

Tipificación molecular de especies de *Brucella* en ganaderías lecheras de la provincia del Azuay – Ecuador

Molecular typing of *Brucella* species in dairy farms in the Province of Azuay – Ecuador

Omar Santiago Andrade-Guzmán^{1*}, Antonio Javier Vallecillo², Andrea Elizabeth Vintimilla-Rojas¹, Andrés Norberto Haro-Haro¹, Ivanna Solmayra Agreda-Orellana³, Daniela Alejandra Vintimilla-Rojas⁴ y Sergio Emiro Rivera-Pirela⁵

¹Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Laboratorio de Microbiología y Lácteos. Cuenca, Ecuador.

²Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Laboratorio de Biología Molecular. Cuenca, Ecuador.

³Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Médicas, Laboratorio de Microbiología. Cuenca, Ecuador.

⁴Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Médicas. Cuenca, Ecuador.

⁵Universidad de Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracaibo, Zulia, Venezuela.

*Autor de correspondencia: omar.andrade@ucuenca.edu.ec

RESUMEN

La Brucelosis es una enfermedad zoonótica extendida a nivel mundial en el ganado bovino, ocasionada principalmente por *Brucella abortus*, previamente reportada en ciertas regiones del Ecuador. La caracterización de las cepas circulantes de *Brucella* spp. en ganaderías lecheras resulta importante para comprender la epidemiología de esta enfermedad. La tipificación bacteriológica de la *Brucella* spp. es un proceso lento, riesgoso y requiere de laboratorios especializados. El objetivo de este estudio fue tipificar las cepas de *Brucella* spp. que afectan al ganado bovino en la provincia del Azuay, mediante ensayos moleculares, a partir de muestras de sangre y leche de vacas seropositivas a brucelosis. En fincas seropositivas a ELISA-Indirecto en leche, se seleccionaron 70 vacas Holstein mestizas, reactoras individualmente a las pruebas Rosa de Bengala y confirmadas con ELISA competitivo. Se extrajo el ADN de esas muestras de sangre y leche confirmando en un inicio la viabilidad del material genético de bovino con oligonucleótidos específicos para el género *Bos*. La amplificación de ADN para *Brucella* spp. se realizó por PCR-AMOS con cebadores de género para la región IS711 y de especie para *Brucella abortus*, *Brucella mellitensis*, *Brucella suis* y *Brucella ovis*. Se pudo identificar ADN bovino en 65 (92,8 %) muestras de leche y en 62 (88,5 %) muestras de sangre. Un total de 62 muestras de ADN extraído de leche resultaron positivas (95,4 %) al género *Brucella* spp. y todas las muestras de sangre resultaron negativas. El PCR-AMOS mostró bandas con un peso molecular de 498 pb en muestras de cuatro animales correspondiente a *B. abortus*. Este es el primer estudio de identificación molecular en la provincia del Azuay con evidencia científica de la especie de *Brucella* spp. circulante en las ganaderías bovinas de la zona, contribuyendo de base para la identificación futura de los biovares de *B. abortus* aún no reportados en esta zona del país.

Palabras clave: PCR-AMOS; *B. abortus*; IS711; ELISA-I; ELISA-C

ABSTRACT

Brucellosis is a worldwide zoonotic disease in cattle, caused mainly by *Brucella abortus* previously reported in certain regions of Ecuador. The characterization of circulating strains of *B. abortus* in dairy herds is vital to understand the epidemiology of this disease. The bacteriological typing is a slow, risky process and requires specialized laboratories for *Brucella* spp. The aim of this study was to type the strains of *Brucella* spp. that affect bovines in the Province of Azuay, through molecular assays, from blood and milk samples from cows seropositive to brucellosis. In farms seropositive to ELISA-Indirect in milk, 70 Holstein crossbred cows were selected, individually reacting to the Rose Bengal tests and confirmed with competitive ELISA. The DNA was extracted from these blood and milk samples, initially verifying the viability of the bovine genetic material with specific oligonucleotides for the *Bos* genus. The DNA amplification for *Brucella* spp. It was performed by PCR-AMOS with genus primers for the IS711 region and Species primers for *Brucella abortus*, *Brucella mellitensis*, *Brucella suis* and *Brucella ovis*. *Bos* DNA could be identified in 65 (92.8%) milk samples and in 62 (88.5%) blood samples. A total of 62 (95.4%) DNA samples extracted from milk were positive for the genus *Brucella* spp. All blood samples were negative. The PCR-AMOS showed bands with a molecular weight of 498 base pairs in samples from four animals corresponding to *B. abortus*. This is the first study of molecular identification in the Province of Azuay with scientific evidence of the species of *Brucella* spp. circulating in the herds of the area, serving as a basis for the future identification of *B. abortus* biovars not yet reported in this area of the Country.

Key words: PCR-AMOS; *B. abortus*; IS711; ELISA-I; ELISA - C

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica extendida en el mundo, afecta a animales domésticos y silvestres [28]. Provoca pérdidas económicas causando abortos, retención placentaria, reducción de la producción láctea, nacimiento de crías débiles infectadas o muertas e infertilidad. Afecta el comercio internacional y obliga al sacrificio de animales seropositivos [10]. La transmisión al humano ocurre por el consumo de leche y productos lácteos contaminados, inhalación de partículas en aerosol y contacto directo con tejidos de animales infectados [26]. Las fuentes de infección para los animales incluyen materiales biológicos como fetos abortados, secreciones vaginales, leche, semen, agua y alimentos contaminados; la infección en terneros es posible a través del útero y por el consumo de calostro [24]. Los enfoques filogenéticos demuestran la preferencia del hospedador y la virulencia por lo que se han definido doce especies de *Brucella* (B): *B. abortus* (bovino), *B. mellitensis* (caprino), *B. suis* (porcino), *B. canis* (canino), *B. ovis* (ovino), *B. neotomae* (rata de bosque) [41]. *B. ceti* (delfines, marsopas y ballenas), *B. pinnipedialis* (focas), *B. microti* (topillo común) y *B. inopinata* (humano, rana toro) el reciente aislamiento de *B. papionis* en babuinos y *B. vulpis* hallada en ganglios linfáticos mandibulares de zorros rojos, incrementan su diversidad [2, 11]. *B. mellitensis*, *B. abortus* y *B. suis* son las tres especies generalmente asociadas con enfermedades humanas sin poder descartar cierto grado de patogenicidad de *B. canis*, *B. ceti* y *B. microti* [5, 29]. En Ecuador, el diagnóstico oficial de la brucelosis bovina es realizado mediante pruebas serológicas como Rosa de Bengala (RB) y utilizando como prueba confirmatoria el ELISA competitivo (ELISA-C). Se reportan diferentes prevalencias y variación entre regiones, incluso dentro de ellas. El primer estudio en Ecuador realizado por Agrocalidad en el año 1979 refiere una prevalencia en la región Sierra Norte de 1,92–10,62 %, en la región Costa de 4,12–10,62 % y en la región Sierra Sur de 1,30–2,60 % ubicándose una prevalencia nacional en 6 % [30]. Otros estudios más actualizados reportan prevalencias a nivel de granja de 17 % y por animales 10 % [8, 35]. El cultivo bacteriano se considera la prueba de oro para el diagnóstico de esta enfermedad, sin embargo, este proceso puede requerir de hasta siete semanas, es muy riesgoso para el personal que lo realiza pues requiere de laboratorios de bioseguridad BSL3. Adicionalmente la biotipificación requiere mucho tiempo y a menudo es difícil de interpretar debido a la limitada estandarización de los reactivos [16]. En Ecuador se han aislado en bovinos, cepas de *B. abortus* bv.1, 2 y 4 [34, 37].

