

# MONITOREO EPIDEMIOLÓGICO PARA *Brucella abortus* EN FINCAS DOBLE PROPÓSITO DEL MUNICIPIO MACHIQUES DE PERIJÁ, VENEZUELA: PREVALENCIA, RIESGO Y EFECTO DE UN PROGRAMA DE CONTROL

## Epidemiologic Surveillance System of *Brucella abortus* in Dual Purpose Farms of Machiques de Perijá County, Venezuela: Prevalence, Risk Factors and Control Program

Alfredo Sánchez-Villalobos <sup>1</sup>, Regino Villarroel-Neri <sup>1</sup>, Ana Oviedo-Bustos <sup>2</sup>, Gilberto Sandra <sup>3</sup>, Julio Boscán-Ocandó <sup>1</sup>, Roymi Pinto-Patiño <sup>4</sup>, Francisco Pirela-Larrazábal <sup>4</sup>, Luís Becerra-Ramírez <sup>4</sup> y Edgar López <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidad del Zulia, Unidad de Investigaciones Clínicas. E-mail: saucow33@cantv.net. <sup>2</sup> Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria, edo. Zulia. <sup>3</sup> Colegio de Médicos Veterinarios del estado Zulia, seccional Machiques. <sup>4</sup> Policlínica Veterinaria Universitaria, Servicio de Consulta Externa de Grandes Animales. <sup>5</sup> Sociedad Civil Ganaderos de Machiques.

### RESUMEN

Se evalúa la evolución durante 5 años (2003-2007) de la brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en el municipio Machiques de Perijá. El estudio se realizó identificando en leche, tres veces por año, fincas reactivas a la prueba de anillo (PAL) y positivas a un ensayo inmuno enzimático indirecto (ELISA-i). Paralelamente, fueron analizadas muestras de sangre de la población bovina adulta, procedente de las explotaciones problemáticas, para identificar animales positivos a Rosa de Bengala (RB) y confirmados, por un ensayo inmuno enzimático competitivo (ELISA-c). Adicionalmente, se analizan los alcances de la enfermedad a nivel de un matadero municipal. Los resultados del monitoreo epidemiológico permiten evidenciar disminución progresiva en la ocurrencia de la problemática. Así, en el 2003, se detectó la existencia de 32,3% (209/648) de fincas reactivas a la PAL y 62,9% (404/583) positivas a ELISA-i, y se constató, la presencia y beneficio de animales positivos a RB/ELISA-c sin la identificación pertinente, lo cual repercute sobre la salud de los trabajadores. Para el 2007, se identifican 11,4% de rebaños reactivos a la PAL y 27,2% a ELISA-i; con una positividad de 0,38% (158/41630) de animales infectados según criterio diagnóstico seriado de RB/ELISA-c, aunque se demuestra sesgo importante en esa medición. Además, se identificaron 178 explotaciones (27,0%) sin evidencia de la enfermedad, que pudieran optar por una clasificación o estatus de libres de brucelosis. En el futuro próximo se hace necesario extender el monitoreo

hacia fincas proveedoras de queseras artesanales, evaluar las contribuciones individuales de PAL y ELISA-i, como ensayos primarios en la vigilancia de la problemática, implementar providencias coercitivas de control y explorar nuevas técnicas diagnósticas para la identificación rápida de animales infectados. Estas medidas contribuirán, en mediano plazo, a la erradicación de esta enfermedad en esa región del país.

**Palabras clave:** Brucelosis bovina, monitoreo epidemiológico, programa de control, prevalencia, factores de riesgo, ganadería doble propósito.

### ABSTRACT

Bovine brucellosis (*Brucella abortus*) behavior in Machiques of Perijá County was evaluated for 5 years (2003-2007). The survey was undertaken through Ring Test and indirect ELISA (iELISA) performed on milk samples collected 3 times per year from farms located in Machiques de Perijá County. Moreover, serum samples from the adult bovine population of those farms were analyzed to detect reactors to Rose Bengal Test, which were subsequently confirmed by competitive ELISA (cELISA). Brucellosis prevalence was determined at a county slaughterhouse as well. Epidemiological surveillance results suggest a progressive decrease in brucellosis prevalence. In 2003, 32.3% (209/648) of farms were Ring Test reactors and 62.9% (404/583) were iELISA reactors; also, RBT/cELISA positive animals were slaughtered without having been branded adequately according to the law, which negatively affects slaughterhouse workers' health. In 2007, 11.4% of herds were Ring Test reac-

tors and 27.2% were iELISA reactors; 0.38% (158/41630) of animals were infected according to RBT/cELISA results, there is an important bias in this serial methodology though. Furthermore, 178 farms (27.0%) did not have reactors to the methods used in this survey, which could be candidates to a brucellosis-free status. In the near future, it would be necessary to extend the epidemiological surveillance for brucellosis to farms supplying traditional cheese making factories; to replace Ring Test for iELISA as the main test for milk; to implement compulsory control measures and to explore newer diagnostic tools for rapid identification of infected animals. These measures will contribute, in a short term, to brucellosis eradication in this region of Venezuela.

