

# Caracterización serológica y molecular de *Brucella* spp. en ganaderías bovinas del cantón Guaranda

## Serological and molecular characterization of *Brucella* spp. in cattle farms in the Guaranda canton

Willian Conde Castillo <sup>1</sup> , Franklin Román Cárdenas <sup>1</sup>

Siembra 13 (1) (2026): e8636

DOI: [10.29166/siembra.v13i1.8636](https://doi.org/10.29166/siembra.v13i1.8636)

Recibido: 24/08/2025

Revisado: 20/10/2025 / 31/03/2026

Aceptado: 09/04/2026



<sup>1</sup> Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias Campus Académico “Alpachaca” Av. Ernesto Che Guevara s/n y Av. Gabriel Secaira, Guaranda, Bolívar, Ecuador.

Correspondencia: [froman@ueb.edu.ec](mailto:froman@ueb.edu.ec)

### Resumen

Brucelosis es una enfermedad causada por bacterias gramnegativas del género *Brucella*, provocando principalmente abortos e infertilidad, ocasionando pérdidas económicas significativas, con riesgo para la salud pública, el objetivo es identificar y determinar la prevalencia serológica y molecular, y biovares de *Brucella* en ganaderías bovinas lecheras. Se realizó un muestreo basado en el cálculo total de hembras bovinas en edad reproductiva del cantón, con un margen de error del 7,3%, seleccionando una muestra por cada 146 hembras bovinas. Se utilizó la prueba iELISA para el diagnóstico serológico en 180 muestras de suero bovino, se confirmó mediante PCR, y se realizó secuenciamiento del material genético. Los resultados mostraron una prevalencia del 2,8% mediante iELISA y del 3,8% mediante PCR, con una incidencia de 2 nuevos casos en un mismo predio. En la parroquia San Lorenzo, con el 1,6% de los casos, mientras que las parroquias Gabriel Ignacio Veintimilla, Guanujo, Salinas y Simiatug presentaron una prevalencia del 0,5% cada una. La PCR y la secuenciación se realizaron en Macrogen, Inc., Seúl, Corea del Sur. Las secuencias obtenidas se limpiaron utilizando Chromas versión 2,6 y se ensamblaron con BioEdit versión 7,2 ingresándose posteriormente en BLAST para identificar la bacteria. Con MEGA versión 11,13 se construyó un árbol filogenético de las relaciones entre las diferentes biovariedades de *Brucella*. Este es el primer estudio en el que se identifica la bacteria mediante secuenciación en el cantón Guaranda.

**Palabras clave:** árbol filogenético, *Brucella*, PCR, secuenciación, zoonosis

### Abstract

Brucellosis is a disease caused by Gram-negative bacteria of the genus *Brucella*, primarily causing abortions and infertility, resulting in significant economic losses and posing a risk to public health. The objective of this study was to identify and determine the serological and molecular prevalence and biovars of *Brucella* in dairy cattle farms. Sampling was conducted based on the total estimated number of reproductive-age female cattle in the canton, with a margin of error of 7.3%, selecting one sample for every 146 female cattle. The iELISA test was used for serological diagnosis in 180 bovine serum samples, confirmed by PCR, and genetic sequencing was performed. The results showed a prevalence of 2.8% by iELISA and 3.8% by PCR, with an incidence of 2 new cases per farm. In the San Lorenzo parish, 1.6% of cases were identified, while the Gabriel Ignacio Veintimilla, Guanujo, Salinas, and Simiatug parishes each had a prevalence of 0.5%. PCR and sequencing were performed at

SIEMBRA

<https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/SIEMBRA>

ISSN-e: 2477-8850

Periodicidad: semestral

vol. 13, núm 1, 2026

[siembra.fag@uce.edu.ec](mailto:siembra.fag@uce.edu.ec)



Esta obra está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución - NoComercial

© Los Autores 2026

Macrogen, Inc., Seoul, South Korea. The obtained sequences were cleaned using Chromas version 2.6 and assembled with BioEdit version 7.2, then entered BLAST to identify the bacteria. A phylogenetic tree of the relationships between the different *Brucella* biovars was constructed using MEGA version 11.13. This is the first study in which the bacterium has been identified through sequencing in the canton of Guaranda.