Una estrategia molecular para diferenciar entre especies de *Brucella* spp. se basa en la identificación del polimorfismo de la distribución y el número de copias de la secuencia de inserción IS711 en el genoma, mediante un PCR múltiple (PCR-AMOS), que genera fragmentos cuyos tamaños son distintivos para cada especie. Este ensayo permite diferenciar *B. abortus*, *B. mellitensis*, *B. ovis*, *B. suis* y las cepas vacunales de *B. abortus* S19 y RB51 [6, 7]. En la provincia del Azuay, si bien existe evidencia serológica de la presencia de brucelosis bovina en hatos ganaderos en la actualidad no se ha reportado el aislamiento de esta bacteria como sucede en otras regiones del país [23].

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue identificar el material genético de la cepa predominante de *Brucella* spp. en animales seropositivos de la provincia de Azuay – Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y población

La población consistió en 70 vacas Holstein mestizas (*Bos taurus*) en lactancia procedentes de 13 ganaderías ubicadas en los cantones Cuenca, San Fernando, Girón, Sevilla de Oro, Sígsig y Nabón de la Provincia del Azuay en Ecuador. Los animales fueron identificados seropositivos mediante las pruebas RB y conformados con ELISA-C, los mismos que procedían de granjas previamente identificadas como seropositivos a Brucelosis mediante el análisis en tanques de leche, con la prueba ELISA-I en un estudio de prevalencia llevado a cabo en los años 2020 y 2021 en esta provincia [4]. Las ganaderías incluidas en este estudio no formaban parte de los programas oficiales de control de Brucelosis y estaban exentas de vacuna.

Toma de muestras

Se recolectaron muestras de sangre y leche de todas las vacas que aportaron a la mezcla en los tanques de leche seropositivos a brucelosis con ELISA-I en el mencionado estudio en la zona. Para las pruebas serológicas se tomaron 10 mililitros (mL) de sangre en tubos Vacutainer (SENNA Científica, EUA) sin anticoagulante. Para extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) se tomó 4 mL en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La leche fue colectada en envases plásticos estériles, se tomó 100 mL y se transportó en cajas térmicas (Coleman, Alemania) a 4°C al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, en donde alícuotas de las muestras de leche y sangre se congelaron a -20°C (Congelador Indurama, Ecuador) para su posterior procesamiento.

Serología para identificación de animales expuestos a *Brucella* spp.

Las muestras de sangre sin anticoagulante se centrifugaron a 10.000 G (Dynac, Clay Adams, EUA) durante 10 minutos (min) para extraer el suero, a éstos se les realizó la prueba RB (IDEXX, 2020) y se utilizó el kit de ELISA-C (Svanova, Suecia) como prueba confirmatoria, según las indicaciones del fabricante.

Extracción de ADN de muestras de sangre y leche

Las muestras de sangre de animales seropositivos recolectadas en tubos EDTA fueron descongeladas y fraccionadas en alícuotas de 200 microlitros (µL) para la extracción de ADN total mediante el método con detergente catiónico bromuro de hexadecil-trimetilamonio (CTAB), fenol-cloroformo modificado [12]. Se añadió 200 µL de buffer de lisis, 40 milimoles (mM) de Tris-HCl, pH 8,0; 200 mM de NaCl, 8 mM de EDTA, 2 % de SDS, 10 µL de una solución de proteinasa K (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM de EDTA; 50 mM de glicerol y 5 mg·mL⁻¹ de Proteinasa K). Se incubaron las muestras durante 14 horas a 56°C, posteriormente se adicionaron 500 µL de fenol cloroformo, se homogenizó la mezcla en un vortex (V2H-BOECO, Alemania) y se centrifugaron a 12.000 G (Eppendorf 5430R, Alemania) a 4°C durante 10 min. Se separó el sobrenadante y se añadió 260 µL de etanol absoluto. Se realizó una segunda centrifugación, se eliminó el sobrenadante, se añadió etanol al 70 % y se centrifugó para eliminar el etanol. El sedimento de ADN fue secado durante 24 horas a temperatura ambiente para finalmente adicionar 20 µL de agua grado biología molecular (Corning. Científica Senna, EUA) el ADN extraído se conservó a -20°C.

Para la extracción de ADN de las muestras de leche se empleó la metodología modificada de Romero [36]. Se centrifugaron 2 mL de las

muestras a 6.000 G durante 10 min a 4°C. Posteriormente se recolectó la capa de grasa en una cantidad de 500 µL, se le adicionaron 100 µL de buffer NET (50 mM de NaCl; 125 mM de EDTA y 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6) y 100 µL de una solución de dodecilsulfato sódico (SDS) al 24 %; se mezcló con un vortex por 30 segundos(seg) y se incubó a 80°C en una estufa (Termo Fisher Scientific, EUA) durante 10 min, posteriormente se añadieron 50 µL de solución de proteinasa K, se homogenizó e incubó durante 2 h a 50°C. Para precipitar los detritos, se añadió 125 µL de la solución de NaCl y 100 µL de una solución de CTAB al 10 % y se incubó la mezcla a 65°C por 10 min. Consecutivamente, las muestras se centrifugaron a 12.000 G durante 10 min a 4°C, se recolectaron 400 µL del sobrenadante y se adicionaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío a 4°C para precipitar el ADN total, se mezcló por inversión y centrifugó a 12.000 G durante 10 min a 4°C, una vez eliminado el etanol absoluto por decantación, se realizó un lavado del sedimento de ADN con la adición de 500 µL de una solución de etanol al 70 % y posterior se centrifugó a 12.000 G durante 10 min a 4°C. Finalmente se eliminó la solución de etanol al 70 %, se secó el precipitado a temperatura ambiente que fue suspendido en 50 µL de agua biología molecular.