**Key words:** Bovine brucellosis, epidemiological surveillance, control program, prevalence, risk factors, dual purpose cattle.

## INTRODUCCIÓN

El control de la brucelosis bovina (*Bos taurus-indicus*) a nivel mundial se basa en la vacunación y en la eliminación de animales infectados [11, 12, 16, 17, 20, 25]. Sin embargo, es fundamental apoyar estas medidas con un sistema de información que sea activo y permanente [26, 28], dado que la sola implementación de las primeras, no permite alcanzar los objetivos propuestos en los programas [20, 23, 25, 26]. El monitoreo, así concebido, debe ser una actividad de recolección, análisis, evaluación e interpretación del comportamiento de la enfermedad, y su función principal es informar permanentemente respecto de la dinámica de ésta en una población con el fin de contribuir con los planes de control y erradicación [4, 23, 25]. Su objetivo principal es ubicar rebaños infectados, depurarlos y mantener la supervisión sobre los limpios.

Ello define que el éxito de un programa de control y erradicación resulta dependiente del desarrollo de sistemas de vigilancia que, fundamentados en análisis claves de muestras estratégicas, permita lograr los fines propuestos [11, 20, 23, 25], lo cual representa -además-, una ventaja económica importante para todos los entes involucrados. Por estas razones en el año 2003, los productores agropecuarios agrupados en la Sociedad de Ganaderos de Machiques (GADEMA) y La Universidad del Zulia (LUZ) establecieron un convenio que involucró a varias instituciones gubernamentales, profesionales e industriales, a objeto de iniciar un programa de monitoreo y control de la brucelosis bovina en su territorio. El convenio implantó una supervisión de la enfermedad mediante la evaluación de muestras de leche de los productores coligado a las más importantes procesadoras de la región. Posteriormente, fueron evaluados los animales proveniente de fincas reactivas para detectar anticuerpos específicos mediante pruebas serológicas individuales.

Entre los ensayos diagnósticos disponibles para leche, se contó con la prueba de anillo (PAL) y un inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA-i). PAL ha demostrado una serie de

ventajas sobre otras pruebas serológicas y ha sido de gran utilidad en países que han controlado o mantienen niveles muy bajos de infección [4, 21, 26, 28, 29]. La prueba de ELISA indirecta (ELISA-i) ha mostrado ser relativamente sencilla y aplicable para una utilización masiva [22, 28, 29]. Su uso ha demostrado eliminar o reducir la incidencia en fincas lecheras infectadas [4, 16, 17, 21, 24, 29], siempre y cuando se adopten las medidas sanitarias necesarias.

Pese a la utilidad manifiesta de las muestras de leche, de acuerdo a la legislación vigente en Venezuela [7], el diagnóstico de cada bovino se basa en la prueba rosa de bengala o card test (RB), la cual requiere confirmación a través de las pruebas lenta en tubo, 2 mercapto etanol, fijación de complemento y/o ELISA competitivo (ELISA-c), dado que las dos primeras poseen un alto grado de subjetividad [3, 8, 19] y que ELISA-c se comporta igual o mejor que fijación de complemento [8, 14, 15], que tradicionalmente ha sido aceptada como técnica de referencia. A efecto de la investigación, para definir el estatus sanitario definitivo se utilizó la dupla RB - ELISA-c, ya fuese en forma individual o en conjunto (criterios en serie y en paralelo).

Motivado a que pocas veces se describen y discuten los logros y conflictos que supone la implementación y desarrollo de sistemas de recolección de información y monitoreo epidemiológico, los objetivos del presente reporte se fundamentan en estudiar la evolución de la enfermedad durante 5 años de vigilancia (2003-2007), analizando al mismo tiempo los diferentes factores de riesgo asociados y el efecto de un programa de control sobre la prevalencia de la brucelosis bovina causada por *Brucella abortus* en el municipio Machiques de Perijá, estado Zulia, Venezuela, con el propósito de facilitar su oportuna utilización por quienes deben tomar decisiones de intervención para el control de la enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El municipio Machiques de Perijá es una de las principales zonas productoras de leche y carne del país. Esta región cuenta con una población bovina lechera estimada en 239.437 cabezas, que producen un volumen aproximado a 504.400 litros de leche diarios [13]. Cerca del 70% de esta producción se acopia en las plantas industrializadas procesadoras de leche, la diferencia se comercializa informalmente y se destina a la fabricación de queso [6, 13]. Machiques de Perijá posee características de vida de bosque seco tropical, húmedo tropical y muy húmedo tropical, con temperaturas de 26 a 28°C, evaporación con valores de 1900 mm, y suelos que varían considerablemente [6, 9, 13].