**Keywords:** *Brucella*, PCR, phylogenetic tree, sequencing, zoonosis

## 1. Introducción

La ganadería en Guaranda no solo impulsa la economía local, sino que también contribuye al suministro de productos cárnicos y lácteos a nivel regional y nacional. Sin embargo, la presencia de enfermedades, como la brucelosis, puede afectar significativamente la productividad y sostenibilidad del sector ganadero. La brucelosis es una patología infectocontagiosa del ganado con notables repercusiones económicas, y se ha convertido en un desafío crucial para la ganadería.

Causada por diversas bacterias del género *Brucella*, la enfermedad afecta a una amplia variedad de especies animales, siendo el bovino el principal, y en ocasiones al ser humano a través de leche no tratada o pasteurizada incorrectamente, sus productos derivados o el contacto con secreciones vaginales del aparato reproductor del animal durante el manejo (World Organisation for Animal Health, 2022).

La identificación de *Brucella* incluye la serología, que busca detectar anticuerpos específicos, el cultivo microbiológico, que se constituye en la prueba Gold Standard llegando al aislamiento de la bacteria y la identificación molecular que es un procedimiento rápido que no requiere el cultivo de la bacteria y minimiza el riesgo de contaminación en el laboratorio, a través de este procedimiento se detectan secuencias específicas y se estable diferencias entre especies. Esta investigación se enfoca en identificar molecularmente *Brucella* y determinar las diferentes biovariedades circulantes en las ganaderías del cantón Guaranda.

Con una población de 26.327 vacas en edad reproductiva, el establecimiento de buenas prácticas en ganadería bovina en este cantón es un componente esencial para la seguridad alimentaria y la economía local (Agrocalidad, 2023). La etiología de la brucelosis, causada por diferentes especies de *Brucella* como *abortus*, *melitensis*, *suis*, etc., se manifiesta principalmente con abortos y problemas reproductivos en los animales, generando pérdidas económicas considerables para los productores de ganado (World Organisation for Animal Health, 2022). La información recabada contribuye a la comprensión de la distribución de la brucelosis y proporciona datos valiosos para estrategias de control y prevención, asegurando el bienestar del ganado, la seguridad alimentaria y la salud pública.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Toma de muestras

Se tomaron muestras de sangre de hembras bovinas en edad reproductiva de las diferentes parroquias del cantón Guaranda: Ángel Polibio Chávez (1), Gabriel Ignacio Veintimilla (13), Guanujo (64), Facundo Vela (2), Julio Moreno (1), Salinas (44), San Lorenzo (6), San Luis de Pambil (14), San Simón (9), Santa Fé (2), Simiatug (24), dando un total de 180 muestras.

### 2.2. Obtención de la muestra

Para obtener la muestra se desinfectó la zona de la piel y, mediante punción en la vena coccígea, se recolectaron las muestras utilizando una aguja de doble dirección estéril y un tubo vacutainer de tapa amarilla de 5 mL. Se etiquetó con un código relacionado a la finca de procedencia, parroquia y sector, luego se guardó en un *cooler* con gel refrigerante hasta su procesamiento.

### 2.3. Obtención de suero

Las muestras de sangre se centrifugaron durante 5 minutos para obtener el suero, este se guardó en tubos Eppendorf y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.4. Prueba serológica

Una vez obtenidas todas las muestras se procedió a realizar la prueba de iELISA indirecto mediante el kit para Elisa de VETLIS CHEMTEST para detectar anticuerpos *anti-Brucella*. El fundamento de la prueba es la fijación de antígenos en una microplaca, seguida de la incubación con el suero bovino, que contiene anticuerpos que se unen a los antígenos. Tras un lavado, se añaden anticuerpos secundarios marcados con una enzima. La reacción con sustrato produce un cambio de color proporcional a la cantidad de anticuerpos, permitiendo la detección temprana de la infección al comparar la absorbancia con valores de referencia del kit que se miden en el lector de microplacas de ELISA, determinando así la presencia y cantidad de anticuerpos en el suero bovino y su interpretación siguiendo las recomendaciones del fabricante.