Control de proceso para evaluación de procedimiento de obtención de ADN total

Se realizó el control de proceso mediante PCR para verificar la viabilidad del material genético de bovino según la metodología descrita por López-Calleja [21]. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para el género *Bos* (TABLA I) que hibridan en el gen de la subunidad 12S ribosomal del genoma mitocondrial y generan un producto de 708 pares de bases (pb), aproximadamente. La mezcla de la PCR (25 µL) consistió en 1X del buffer de reacción (50 mM de Tris-HCl, Ph 8,5; 50 mM de NaCl; 0,1 mL de BSA), 200 micromoles (µM) de cada uno de los dNTP's; 1,4 mM de MgCl₂; 0,8 µM de cada uno de los primers, 0,04 unidades (U) de Taq ADN polimerasa (Go-Tag Flexi DNS polymerase, Promega, Madison, EUA). El perfil de tiempo y temperatura para generar los amplicones del material genético de bovino se realizó con un termociclador (Eppendorf, Alemania) y consistió en: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 45 seg a 94°C, hibridación por 30 seg a 60°C, y extensión por 45 seg a 72°C y un paso de extensión final fue 5 min a 72°C. Los productos de amplificación se fraccionaron en un gel de agarosa al 1 %, teñido con 1 µL de bromuro de etidio, se utilizó una cámara de electroforesis (Biometra P-30-BI, Germany) aplicando 90 voltios durante 45 min. El gel se visualizó empleando un fotodocumentador ultravioleta (Bio-Rad, EUA).

Amplificación de ADN de la cepa vacunal RB51

Para validar los cebadores que amplifican mediante PCR - IS711 la secuencia del género *Brucella* spp. y que generan un producto de 261 pb (TABLA I), se utilizó como control positivo ADN extraído de la vacuna RB51 y como control negativo agua grado biología molecular. La mezcla para cada reacción fue de 20 µl, el master mix se realizó con 2,5 U·µl⁻¹ de Taq polimerasa, 10X de Buffer; 50 mM de MgSO₄; 0,25 µl de dNTPs; 0,2 µl de cada cebador; 2 µL de ADN, solución 10X enhancer 1,875 µl. El protocolo de temperatura para la amplificación incluyó una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos a 94°C por 45 seg, hibridación a 58°C durante 25 s, extensión 68°C durante 5 min y una extensión final de 68°C durante 5 min. Para observar los productos de la reacción se realizó una corrida en gel de agarosa según lo descrito anteriormente.

Amplificación de ADN del género *Brucella* spp.

La amplificación de ADN del género *Brucella* spp. se realizó utilizando los protocolos de secuencia de inserción PCR-IS711 previamente descritos con el que se obtiene una banda con peso molecular de 261 pb [16]. Los cebadores usados se detallan en la TABLA I; cada reacción tuvo un volumen final de 20 µL, el master mix se realizó con 1X de Taq polimerasa, 1X de Buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,02 de dNTPs, 0,02 mM de cada cebador y 10 µL de ADN. El protocolo de temperatura para la amplificación incluyó una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 seg, hibridación a 54°C durante 30 seg, extensión 72°C durante 45 seg y una extensión final de 72°C durante 5 min. Se realizó electroforesis al gel de agarosa durante 45 min a 100 voltios. Se analizaron 10 µl de productos de PCR por electroforesis a través de gel de agarosa al 1,5 % teñido con solución de bromuro de etidio (1 µL) y se visualizó con el fotodocumentador.

Amplificación de ADN de especies de *Brucella* mediante PCR-AMOS

Se utilizó la técnica PCR-AMOS antes descrita, con una combinación de cinco cebadores (TABLA I). El cebador del gen IS711 que hibrida con la secuencia de inserción de cuatro cebadores específicos generando amplicones de diferentes tamaños según la especie; *B. abortus* (498 pb), *B. mellitensis* (731 pb), *B. suis* (285 pb), *B. ovis* (976 pb). La PCR se realizó tomando un volumen de 25 µL compuesto por 0,3 mM de dNTPs, 1X buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada cebador, 1(U) de Taq polimerasa y 30 nanogramos·µL⁻¹ (ng·µL⁻¹) de ADN genómico. Las condiciones de amplificación incluyeron desnaturalización inicial a 94°C por 10 min seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, recocido a 60°C por 30 seg, extensión a 72°C por 2 min y una extensión final a 72°C durante 5 min. Los productos de la reacción de cadena de polimerasa (PCR) se visualizaron después de la electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio empleando el fotodocumentador ultravioleta. Se usó un marcador de peso molecular escala de 100 pb (Gibco-BRL) como estándar de tamaño.

TABLA I
Cebadores usados en este estudio

Cebador (nombre)	Secuencia (5' -3')	Amplicon	Referencia
PCR de control de proceso (Género <i>Bos</i>)			
12SFW-Mod	TAAATCTCGTGCCAGCCA	708 pb	[24]
12SREV-Mod	AGTATGCTTACCTTGTTACGAC		
PCR-IS711 para identificación <i>Brucella</i> spp (Género <i>Brucella</i>)			
IS6501 3'	GATAGAAGGCTTGAAGCTTGCGGAC	261 pb	[17]
IS6501 5'	ACGCCGGTGTATGGGAAGGCTTTT		
PCR-AMOS para identificación de especies de <i>Brucella</i>			
IS711	TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT		
<i>B. abortus</i>	GACGAACGGAATTTTCCAATCCC	498 pb	
<i>B. mellitensis</i>	AAATCGCGTCTTGCTGGTCTGA	731 pb	
<i>B. ovis</i>	CGGGTTCTGGCACCATCGTCG	976 pb	[6]
<i>B. suis</i>	GCGCGTTTTCTGAAGGTTTCAGG	285 pb	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Viabilidad de las muestras de ADN total mediante el control de proceso

La amplificación de ADN bovino mediante PCR demostró un producto de 708 pb en 65 (92,8 %) muestras de leche (FIG.1A) y en 62 (88,57 %) muestras de sangre (FIG. 1B) de los 70 animales confirmados seropositivos, que corresponden a una secuencia específica del género *Bos*, lo cual indica que este material genético es viable para identificar ADN de *Brucella* spp.