### Población y muestra

La población estuvo conformada por el conjunto de 652 fincas productoras de leche fresca ubicadas en ese Municipio del estado Zulia, proveedoras de las más importantes industrias lácteas que hacen vida activa en la región. A efecto de la

investigación, se consideró oportuno evaluar a la totalidad de las fincas (independiente de su participación activa o no dentro del programa) que conformaban la población de estudio, en períodos cuatrimestrales, con la finalidad de conseguir una información global de la problemática. Las explotaciones fueron clasificadas, según el número de animales en lactancia al momento de la toma de muestra, en tres grupos: estrato A (menos de 100 vacas), estrato B (entre 101 y 200 vacas) y estrato C (mayores a 200 vacas).

### Unidad de análisis

La unidad de análisis primaria consistió en una porción (aproximadamente 100 mL) de leche fresca total extraída directamente del tanque de enfriamiento de cada una de las fincas. Las muestras fueron tomadas por personal técnico de las empresas lácteas coparticipantes, debidamente entrenado para tal fin y siguiendo las normas COVENIN [3]. Cada muestra fue adecuadamente identificada con el código de cada proveedor, los datos referentes al número de vacas en ordeño y los litros de leche producidos. Luego se procedió a su traslado bajo refrigeración hasta el laboratorio Roque García en las instalaciones de GADEMA, donde se almacenaron a una temperatura (LG®, GM-T563QC, EUA) de 4°C por al menos 24 horas.

Las muestras sanguíneas constituyeron otra unidad de análisis. A las hembras bovinas mayores de 20 meses de edad y al grupo de toros y toretas destinados a actividades reproductivas que fuesen mayores a 6 meses, se les practicó un muestreo de sangre para la obtención de suero sanguíneo; se extrajo entre 4 a 6 mL de sangre, por punción de la vena coccígea. La sangre se recolectó en tubos Vacutainer®, que se dejaron en reposo en una gradilla inclinada, bajo sombra, a temperatura ambiente, hasta la retracción del coágulo. Dos horas después fue sometida a centrifugación (Clay Adams, Serofuge 2002, EUA) a 1500 G, durante 10 minutos.

### Procesamiento

Inicialmente, las muestras de leche fueron analizadas para detectar anticuerpos contra *brucella* mediante la prueba del anillo. Posteriormente, fueron descremadas y preservadas hasta el momento de la evaluación por ELISA-i. Dicha metodología permitió identificar las fincas problemas (reactivas a PAL y/o positivas a ELISA-i), a fin de proceder al estudio individual del rebaño, mediante el muestreo de sangre y análisis a través de RB y/o ELISA-c.

### Prueba de anillo de la leche

Para el diagnóstico de brucelosis a partir de las muestras de leche recolectadas, se asumió -primariamente- la prueba del anillo de la leche (PAL) o ring test, la cual se fundamenta en la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, donde los glóbulos de grasa presentes en la leche desplazan (ascienden) dicha reacción hacia la superficie de la mezcla, dando lugar a la formación de una capa (anillo) coloreada, indicativa de

la presencia de anticuerpos. En ausencia de ellos, el anillo será blanco [16, 17, 26, 28, 29].

Las muestras de leche se colocaron a temperatura ambiente 30 minutos antes de su procesamiento. Luego se agitaron vigorosamente con la finalidad de homogenizar sus componentes, antes de extraer la cantidad necesaria para la prueba. En vista de la variabilidad en el tamaño de los rebaños de las fincas estudiadas y con la finalidad de preservar la sensibilidad se adoptó un protocolo estándar donde la cantidad de leche variaba en función al número de vacas que contribuían a su composición [8], el cual se señala a continuación:

Leche (cc)	Estrato	Vacas ordeño
1	A	<100
2	B	101 a 200
3	C	>200

Dicha porción se tomó con una jeringa estéril de 5 mL y se vertió en un tubo de ensayo estéril.

