Borràs E, Domínguez À, Salleras L. Evaluación de la efectividad de los programas de vacunación. Gaceta Sanitaria. 2011;25(Supplement 1, June 2011):49-55.
15. Keleher L, Skyberg A. Activation of bovine neutrophils by Brucella spp. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2016;177(Supplement C):1-6.
16. Gillespie S, Hawkey P. Principles and practice of clinical bacteriology.: John Wiley & Sons; 2006.
17. Romero R. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias.2007.

18. Castro H, González S, Prat M. Brucellosis: Una revisión práctica. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana [Internet]. 2005; 39:[203-16 pp.]. Available from: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572005000200008&nrm=iso.
19. Francesco C, Lucia C, Antonio C, Paola R. Contamination of bovine, sheep and goat meat with Brucella spp. Italian Journal of Food Safety, Vol 5, Iss 3 (2016). 2016(3).
20. OIE. Omdsa. Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2017. 2017 [Available from: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2017/>].
21. Vishnu US, Sankarasubramanian J, Rajendhran J, Gunasekaran P. Identification of OtpR regulated sRNAs in Brucella melitensis expressed under acidic stress and their roles in pathogenesis and metabolism. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2017;50:40-7.
22. De Figueiredo P, Ficht TA, Adams LG, Rice-Ficht A, Rossetti CA. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of Brucella-host interactions. American Journal of Pathology. 2015;185(6):1505-17.
23. Baud D, Greub G. Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes. Clinical Microbiology and Infection. 2011;17(9):1312-22.
24. Uzal A, Carrasco E, Nielsen K, Echaide S, Cabrera F. An indirect ELISA using a monoclonal anti IgG1 enzyme conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Veterinary Microbiology. 1996;52(1):175-80.
25. Ariza J, Gudiol F, Pallares R, et al. Treatment of human brucellosis with doxycycline plus rifampin or doxycycline plus streptomycin: A randomized, double-blind study. Annals of Internal Medicine. 1992;117(1):25-30.
26. Dorneles E, Sriranganathan N, Lage P. Recent advances in Brucella abortus vaccines. Veterinary Research. 2015;46(1):76.
27. Estein S. Brucellosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. 2006;7(5).
28. Rivers R, Andrews E, González-Smith A, Donoso G, Oñate A. Brucella abortus: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. Archivos de medicina veterinaria. 2006(1):7.
29. Animal. OMDs. Código sanitario para animales terrestres 2008. Brucellosis Bovina. In: OIE, editor. Animales Terrestres. XXI ed2012. p. 637.
30. Martins H, Garin-Bastuji B, Lima F, Flor L, Pina Fonseca A, Boinas F. Eradication of bovine brucellosis in the Azores, Portugal--Outcome of a 5-year programme (2002-2007) based on test-and-slaughter and RB51 vaccination. Preventive Veterinary Medicine. 2009(1-2).
31. Lucero N, Escobar G, Ayala S. Manual de procedimientos: "técnicas para el diagnóstico de brucellosis en humanos". 2008.
32. Xolalpa V, Pérez M, Córdova A. Evaluación de las pérdidas económicas por eventos de falla reproductiva asociadas a brucellosis bovina en hembras y explotaciones de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, México.2010:[190 p.]. Available from: <http://ez.urosario.edu.co/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edssci&AN=edssci.S0798.22592010000200012<=es&site=eds-live&scope=site>.
33. Ibañez C. Epidemiología de la Brucellosis. Madrid.: Blogs Madrid; 2007