La extracción de ADN es una fase crítica para la detección, no solo de *Brucella* en leche o sangre, si no para cualquier microorganismo que pueda ser detectado en estos tipos de muestras. El éxito de la amplificación con PCR está relacionado con la calidad y cantidad

del ADN obtenido [25]. En relación al porcentaje de muestras de leche que no amplificaron ADN total, es conocido que los extractos de ADN de este fluido son difíciles de obtener, esto podría estar relacionado con las características físicas, químicas y biológicas de la leche, como las moléculas de grasa, proteína y calcio, conjuntamente con desechos bacterianos [3]. Las plasminas pueden servir como inhibidores naturales en la leche capaces de degradar las polimerasas Taq [40]. En sangre hay varios estudios que mencionan que los tubos adicionados con EDTA son buenos para conservar este tejido, pero el almacenamiento prolongado en congelación y la descongelación podría ocasionar un bajo rendimiento de la prueba. Hay diversos métodos disponibles para la extracción de ADN en sangre basados en lisis química y mecánica de las células, reportándose resultados ambiguos en base a su rendimiento individual, dependiendo del tipo de tejido a analizar, tiempo de recolección, detergentes usados y su concentración, esto explicaría por qué no se pudo amplificar ADN bovino del total de las muestras de sangre analizadas [15].

PCR-IS711 para amplificación de ADN de cepa vacunal

La vacuna RB51 es una cepa mutante rugosa atenuada derivada de la cepa virulenta de *B. abortus* 2308, cuyo ADN se usó como control positivo que al someterse al PCR-IS711 arrojó un amplicon de 261 pb (FIG. 2), confirmando que el método de extracción y el protocolo de temperatura usados son aptos para identificar la presencia de ADN genérico de *Brucella* spp. en las muestras de leche y sangre bovina. Estudios previos indicaron que el gen *wboA*, que codifica una glicosiltransferasa necesaria para la síntesis del O-polisacárido, está interrumpido en la cepa RB51 por un elemento IS711 [39], este polimorfismo fue elegido como el locus objetivo en este ensayo.

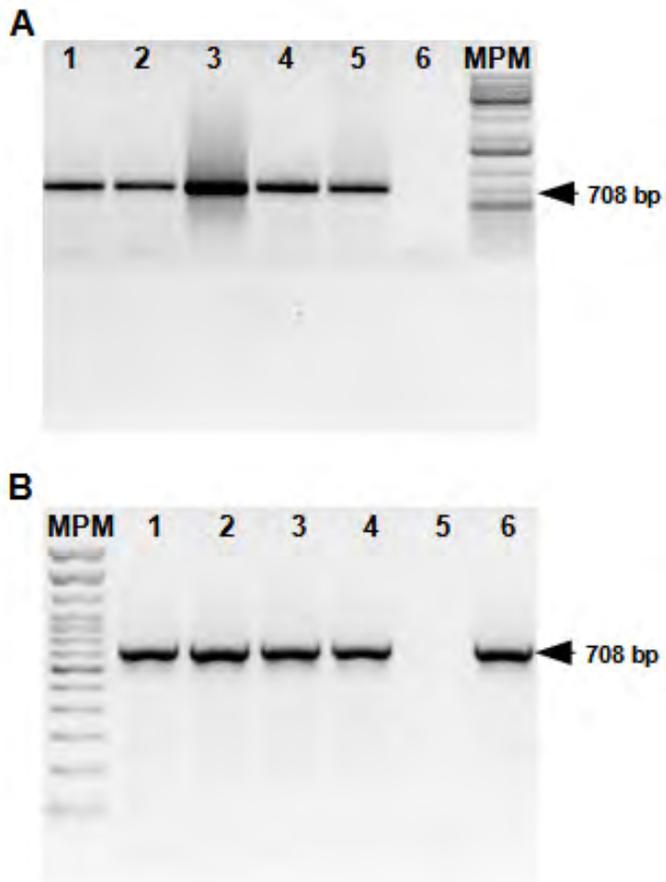


FIGURA 1. Imágenes representativas de la resolución de los ensayos de PCR para la evaluación de la viabilidad del ADN total obtenido de las muestras colectadas de los bovinos seropositivos a brucelosis. A. Productos de PCR del ADN total obtenido de las muestras de leche (Carriles 1, 2, 3, y 4); control positivo (Carril 5) y control negativo (Carril 6) resueltos en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio. Carril MPM, marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder, Cat. no.: SM1331). B. Electroforesis de los productos de PCR del ADN total obtenido de las muestras sanguíneas (Carriles 1, 2, 3, y 4); control negativo (Carril 5) y control positivo (Carril 6). Carril MPM, marcador de peso molecular (TrackIt™ 100 pb DNA ladder, Cat. no. 10488058)

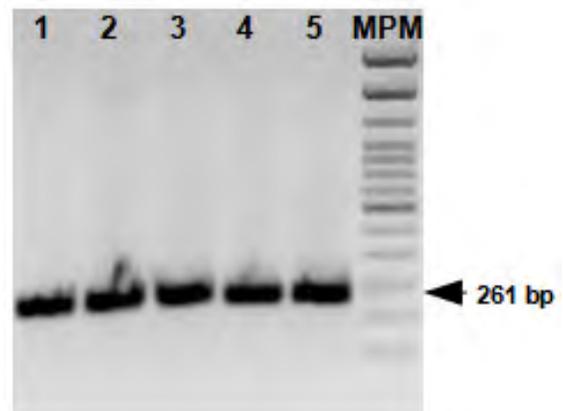


FIGURA 2. Resolución de ensayo de PCR-IS711 para la optimización de las condiciones de la temperatura de hibridación de los primers para la identificación de material genético de bacterias del género *Brucella*. Se muestran los productos de PCR con el tamaño esperado (261 pb) al emplearse ADN total de la cepa vacunal RB51 derivada de *B. abortus* 2308 (Carriles 1, 2, 3, 4, y 5). Carril MPM, marcador de peso molecular (TrackIt™ 100 pb DNA ladder, Cat. no. 10488058)

PCR-IS711 para amplificación de ADN del género *Brucella* spp.

Como resultado del producto de PCR-IS711 se observaron amplicones de 261 pb únicamente en 62 (95,4 %) muestras de leche de las 65 que amplificaron al control de proceso, que pertenecen a

una región del segmento de inserción IS711. Esto corresponde a la amplificación del locus *ery* relacionada a una región de los genes *eryC* - *eryD*, encargados del catabolismo del eritritol en todos los miembros del género *Brucella* spp. [42]. (FIG. 3). Todas las muestras de sangre resultaron negativas al IS-711.