## 2.5. Pruebas Moleculares

Se siguió el siguiente procedimiento:

- i. **Extracción de material genético.** Para realizar la prueba molecular, se extrajo ADN (bacteriano) en sangre de los animales positivos a iELISA: 1M, 4M, 5M, 6M y 7M. También se incluyeron dos muestras adicionales (2M y 3M) provenientes de la parroquia San Lorenzo, que no fueron muestreados previamente, pero estuvieron en contacto con una vaca positiva dentro del mismo predio, se utilizó el kit para extracción de ADN PureLink™ Genomic DNA el cual lisa la pared celular de la bacteria y libera el material genético, se cuantificó en ng/uL y la pureza del ADN mediante la relación de absorbancia A280/A260, los ácidos nucleicos absorben A 260 nm y las proteínas A280 nm la relación de ADN entre 1,8 y 2 es de buena calidad, esta medición se realizó mediante un espectrofotómetro Nanodrop (DNA bacteriano).
- ii. **Amplificación mediante PCR.** Las muestras fueron enviadas a MacroGen, Inc., en Seúl, Corea del Sur, donde se realizaron las PCR. Para el experimento, se sintetizaron los primers universales B4: 5'- TGGCTCGGTTGCCAATATCAA -3' y B5: 5'- CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG -3', que amplifican bandas de 223 pb (Figuras 1 y 2) y se unen a la región interna del gen BSCP31, presente en todas las especies de *Brucella*. Además, se usaron los primers universales IS711: Forward: 5'-TCGCTCGTCTGAACTCGC-3' y Reverse: 5'-AATCCGGCCGTTTGCAGG-3',

que amplifican bandas de 498 pb y se unen a una región específica de la secuencia de inserción IS711, presente en todo el género *Brucella*.

La PCR con los primers IS711 se realizó bajo el protocolo y condiciones establecido por MacroGen, (PCR estándar + Purificación).

La PCR con los primers B4 y B5 se realizó bajo las siguientes condiciones enviadas a MacroGen: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, anillamiento a 60 °C por 30 segundos, y extensión a 72 °C por 1 minuto. El proceso finalizó con una extensión adicional a 72 °C durante 10 minutos (PCR personalizada + Purificación).

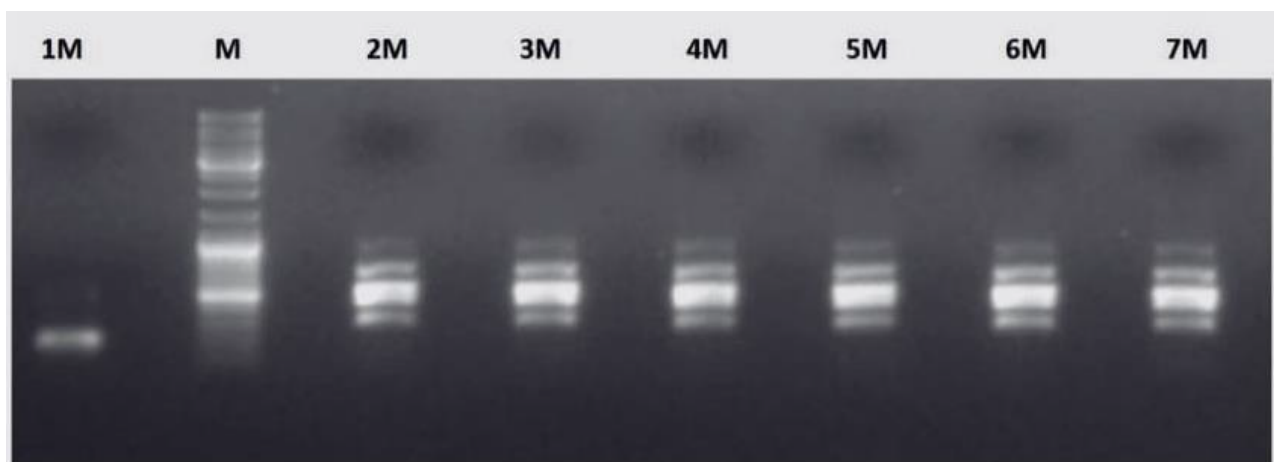
- iii. **Secuenciación:** Se secuenció los productos PCR en MacroGen, Inc.