34. INS INdS. Informe final Brucelosis Humana Datos Retrospectivos en Colombia. In: Paredes A, editor. Bogotá D.C.2009.
35. Astaiza-Martínez J B-MJ, Diaz-Rojas J. Estudio de costo-efectividad del programa de vacunación contra *Brucella abortus* en bovinos en el departamento de Nariño 2012; 41.
36. Social CNDPEy. CONPES 3675. Competitividad en el Sector Lácteo Nacional. Política Nacional para Mejorar la Competitividad del Sector Lacteo Colombiano. 2010.
37. Diaz E. Epidemiology of Brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. OIE Revue Scientifique et Technique 2013. p. 43-60.
38. Veterinaria OPdISP-CPdFASP. Informe Final. Brucelosis y Tuberculosis situación de los programas en las Americas. PAHO; 2000.
39. Fernando P. Poester a b, Vítor S.P. Goncalves c, Tatiane A. Paixao, Renato L. Santos a,, Steven C. Olsen d GGSe, Andrey P. Lage a,* . Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis 2006; 24.
40. Peniche A MD, Barradas F, Franco L, Molina B, Gutiérrez E, Williams J, Morales F, Flores R. Eficacia Vacunal de las Cepas RB51 y S19 de *Brucella Abortus* en Hatos Naturalmente Infectados con Infectados con Brucelosis en Areas Tropicales del Sur de Veracruz, México 2009.
41. Fiorentino MA CE, Cravero S, Arese A, Paolicchi F, Campero C, Rossetti O. Protection levels in vaccinated heifers with experimental vaccines *Brucella abortus* M1-luc and INTA 2. Veterinary Microbiology: Elsevier; 2008.
42. Borràs E, Domínguez À, Salleras L. Evaluación de la efectividad de los programas de vacunación. Gaceta Sanitaria. 2011;25:49-55.
43. Moriyon I GM, Monreal D, González D, Marín C, López I, Mainar R, Moreno E, Blasco J . Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status 2004. p. 1-38.
44. J O. Análisis de Seropositividad de Brucelosis Bovina Mediante Elisa Competitiva y Fluorescencia Polarizada entre el 1 de septiembre de 2014 y 13 de Febrero de 2015 en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) Seccional Nariño. Universidad de Nariño (Udenar) 2015.
45. Vaneza T, Marco G, Salim M. SEROPREVALENCE OF *Brucella abortus* IN CATTLE OF THE CORDOBA DEPARTMENT / SEROPREVALENCIA DE *Brucella abortus* EN BOVINOS DEL DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA. Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica. 2009(2):51.
46. Arifa S HJ, Hernandez M, McGillc D, Thomsonb P. Evaluation of threeserological tests for diagnosis of bovine brucellosis in smallholder farms in Pakistan by estimating sensitivity and specificity using Bayesian latent class analysis. 2018p. 21-8.
47. Sanz C, Sáez JL, Álvarez J, Cortés M, Pereira G, Reyes A, et al. Mass vaccination as a complementary tool in the control of a severe outbreak of bovine brucellosis due to *Brucella abortus* in Extremadura, Spain. Preventive Veterinary Medicine. 2010;97(2):119-25.
48. Omera M SE, Woldehiwetc Z, Holstad G. Risk factors for *Brucella* spp. infection in dairy cattle farms in Asmara, State of Eritrea Preventive Veterinary Medicine 2006. p. 257-65.
49. Arrais A FF, Ferreira J, Augusto R, Amakub M, Grisi-Filho J, Oliveira E, Salvador V. Large-scale study of herd-level risk factors for bovine brucellosis in Brazil. Acta Trópica: Elsevier; 2016. p. 226-32.

50. Herrera-López E, Suárez-Güemes F, Hernández-Andrade L, Córdova-López D, Díaz-Aparicio E. Epidemiological study of Brucellosis in cattle, immunized with Brucella abortus RB51 vaccine in endemic zones. *Vaccine*. 2010;28(Supplement 5):F59-F63.
51. Uzal FA, Carrasco A, Cabrera RF, Taddeo HR, Samartino L, Schurig G, et al. Effect of vaccination with Brucella abortus strain RB51 on heifers and pregnant cattle. *Veterinary Research Communications*. 2000;24(3):143-51.
52. Crawford RP, Sanders RB, Adams LG. Early removal of cows with Brucellosis and the effect in strain 19 vaccinated cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 1988;5(3):191-5.
53. AGROPECUARIO. IC. Vacunación contra brucelosis bovina. 2016 [Available from: <https://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Enfermedades-Animales/Brucelosis-Bovina-1/Vacunacion-Brucelosis.aspx>].