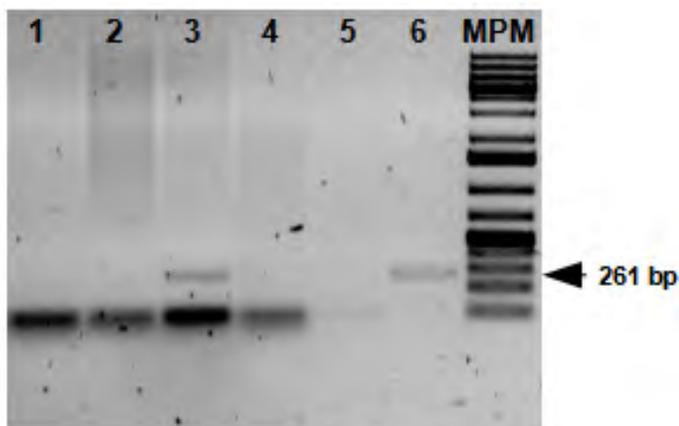


FIGURA 3. Resolución de los ensayos de PCR-IS711 para la identificación de material genético de bacterias del género *Brucella* en las muestras de leche procedente de bovinos seropositivos a brucelosis. Productos de PCR con el tamaño esperado (261 pb) observados en control positivo (Carril 6) y en una muestra (Carril 3); y ausentes en el control negativo (Carril 5) y en los carriles 1, 2 y 4. Carril MPM, marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder, Cat. no. SM1331)

Las muestras de leche que no amplificaron al PCR IS711 (genérico) a pesar de estar serológicamente positivas a brucelosis, sugieren que este microorganismo no se excreta de manera constante o las concentraciones bacterianas no fueron lo suficientemente altas en unidades formadoras de colonia (UFC) para ser detectadas. Algunos autores manifiestan que el nivel de detección de la PCR a partir de

ADN de leche se considera aceptable, cuando tiene un equivalente en bacterias de 10 UFC·mL⁻¹ [19]. Esto coincide con lo manifestado por Rentería [32] quien ubica el límite de detección de la prueba PCR en leche en 1 ng de ADN, lo que equivale aproximadamente a 3×10⁵ células de *B. abortus*. Otros factores que influirían para la no detección de ADN del género *Brucella* en muestras de leche pudieran ser los cambios en el pH, temperatura de almacenamiento y la descongelación de las muestras lo que afectaría la integridad del ADN [13, 14].

Era de esperarse que en muestras sanguíneas no se encontrara ADN de la bacteria debido a que la bacteremia de este germen en la especie bovina es muy corta comparada con otras especies. El sedimento de glóbulos blancos puede ser una valiosa plantilla para su uso en la detección de *Brucella* spp. por PCR, pero esto dependerá si el animal se encuentra en una etapa aguda o crónica de la enfermedad. Las muestras en este trabajo procedían de animales que se diagnosticaron mediante pruebas serológicas de rutina sin poderse precisar el tiempo de infección, generalmente vacas adultas de varias lactancias.

La *Brucella* spp. es una bacteria intracelular facultativa, fagocitada rápidamente por macrófagos y neutrófilos desde su ingreso al organismo por diferentes vías (aerosol, conjuntival, oral o parenteral), para ser transportada luego hacia los tejidos de preferencia en los diferentes órganos, tales como, la médula ósea, el líquido cefalorraquídeo, hígado, riñones, bazo, útero y testículos, dificultando su aislamiento en sangre periférica [9].

PCR-AMOS

En este estudio se utilizaron los oligonucleótidos descritos anteriormente como PCR-AMOS capaces de amplificar los fragmentos que permiten la diferenciación de *B. abortus*, *B. mellitensis*, *B. ovis* y *B. suis*. Como resultado de esta amplificación se obtuvo amplicones de 498 pb característico de *B. abortus* en muestras de leche aislados de cuatro animales seropositivos provenientes del cantón San Fernando en la provincia del Azuay (FIG. 4).

Las limitaciones de los procedimientos de detección serológica y de aislamiento microbiológico han fomentado el uso de métodos moleculares para la detección e identificación de especies de *Brucella* spp. debido a su precisión, sensibilidad, velocidad y capacidad

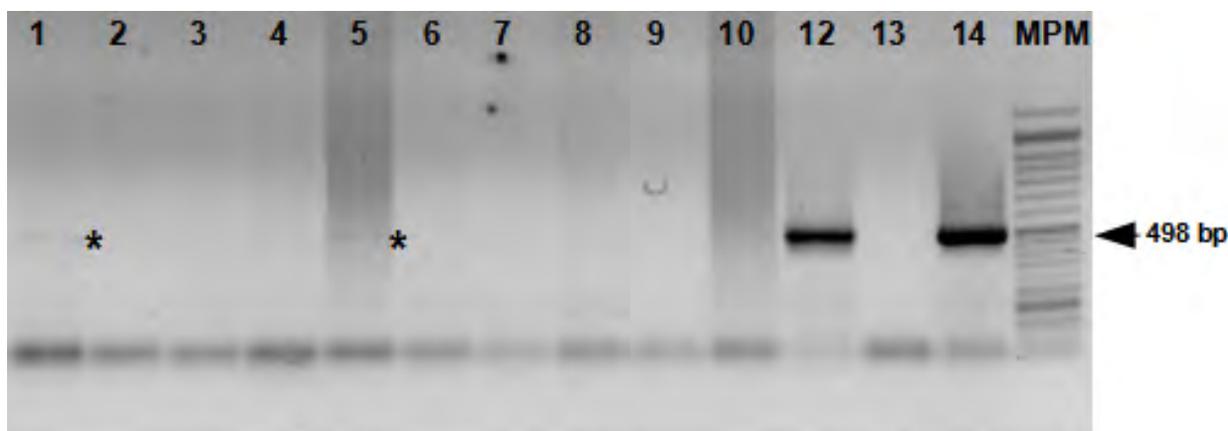


FIGURA 4. Resolución de ensayos de PCR-AMOS para la identificación de material genético de especies del género *Brucella* en las muestras de leche positivas a *Brucella* spp. Productos de PCR con el tamaño esperado (498 pb) observados en los controles positivos (Carril 12 y 14 *B. abortus* RB51) y en muestras (Carriles 1 y 5); y ausentes en el control negativo (Carril 13) y en los carriles 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 10. Carril MPM, marcador de peso molecular (100pb Plus Opti-DNA Markers, Cat. no. G016)

para trabajar con ADN, en oposición a cultivos bacteriológicos muy lentos, imprecisos y altamente riesgosos [17].

Sobre la base de los resultados, no se identificaron patrones moleculares que sugieran una infección cruzada con otra especie como agente causal de brucelosis en esta región, como lo corroboran estudios previos, indicando que *B. abortus* es la principal especie circulante en ganaderías del Ecuador [22]. De igual manera Rodríguez y col. [33] en la provincia de Santo Domingo, al utilizar los protocolos PCR-IS711 y PCR-AMOS en muestras de sangre y ganglios supramamarios identificaron *B. abortus* (biovar 1 y 4) como cepas circulantes en vacas procedentes de hatos seropositivos.