## 2.6. Análisis filogenético

Después de la secuenciación, se recibieron los resultados y se inició el proceso de limpieza de secuencias visualizando y editando el electroferograma mediante el software Chromas versión 2,6 en donde fueron eliminados los extremos de cada primer que no forman parte del gen objetivo. Con el software BioEdit versión 7,2 se ensambló las secuencias previamente editadas en una sola secuencia consenso luego se compararon con aquellas presentes en la base de datos BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), de los Estados Unidos, buscando homologías de nucleótidos. Este análisis permitió identificar el género de la bacteria, establecer alineamiento

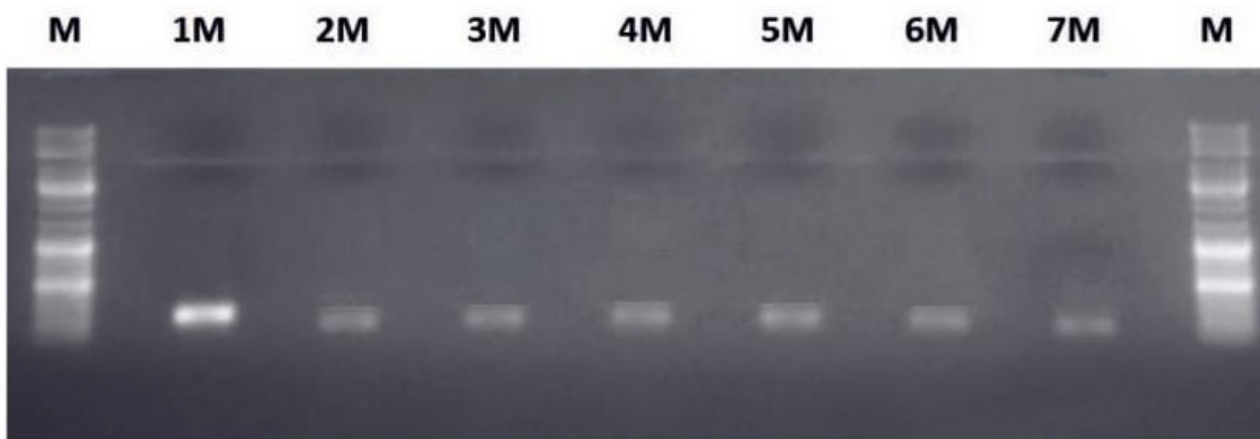
**Figura 1.** Amplificación de *Brucella* mediante Electroforesis en gel de agarosa banda 223pb y bandas 498pb.

Figure 1. *Brucella* amplification by agarose gel electrophoresis: 223bp band and 498bp bands.



**Nota:** En el carril 1M se utilizó los primers universales B4 y B5 que amplificó una región específica de 223 pb del gen BSCP31 de *Brucella*, indicando una muestra positiva. En los carriles 2M a 7M, se utilizaron los primers universales IS711 que amplificaron una región de 498 pb, confirmando la positividad de todas las muestras analizadas. El carril M contiene un marcador de peso molecular utilizado como referencia.

**Note:** Lane 1M utilized the universal primers B4 and B5, which amplified a specific 223-bp region of the *Brucella* BSCP31 gene, indicating a positive sample. In lanes 2M through 7M, the universal IS711 primers were used to amplify a 498-bp region, confirming the positivity of all analyzed samples. Lane M contains a molecular weight marker used as a reference.

**Figura 2.** Amplificación de *Brucella* mediante Electroforesis en gel de agarosa bandas 223pb.Figure 2. *Brucella* amplification by agarose gel electrophoresis, 223 bp bands.

Nota: En los carriles 1M a 7M se utilizó únicamente los primers universales B4 y B5 que amplificaron una región específica de 223 pb del gen BSCP31 de *Brucella*, indicando positividad de todas las muestras. Los carriles M contienen un marcador de peso molecular utilizados como referencia.

Note: Lanes 1M through 7M utilized only the universal primers B4 and B5, which amplified a specific 223-bp region of the *Brucella* BSCP31 gene, indicating that all samples were positive. The M lanes contain a molecular weight marker used as a reference.

mientos y realizar un análisis filogenético en el programa MEGA versión 11,13 que revela las relaciones entre las diferentes biovariedades de *Brucella* spp.

### 3. Resultados

De las 180 muestras de suero de hembras bovinas del cantón Guaranda, analizadas mediante la prueba iELISA, cinco resultaron positivas, lo que indicó una prevalencia del 2,8% de *Brucella* spp. Las parroquias Gabriel Ignacio Veintimilla, Guanujo, Salinas y Simiatug tuvieron una prevalencia del (0,56%) presentando un solo caso en cada una (Tabla 1).

De los animales seropositivos se extrajo ADN y su cuantificación se detalla en la Tabla 2.