El antígeno utilizado fue elaborado con la cepa de *Brucella* 1119-3 biotipo 1, con una concentración de 4%, ajustado a un pH de 4 a 4,3 y una presentación de frascos de 16 mL. El mismo fue confeccionado por el Instituto de Investigaciones Agrícolas a través de BIOINIA de Venezuela. Este biológico se mantuvo bajo refrigeración (4°C), evitando su congelación y sin ser expuesto a la luz solar; antes de la realización de las pruebas se colocó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El volumen utilizado fue 30 µL por cada mL de leche empleado, cantidad que se agregó al tubo de ensayo con la muestra de leche, se tapó con papel parafinado y se mezcló invirtiendo un par de veces. La mezcla obtenida (leche-antígeno) se sometió a incubación en una estufa (Kalstein, YRH02-3, Venezuela) a una temperatura de 37°C durante un lapso de 60 minutos [2, 26, 28].

A su término, se consideró no reactiva (NR) cuando el color de la mezcla original (azul-grisáceo) se mantuvo disperso homogéneamente en la columna de leche y se formó en la superficie un anillo de grasa de color crema. Se consideró reactiva (R) cuando se formó un anillo de color azul oscuro en la superficie de la columna de leche y ésta última se tornó de color blanquecino [22, 26, 28, 29]. Todos los resultados intermedios se consideraron reactivos débiles.

### ELISA indirecto

Las muestras de leche colectadas para análisis mediante ELISA-i requirieron ser previamente descremadas (centrifugación a 1500 g por 10 minutos). Para garantizar su preservación se utilizó ácido sódico al 0,2%, previo a su congelamiento. La técnica se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante (Boomelli-Idexx, EUA), utilizando microplacas previamente sensibilizadas con el antígeno inactivado, monofásico de *Brucella abortus* (cepa 1119) inmovilizado sobre policubetas de

poliestireno de 96 pocillos. Se depositaron 200 µL de las muestras de leche en cada uno de los pocillos por duplicado. Subsiguientemente, fueron incubados por 90 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego de la fase de lavado, se depositaron 200 µL de conjugado monoclonal Anti-IgG peroxidasa bovino diluido 1:200 en cada uno de los pocillos e incubado por 1 hora a temperatura ambiente [22, 26, 28, 29].

Posterior al segundo lavado, se agregaron 200 µL del cromógeno proporcionado por el fabricante. Como controles positivos y negativos se utilizaron los proporcionados por el kit. Los resultados fueron leídos en un espectrofotómetro Elx 800 (Bio-Tek Instruments®, EUA) a 405 nm. Las densidades ópticas (DO) de las muestras problemas en duplicado fueron promediadas y corregidas por sustracción de la DO del control negativo, estas fueron divididas por las DO de los controles positivos por 100. Se consideraron positivas (POS) aquellas sobre 100%, positivas débiles o dudosas, entre 70% y 100% y negativas (NEG), bajo 70%.

### Rosa de bengala

La prueba RB se basa en una reacción antígeno – anticuerpo con inhibición de algunas aglutinaciones inespecíficas a pH bajo. Se empleó un antígeno coloreado corpuscular de 8% de concentración celular en una solución tope a pH 3,6, proveniente de BIOINIA de Venezuela. En líneas generales, la prueba se realiza colocando 30 µL del suero problema sobre uno de los cuadrados de una lámina de vidrio. Se añaden 30 µL de antígeno RB cerca de la gota del suero. Ambos se mezclaron utilizando un mondadiante distinto para cada muestra. Se tuvo el cuidado de garantizar que la mezcla ocupara un diámetro de 23 a 24 mm. Tras girar la lámina en forma manual durante 4 minutos a razón de 10-12 movimientos por minuto, se tapó y leyó 4 minutos después, sobre luz [2, 9, 15, 18, 19]. Las reacciones que presentaron grumos de aglutinación, grandes o pequeños, se consideraron positivos. Los animales positivos a RB fueron evaluados mediante ELISA-c.

### ELISA competitivo

El ELISA-c utilizado (SVANOVIR® *Brucella abortus*, Svanova Biotech, Suecia) fue diseñado para detectar anticuerpos específicos contra *Brucella abortus*, pudiendo distinguir entre animales infectados y animales vacunados con cepa 19. Las placas tapizadas por un lipopolisacárido (S-LPS) de la bacteria, junto con un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo de la porción O-polisacárido del antígeno S-LPS, proporciona esa especificidad. Una vez añadidas las muestras a los pocillos de la placa y después de una primera incubación, las placas se lavaron e incubaron con un anticuerpo anti-ratón IgG conjugado con peroxidasa. La aparición de color se debe a la conversión del sustrato por el conjugado, la densidad óptica fue medida en un fotómetro Elx 800 (Bio-Tek Instruments®, EUA) a 450 nm [2, 14, 19].