Así también, Ojeda-Gutiérrez y col. [27] reporta en la provincia de Zamora Chinchipe la presencia de este agente en muestras de sangre de bovinos provenientes de fincas ganaderas al usar cebadores que amplifican un fragmento de 223 pb, los cuales reconocen una región interna de la secuencia del gen *bcbp31*, que se conserva en todas las especies de *Brucella*. Igualmente, Ron y col. [38] aislaron *B. abortus* (biovar 4) mediante técnicas moleculares en poblaciones humanas de las provincias de Carchi y Pichincha, cuyas actividades estaban relacionadas con granjas lecheras y centros de faenamiento en zonas con alta prevalencia de brucelosis bovina. Datos similares fueron reportados en otros países al identificar ADN de *B. abortus* y *B. melitensis* en muestras de leche y sangre en vacas y búfalos (*Bubalus bubalis*) bajo las mismas condiciones de este estudio [1, 18, 20].

Como se indicó inicialmente, las muestras de sangre y leche procedían de vacas en periodo de lactancia obtenidas de ganaderías que se identificaron seropositivas mediante la prueba ELISA-I en mezclas de leche, por lo que no se incluyeron hembras en periodo de secado, ni machos. Los signos clínicos provocadas por *Brucella* spp. en los animales infectados generalmente se relacionan con problemas reproductivos como aborto, infertilidad, retención de placenta y nacimiento de terneros débiles entre otros [43].

Según la encuesta epidemiológica que se realizó para determinar el estatus sanitario de las fincas donde se obtuvieron las muestras, algunos propietarios no reportaron problemas reproductivos en los animales, a pesar de que se encontraron anticuerpos en las mezclas de leche, probablemente relacionado con una etapa temprana de la infección, cuando la cantidad de bacterias en circulación en el momento de la recolección de muestras en vacas preñadas es inferior a la observada durante una infección crónica, replicándose preferentemente dentro del trofoblasto corioalantoideo de la placenta, lo cual provoca placentitis, muerte fetal y aborto [31]. Las muestras que resultaron positivas a PCR-AMOS procedían de fincas donde hubo antecedentes de abortos en el último tercio de gestación y no contaban con plan de inmunización oficial contra esta enfermedad.

Este estudio constituye el primer reporte de tipificación molecular de *B. abortus* mediante PCR-AMOS en leche, como agente causal de brucelosis bovina en la provincia del Azuay en Ecuador. Esta información sin duda contribuirá a la comprensión sobre la dinámica epidemiológica de la enfermedad y servirá de apoyo al programa de vigilancia y control de la brucelosis en la región.

CONCLUSIONES

Se pudo amplificar con éxito en la mayoría de muestras de leche de vacas seropositivas una región del genoma de *Brucella* usando el elemento genético IS711 para género, siendo la leche el fluido de mayor utilidad para el diagnóstico molecular de este patógeno, si bien se logró

identificar mediante PCR-AMOS el material genético de *B. abortus* como agente causal de la brucelosis bovina en ganaderías lecheras del Azuay, los resultados obtenidos sugieren que el PCR específico no es tan sensible como el de género, por ello se recomienda realizar otras investigaciones para aislar e identificar los biovars presentes en esta zona y determinar su distribución para contribuir a una mejor comprensión de la brucelosis bovina en la región.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado con fondos de la XVIII convocatoria para proyectos de investigación de la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca (DIUC).

Conflicto de Intereses.

Los autores manifiestan que no existe ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AL DAHOUK, S.; KÖHLER, S.; OCCHIALINI, A.; JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M. P.; HAMMERL, J. A.; EISENBERG, T.; VERGNAUD, G.; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M.S.; WHATMORE, A.M.; MELZER, F.; DREES, P.; FOSTER, T.; WATTAM, A.R.; SCHOLZ, H. C. *Brucella* spp. of amphibians comprise genomically diverse motile strains competent for replication in macrophages and survival in mammalian hosts. **Sci. Rep.** 16(7) e44420. 2017. <https://doi.org/f9t5z2>
- [2] ABD AL-AZEEM, M.W.; MUSTAFA ELMALT, L.; ZAIN EL ABDEIN, A. E.; HELMY SAYED, H. Molecular and serological studies on detection of *Brucella* species in cattle and buffaloes. **J. Pharm. Biomed. Sci.** 2(3): 16-24. 2012. <https://bit.ly/40J8Gxd>. 20/02/2023
- [3] ALIYEV, J.; ALAKBAROVA, M.; GARAYUSIFOVA, A.; OMAROV, A.; ALIYEVA, S.; FRETIN, D.; GODFROID, J. Identification and molecular characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* isolated from milk in cattle in Azerbaijan. **BMC Vet. Res.** 18(1): 1-9. 2022. <https://doi.org/gp9q9b>
- [4] ANDRADE, O.; LÓPEZ, M.; VINTIMILLA, A.; LUPERCIO, R.; BUSTAMANTE, J.; DUTÁN, J.; RIVERA, S.; GUEVARA, G. Eficacia de la prueba ELISA en muestras de leche para la vigilancia epidemiológica de la brucelosis bovina. **Arch. Latinoame. Prod. Anim.** 30(2): 67-69. 2022. <https://doi.org/j7np>
- [5] AWAH-NDUKUM, J.; MOUICHE, M.M.M.; KOUONMO-NGNOYUM, L.; BAYANG, H.N.; MANCHANG, T.K.; POUEME, R.S.N.; KOUAMO, J.; NGU-NGWA, V.; ASSANA, E.; FEUSSOM, K. J. M.; ZOLI, A.P. Seroprevalence and risk factors of brucellosis among slaughtered indigenous cattle, abattoir personnel and pregnant women in Ngaoundéré, Cameroon. **B.M.C. Infect. Dis.** 18(1): 1-13. 2018. <https://doi.org/gj48rn>
- [6] BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **J. Clin. Microbiol.** 32(11): 2660-2666. 1994. <https://doi.org/j8dx>
- [7] BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. **J. Clin. Microbiol.** 33(6): 1640-1642. 1995. <https://doi.org/j8dz>