De las siete muestras analizadas, todas resultaron positivas en la prueba de PCR, indicando una prevalencia del 3,8% de *Brucella* spp en todo el cantón. Entre las parroquias evaluadas, San Lorenzo presentó la mayor proporción de casos positivos, con el 1,6% (Figura 3). Las parroquias Gabriel Ignacio Veintimilla, Guanujo, Salinas y Simiatug tuvieron una prevalencia del 0,5% (Tabla 3).

Al comparar la prueba serológica y la prueba molecular para la detección de *Brucella*, de los cinco animales que dieron positivo en iELISA también resultaron positivos en PCR, logrando una sensibilidad y un

**Tabla 1.** Prevalencia de brucelosis a través de ELISA indirecto.

Table 1. Prevalence of brucellosis through indirect ELISA.

Prueba iELISA	Frecuencia	Porcentaje
Positiva	5	2,8%
Negativo	175	97,2%
Total	180	100%

**Tabla 2.** Cantidad y calidad en las extracciones ADN – NanoDrop.

Table 2. Quantity and quality in DNA extractions – NanoDrop.

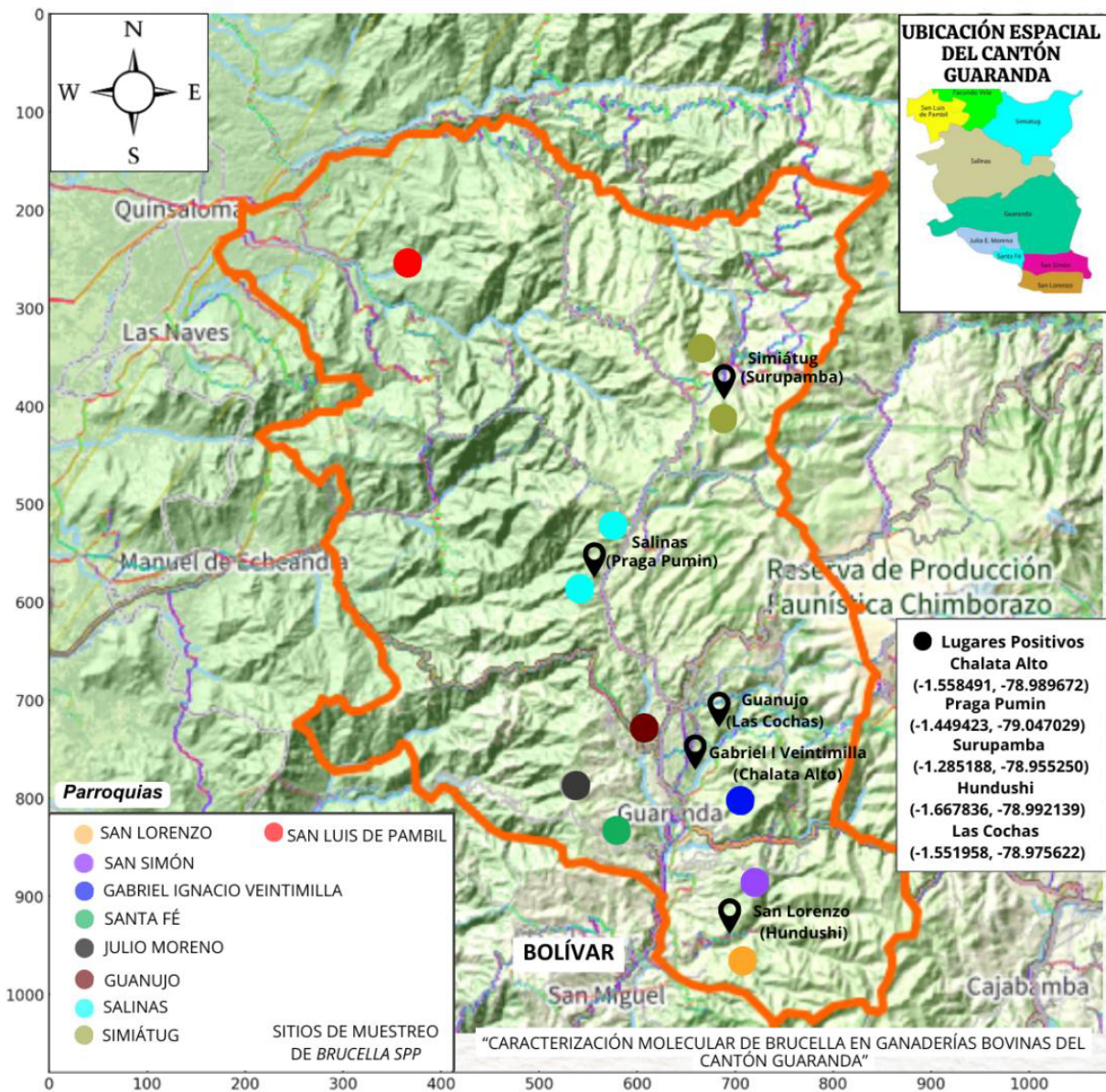
Muestra - Código	Volumen	Ng/uL	A260/A280
1M – (7SL)	98uL	14,6	1,69
2M – (8SL)	98uL	32,6	1,79
3M – (9SL)	98uL	19,5	1,90
4M – (5Stg)	98uL	50,1	1,81
5M – (46SS)	98uL	38,5	1,76
6M – (3SIV)	98uL	31	1,76
7M – (33Gjo)	98uL	54,2	1,81