- [8] CARBONERO, A.; GUZMÁN, L. T.; GARCÍA-BOCANEGRA, I.; BORGE, C.; ADASZEK, L.; ARENAS, A.; SAA, L.R. Seroprevalence and risk factors associated with *Brucella* seropositivity in dairy and mixed cattle herds from Ecuador. **Trop. Anim. Health Product.** 50(1): 197-203. 2018. <https://doi.org/gcxdsz>
- [9] DAL, T.; KARA, S.S.; CIKMAN, A.; BALKAN, C.E.; ACIKGOZ, Z.C.; ZEYBEK, H.; DURMAZ, R. Comparison of multiplex real-time polymerase chain reaction with serological tests and culture for diagnosing human brucellosis. **J. Infect. Publ. Health.** 12(3): 337-342. 2019. <https://doi.org/gj48qt>
- [10] DOGANAY, M.; AYGEM, B. Human brucellosis: An overview. **Internat J. Infect. Dis.** 7(3): 173-182. 2003. <https://doi.org/djsgvp>
- [11] FERRO, E.; JUMA, A.; KONI, A.; BOCI, J.; KIRANDJISKI, T.; CONNOR, R.; WARETH, G.; KOLECI, X. The seroprevalence of brucellosis and molecular characterization of *Brucella* species circulating in the beef cattle herds in Albania. **PLoS ONE.** 15(3): 1-14. 2020. <https://doi.org/gj48ff>
- [12] GHAHERI, M.; KAHRIZI, D.; YARI, K.; BABAIE, A.; SUTHAR, R.S.; KAZEMI, E. A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. **Cell. Mol. Biol.** 62(3): 119-123. 2016. <https://doi.org/j8d3>
- [13] GODFROID, J.; SCHOLZ, H.C.; BARBIER, T.; NICOLAS, C.; WATTIAU, P.; FRETIN, D.; WHATMORE, A.M.; CLOECKAERT, A.; BLASCO, J.M.; MORIYON, I.; SAEGERMAN, C.; MUMA, J.B.; AL DAHOUK, S.; NEUBAUER, H.; LETESSON, J.J. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. **Prev. Vet.** 102(2): 118-131. 2011. <https://doi.org/c39d67>
- [14] GOUD, T.S.; UPADHYAY, R.C.; KUMAR, A.; KARRI, S.; CHOUDHARY, R.; ASHRAF, S.; SINGH, S.; KUMAR, O.; KIRANMAI, C. Novel extraction of high quality genomic dna from frozen bovine blood samples by using detergent method. **Open Vet. J.** 8(4): 415-422. 2018. <https://doi.org/gfrxmg>
- [15] HALLING, S.M.; TATUM, F.M.; BRICKER, B.J. Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. **Gene.** 133(1): 123-127. 1993. <https://doi.org/c3m6fx>
- [16] HAMDY, M.E.R.; AMIN, A.S. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. **Vet. J.** 163(3): 299-305. 2002. <https://doi.org/fbhphh>
- [17] KILIÇ, S.; ÇELEBI, B.; TURAN, M. *Brucella mellitensis* and *Brucella abortus* genotyping via real-time PCR targeting 21 variable genome loci. **J. Microbiol. Meth.** 180: 106125. 2021. <https://doi.org/j8vb>
- [18] KURMANOV, B.; ZINCKE, D.; SU, W.; HADFIELD, T. L.; AIKIMBAYEV, A.; KARIBAYEV, T.; BERDIKULOV, M.; ORYNBAYEV, M.; NIKOLICH, M.P.; BLACKBURN, J.K. Assays for Identification and Differentiation of *Brucella* Species: A Review. **Microorganisms.** 10(8): 1584. 2022.. <https://doi.org/j8vc>
- [19] LEAL-KLEVEZAS, D.S.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, I.O.; LÓPEZ-MERINO, A.; MARTÍNEZ-SORIANO, J.P. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. **J. Clin. Microbiol.** 33(12): 3087-3090. 1995. <https://doi.org/j8vd>
- [20] LEDWABAID, M.B.; GOMO, C.; LEKOTA, K.E.; LE FLÛCHE, P.; HASSIM, A.; VERGNAUD, G.; VAN HEERDEN, H. Molecular characterization of *Brucella* species from Zimbabwe. **PLoS Neglected Trop. Dis.** 13(5): e0007311. 2019. <https://doi.org/gqrrp7>
- [21] LÓPEZ-CALLEJA, I.; GONZÁLEZ, I.; FAJARDO, V.; RODRÍGUEZ, M.A.; HERNÁNDEZ, P.E.; GARCÍA, T.; MARTÍN, R. Rapid detection of cows' milk in sheeps' and goats' milk by a species-specific polymerase chain reaction technique. **J. Dairy Sci.** 87(9): 2839-2845. 2004. <https://doi.org/fnqhrx>
- [22] LUNA, L.; CHÁVEZ, G.; MEJÍA, L.; BARRAGÁN, V.; TRUEBA, G. Molecular detection of *Brucella* species in Ecuador. **Internat. J. Appl. Res. Vet. Med.** 14(2): 185-189. 2016. <https://bit.ly/3LGAtc1>. 20/12/2022.
- [23] MAINATO, E.A.; RAMÓNEZ, J.C.; RAMÓNEZ, M.A.; GARAY, G.S. Factores de riesgo que influyen sobre la frecuencia de brucelosis bovina en ganaderías de Azuay, Ecuador. **Arch. Latinoame. Prod. Anim.** 30: 57-58. 2022. <https://doi.org/j8vf>
- [24] MANCILLA, M.; VILLARROEL, M.; SALDÍAS, M.E.; SOTO, J.; ZÁRRAGA, A.M. Genotipos de aislados de campo de *Brucella abortus* de distintas regiones geográficas de Chile. **Arch. Med. Vet.** 40(2): 187-192. 2008. <https://bit.ly/3M1W6oz>. 20/12/2022.
- [25] MOSQUERA, X.; BERNAL, C.; MUSKUS, C.; BERDUGO, J. Detección de *Brucella abortus* por PCR en muestras de sangre y leche de vacunos. **Rev. MVZ. Cordova.** 13(3): 1504-1513. 2008. <https://bit.ly/3nGWvmT>
- [26] OGUGA, A.J.; AKINSEYE, V.O.; CADMUS, E.O.; JOLAOLUWA-AWOSANYA, E.A.; ALABI, P.I.; IDOWU, O.S.; AKINADE, S.A.; DALE, E.J.; PERRETT, L.; TAYLOR, A.; IGNOCIO, M.; CADMUS, S.I.B. Prevalence and risk factors associated with bovine brucellosis in herds under extensive production system in southwestern Nigeria. **Trop. Anim. Health Prod.** 50(7): 1573-1582. 2018. <https://doi.org/gfdk62>
- [27] OJEDA-GUTIERREZ, K.; ROMÁN-CÁRDENAS F. Identificación molecular de *Brucella* spp. en muestras de sangre de ganado bovino de la provincia de Zamora Chinchipe. **Centro Biotecnol.** 07: 11-16. 2018. <https://bit.ly/44MJ6LO>. 15/01/2023.
- [28] O'LEARY, S.; SHEAHAN, M.; SWEENEY, T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. **Res. Vet. Sci.** 81(2): 170-176. 2006. <https://doi.org/dj6s4p>
- [29] OUAHRANI-BETTACHE, S.; JIMÉNEZ DE B, M.P.; DE LA GARZA, J.; FREDDI, L.; BUESO, J.P.; LYONNAIS, S.; AL DAHOUK, S.; DE BIASE, D.; KÖHLER, S.; OCCHIALINI, A. Lethality of *Brucella microti* in a murine model of infection depends on the *wbkE* gene involved in O-polysaccharide synthesis. **Virulence.** 10(1): 868-878. 2019. <https://doi.org/grkq3z>
- [30] POULSEN, K.P.; HUTCHINS, F.T.; MCNULTY, C.M.; TREMBLAY, M.; ZABALA, C.; BARRAGAN, V.; LOPEZ, L.; TRUEBA, G.; BETHEL, J.W. Brucellosis in dairy cattle and goats in northern Ecuador. **The Amer. J. Trop. Med. Hyg.** 90(4): 712-715. 2014. <https://doi.org/f5xmvd>
- [31] RAGHAVA, S.; GOWDA, M.H.M.; SHOME, R.; KULKARNI, M.; UMESHA, S. Epidemiological and molecular characterization of *Brucella* species in cattle. **Asian. J. Anim. Sci.** 11(3): 123-131. 2017. <https://doi.org/j8vg>
- [32] RENTERÍA-EVANGELISTA, T.B.; ORGANES-DE LOS SANTOS, H.; LICEA-NAVARRO, A.F.; MEDINA-BASULTO, G.E.; NIELSEN, K.; MONTAÑO-GÓMEZ, M. F.; MORENO-ROSALES, J.F.; PUJOL-MANRÍQUEZ, L.C. Evaluación de la prueba reacción en cadena de