valor predictivo positivo del 100%. Sin embargo, no se compararon las dos muestras adicionales que dieron positivo en PCR porque no se les realizó la prueba serológica (Tabla 4).

El dendrograma se obtuvo alineando las secuencias de *Brucella* obtenidas del cantón Guaranda y siendo comparadas con las cepas de referencia del Centro Nacional para la Información Biotecnológica [NCBI] (Figura 4).

Los primers universales B4 y B5 que codifican para una proteína de membrana externa de *Brucella abortus*, mediante el secuenciamiento determinó que los casos encontrados se corresponden con *Brucella abortus*, lo que se confirma con la comparación con otras secuencias utilizadas y la cercanía con *Brucella suis.*, la distancia genética 0,20 sugiere que las poblaciones tienen un ancestro común pero que han acumulado una serie de mutaciones para poder ser distinguibles

**Figura 3.** Ubicación de los casos positivos en el cantón Guaranda.  
 Figure 3. Location of positive cases in the Guaranda canton.



**Tabla 3.** Prevalencia molecular de brucelosis a través de la prueba PCR.  
 Table 3. Molecular prevalence of brucellosis through PCR testing.

Prueba PCR	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
Positiva	7	3,8%	3,8%
Total	182	100%	100%

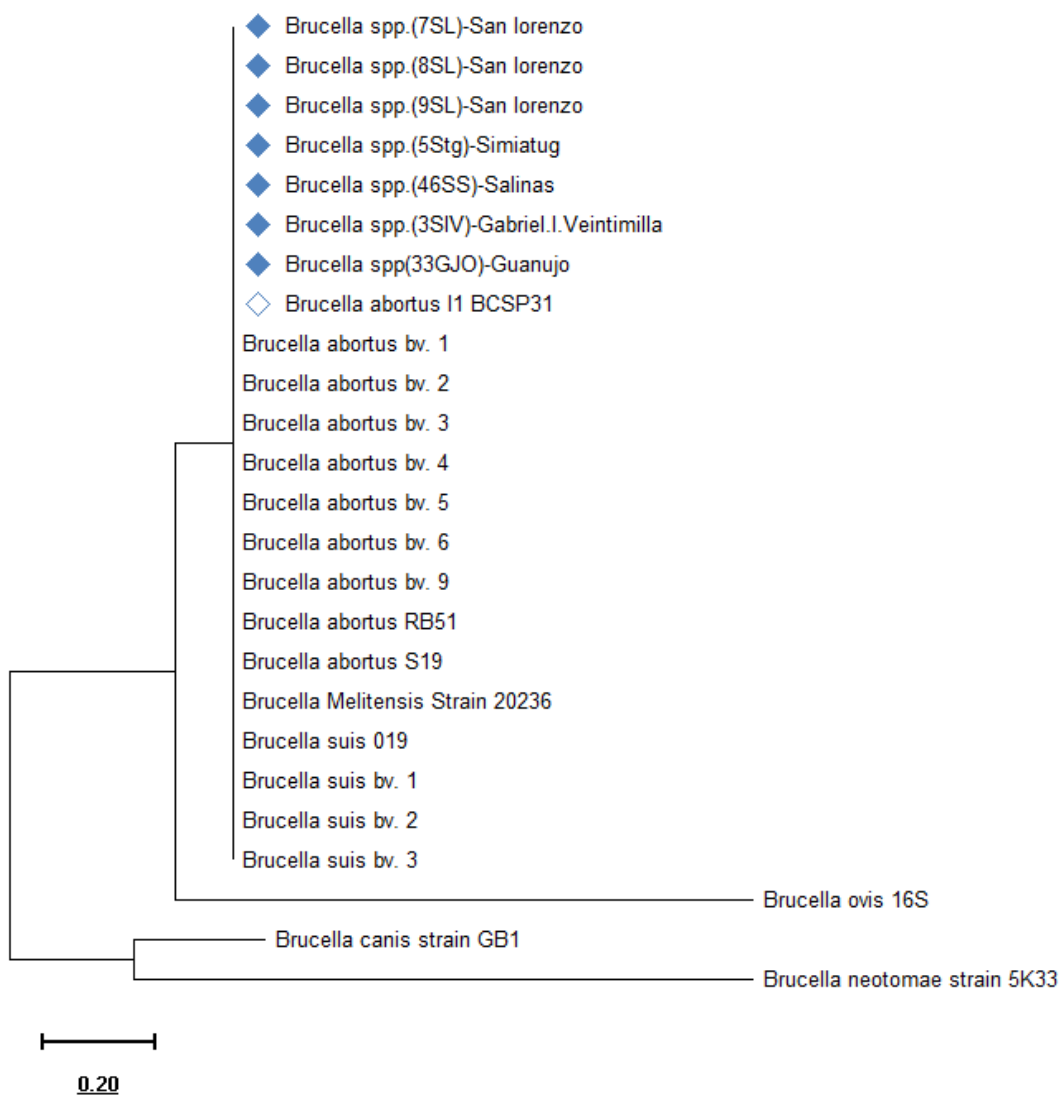
**Tabla 4.** Comparación de la positividad de las pruebas.

Table 4. Comparison of test positivity.

Resultado iELISA	PCR positiva	PCR negativa	Total
Positivo	5	175	180
Total	5	175	180

**Figura 4.** Diseño del árbol filogenético.

Figure 4. Phylogenetic tree design.



#### 4. Discusión

La prevalencia de brucelosis en una región no es solo una cifra estadística, es un indicador crítico del desarrollo sanitario, económico y de salud de las poblaciones animales, en este estudio se encontró una prevalencia del 2,8% de *Brucella* spp mediante la prueba iELISA en comparación con los resultados obtenidos por Ojeda (2018) quien ha reportado porcentajes más altos, con 7,4% en Zamora Chinchipe, aunque podría haber más infectados dentro de los mismos predios

de animales que no fueron muestreados, en este contexto la distribución de brucelosis es marcadamente desigual entre diferentes países y regiones, en países europeos han logrado erradicar o mantener prevalencias cercanas a 0%, en países de Latinoamérica en cambio es diferente, mientras unos con gran tecnificación del sistema productivo alcanzan los niveles más bajos otros pueden alcanzar la prevalencias entre el 10% y 30%

Para la prueba molecular las extracciones de DNA oscilaron entre 14,6 ng uL<sup>-1</sup> y 54,2 ng uL<sup>-1</sup>, indicando diferentes niveles de contenido genético. Las relacio-

nes A260/A280, las cuales van desde 1,69 hasta 1,90 indicando un grado de pureza óptima. Resultados similares a los obtenidos por Ojeda (2018) que obtuvo un promedio de 1,68 y concentraciones de 18 a 60 ng uL<sup>-1</sup>.

La persistencia de la bacteria depende de diferentes factores, entre ellos biológicos, de manejo y socioeconómicos, se destaca el ingreso de reemplazos sin el certificado de salud ingresando animales enfermos a fincas sanas, los sistemas de crianza extensivos tienen menos prevalencias que las intensivas en las que el hacinamiento facilita la transmisión por contacto, aerosol, placentas o fluidos tras el aborto, la monta natural a través de sementales infectados perpetúa la cadena de transmisión, en este estudio se incluyeron para el análisis dos animales sospechosos con signología clínica, expuestos a un animal positivo para realizar la prueba de PCR, similar a lo que realizó Gonuguntla et al. (2023) para determinar la incidencia de nuevos casos en un mismo predio detectándose como positivos.