- la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos puros en el diagnóstico de la brucelosis bovina. **Téc. Pec. México**. 43(1): 117-126. 2005. <https://bit.ly/3NLbRkT>. 03/01/2023.
- [33] RODRIGUEZ-HIDALGO, R.I.; CONTRERAS-ZAMORA, J.; BENITEZ-ORTIZ, W.; GUERRERO-VIRACOCOA, K.; SALCAN-GUAMAN, H.; MINDA, E.; RON-GARRIDO, L. Circulating strains of *Brucella abortus* in cattle in Santo Domingo de los Tsachilas Province-Ecuador. **Front. Publ. Health**. 3(45): 1-5. 2015. <https://doi.org/j8vj>.
- [34] ROMÁN-CÁRDENAS, F.; LUNA-HERRERA, J. Revisión actualizada de la epidemiología de Brucelosis (*Brucella abortus*, *Brucella mellitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*) en el Ecuador y el mundo. **Centro Biotecnol.** 6: 82-93. 2017. <https://bit.ly/3B71stD>.
- [35] ROMAN-CARDENAS, F.; RAMÓN-CONTENTO, P. Identificación molecular de *Brucella abortus* en nódulos linfáticos de bovinos faenados en Loja. **Siembra**. 8(1): 1-10. 2021. <https://doi.org/j8vp>.
- [36] ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI, I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. **Appl. Environm. Microbiol.** 65(8): 3735-3737. 1999. <https://doi.org/j8vq>.
- [37] RON-ROMÁN, J.; BERKVEN, D.; BARZALLO-RIVADENEIRA, D.; ANGULO-CRUZ, A.; GONZÁLEZ-ANDRADE, P.; MINDA-ALUISA, E.; BENÍTEZ-ORTÍZ, W.; BRANDT, J.; RODRÍGUEZ-HIDALGO, R.; SAEGERMAN, C. The unexpected discovery of *Brucella abortus* Buck 19 vaccine in goats from Ecuador underlines the importance of biosecurity measures. **Trop. Anim. Health Prod.** 49(3): 569-574. 2017. <https://doi.org/f9x4hr>.
- [38] RON-ROMÁN, J.; RON-GARRIDO, L.; ABATIH, E.; CELI-ERAZO, M.; VIZCAÍNO-ORDÓÑEZ, L.; CALVA-PACHECO, J.; GONZÁLEZ-ANDRADE, P.; BERKVEN, D.; BENÍTEZ-ORTÍZ, W.; BRANDT, J.; FRETIN, D.; SAEGERMAN, C. Human brucellosis in northwest Ecuador: typifying *Brucella* spp., seroprevalence and associated risk factors. **Vector Borne Zoon. Dis.** 14(2): 124-133. 2014. <https://doi.org/j8vs>.
- [39] SCHURIG, G.G.; ROOP, R.M.; BAGCHI, T.; BOYLE, S.; BUHRMAN, D.; SRIRANGANATHAN, N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. **Vet. Microbiol.** 28(2): 171-188. 1991. <https://doi.org/cpjcm8>.
- [40] SCHWENKER, J.A.; FRIEDRICHSEN, M.; WASCHINA, S.; BANG, C.; FRANKE, A.; MAYER, R.; HÖLZEL, S. Bovine milk microbiota: Evaluation of different DNA extraction protocols for challenging samples. **Microbiol. Open**. 11(2): e1275. 2022. <https://doi.org/j8vt>.
- [41] SUÁREZ-ESQUIVEL, M.; RUIZ-VILLALOBOS, N.; JIMÉNEZ-ROJAS, C.; BARQUERO-CALVO, E.; CHACON-DIAZ, C.; VIQUE-RUIZ, E.; ROJAS-CAMPOS, N.; BAKER, S. K.; OVIEDO-SANCHEZ, G.; AMUY, E.; CHAVES-OLARTE, E.; THOMSON, N. R.; MORENO, E.; GUZMAN-VERRI, C. *Brucella neotomae* Infection in Humans, Costa Rica. **Emerging Infectious Diseases**. 23(6)997-1000. 2017. <https://doi.org/gbhb6k>.
- [42] TORRES-HIGUERA, L.D.; JIMÉNEZ-VELÁSQUEZ, S.D.C.; RODRÍGUEZ-BAUTISTA, J.L.; PATIÑO-BURBANO, R.E. Identification of *Brucella abortus* biovar 4 of bovine origin in Colombia. **Rev. Argentina Microbiol.** 51(3): 221-228. 2019. <https://doi.org/j8vw>.
- [43] WURYASTUTY, H.; WASITO, R.; SUGIYONO. Molecular identification of *Brucella abortus* collected from whole blood samples of seronegative dairy cattle with reproductive disorders in Central Java, Indonesia. **Pakistan Vet. J.** 39(3): 455-458. 2019. <https://doi.org/j8vx>.