En la PCR para la detección de *Brucella* spp, los primers universales IS711 se unen al elemento de inserción IS711, específico de *Brucella* y presente en múltiples copias en su genoma, ofreciendo alta sensibilidad y especificidad (Aljanazreh et al., 2023). En contraste, los primers B4 y B5 amplifican una región del gen *bcs31*, específica de todas las especies de *Brucella*, que suele estar presente en menos copias, puede resultar en una menor sensibilidad en la detección, pero son adecuados para la secuenciación (Zamanian et al., 2015). Según los resultados de este estudio, la prevalencia molecular de *Brucella* en el cantón Guaranda es del 3,8% utilizando ambos tipos de primers, la diferencia entre la prevalencia serológica

y molecular detectada se debe a que se procedió a tomar dos muestras adicionales que se les sometieron al análisis molecular de los predios previamente identificados con animales seropositivos, confirmando que en los predios con animales seropositivos las pruebas se deben realizar a todos los animales.

En la investigación realizada por Legesse et al. (2023) se determinaron que la PCR es más sensible que el iELISA para detección de *Brucella* en muestras de sangre y leche de vacas infectadas. En este estudio las pruebas moleculares realizadas en sangre dieron todas positivas lo que indica una alta sensibilidad de la PCR, confirmando los resultados de la prueba serológica.

## 5. Conclusiones

La evidencia epidemiológica sugiere la presencia de brucelosis bovina en la zona de estudio que no deriva de una carencia de herramientas diagnósticas cuya sensibilidad y especificidad actual permite una detección fidedigna sino posiblemente a deficiencias en la gestión estratégica de los programas de control

El diagnóstico de brucelosis a través de técnicas serológicas en el actual momento se convierten en herramientas de tamizaje por el bajo costo, sin embargo, la estandarización de protocolos moleculares son herramientas indispensables para la vigilancia epidemiológica moderna por su sensibilidad analítica y su capacidad de reducir el tiempo de diagnóstico de semanas a pocas horas

### Contribuciones de los autores:

- Willian Conde Castillo: conceptualización, investigación, metodología, redacción – borrador original.
- Franklin Román Cárdenas: investigación, recursos, supervisión, validación, redacción – revisión y edición.

### Disponibilidad de datos

Los datos que se han utilizado son confidenciales.

### Declaración de Uso de Inteligencia Artificial

Los autores declaran que no se ha utilizado Inteligencia Artificial en la elaboración del manuscrito.

### Implicaciones éticas

Los autores declaran que no existen implicaciones éticas.

### Conflicto de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de interés financieros o no financieros que podría haber influido en el trabajo presentado en este artículo.

### Referencias

- Agrocalidad. (2023). Buenas prácticas pecuarias en la producción de carne.
- Aljanazreh, B., Shamsye, A. A., Abuawad, A., y Ashhab, Y. (2023). Genomic distribution of the insertion sequence IS711 reveal a potential role in *Brucella* genome plasticity and host preference. *Infection, Genetics and Evolution*, 112, 105457. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105457>
- Gonuguntla, H. N., Surendra, K. S. N. L., Prasad, A., Sarangi, L. N., Rana, S. K., Manasa, G., Muthappa, P. N., Harikumar, A. v., y Sharma, G. K. (2023). *Brucella melitensis*: Divergence Among Indian Strains and Genetic Characterization of a Strain Isolated from Cattle. *Indian Journal of Microbiology*, 63(3), 272–280. <https://doi.org/10.1007/>

s12088-023-01081-w

- Legesse, A., Mekuriaw, A., Gelaye, E., Abayneh, T., Getachew, B., Weldemedhin, W., Tesgera, T., Deresse, G., & Birhanu, K. (2023). Comparative evaluation of RBPT, I-ELISA, and CFT for the diagnosis of brucellosis and PCR detection of *Brucella* species from Ethiopian sheep, goats, and cattle sera. *BMC Microbiology*, 23(1), 216. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02962-2>
- Ojeda, K., y Román, F. (2018). *Identificación molecular de Brucella spp. en muestras de sangre de ganado bovino de la provincia de Zamora Chinchipe*. Centro de Biotecnología UNL <https://redi.cedia.edu.ec/document/270533>
- World Organisation for Animal Health [WOAH]. (2022). *Brucellosis*. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.01.04\\_BRUCELL.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELL.pdf)
- Zamanian, M., Hashemi Tabar, G. R., Rad, M., y Haghparast, A. (2015). Evaluation of different primers for detection of *Brucella* in human and animal serum samples by using PCR method. *Archives of Iranian Medicine*, 18(1), 44–50. <https://www.scopus.com/pages/publications/84920949993>