En ausencia de anticuerpos en el suero problema (suero negativo), el anticuerpo monoclonal (mAb) se unirá al epítipo

de la porción O-polisacárido del antígeno S-LPS, con la consiguiente aparición de color. Si la muestra contiene anticuerpos específicos de *Brucella* (suero positivo), éstos competirán con el anticuerpo monoclonal e inhibirán su unión al epítipo de la porción O-polisacárido del antígeno S-LPS y la consiguiente no aparición de color. Muestras procedentes de animales vacunados con la cepa 19 no competirán con el anticuerpo monoclonal debido a su especificidad y baja afinidad, dando como resultado una reacción negativa [9, 14, 15, 19].

Posteriormente se calcularon los valores de DO para los controles y las muestras, que conllevaron al porcentaje de inhibición (PI) para las muestras y para los controles de la siguiente manera:

$$PI = 100 - (DO \text{ del control o muestra} \times 100 / DO \text{ del Control del Conjugado})$$

Las muestras con PI mayor o igual a 30% se consideraron positivas. La validez de la prueba se estableció según criterios establecidos por el fabricante. Todos los animales positivos a ELISA-c fueron considerados infectados por *Brucella abortus*.

### Evaluación a nivel del frigorífico industrial

La investigación a nivel de matadero se dirigió al estudio de la problemática en los semovientes bovinos previo al sacrificio y su influencia directa sobre la salud de los trabajadores. La población animal estuvo constituida por 290 animales cuya finalidad primaria en las fincas de origen eran las funciones reproductivas (novillas, vacas, toretes y toros). La muestra fue calculada mediante la siguiente fórmula [27]:

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

En donde, n= muestra requerida; N= población; d= animales enfermos estimado; NC= nivel de confianza (0,95).

El número de animales enfermos fue estimado en base a una prevalencia de 2,41% [30], lo cual refiere que para un beneficio promedio de 290 reproductores semanales provenientes del Municipio en cuestión, el máximo número de positivos a la enfermedad sería de siete animales y definió -como resultado- que la fracción de muestreo debería corresponderse con un 36,55% de la población, que en cifras absolutas se traduce en el muestreo de 106 animales, que en el dinamismo propio de la acción, se convirtió en definitiva en 109 muestras de sangre. Ello determina que la posibilidad de encontrar un animal positivo en un estudio de tales dimensiones es de 96,45%, lo que reflejó el nivel de confianza de los resultados.

Por otra parte, con la finalidad de determinar la prevalencia de brucelosis dentro de la población humana industrial y su posible asociación con el tipo de tarea desarrollada, se decidió estudiar la totalidad de los trabajadores involucrados en las tareas de beneficio de los bovinos. Para ello, la descripción de labor – área de trabajo se dividió en dos: con y sin contacto directo con la matanza, vísceras, ni animales vivos.

La unidad de análisis se correspondió en ambas indagaciones de una muestra de sangre venosa periférica tomada directamente por personal especializado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de LUZ. Dicha muestra -de aprox. 5 mL- fue recogida en tubos sin anticoagulante debidamente identificados y trasladada, bajo refrigeración, al laboratorio donde se sometió a centrifugación (Clay Adams, Serofuge 2002, EUA) a 1500 G durante 10 minutos para retraer el coágulo, y posteriormente a conservación bajo congelación (Whirlpool®, 7EV070FXRQ, EUA) a -20°C hasta el momento de su procesamiento. En los bovinos, la recolección de las muestras se realizó diariamente a lo largo de una semana, dando a cada día una ponderación similar. En el caso de los trabajadores, dos jornadas continuas fueron necesarias. Sendas fichas fueron diseñadas a propósito de registrar la identificación, edad, sexo y procedencia de los animales, e identidad, antigüedad, tarea y capacitación de los obreros.

Las muestras de suero sanguíneo fueron evaluadas inicialmente mediante las pruebas de RB, la cual fungió como método de paneo o screening para la determinación de reactores positivos. Las técnicas: lenta en tubo, 2mercaptoetanol y ELISA-i se aplicaron y analizaron con un criterio diagnóstico individual y en paralelo.

#### Medidas de control

El programa de control se fundamentó en un esquema de investigación acción [1], partiendo de la notificación primaria a ganaderos y/o médicos veterinarios de los resultados obtenidos a través de las muestras globales de leche, a objeto que éstos tomaran las medidas para el diagnóstico de la enfermedad en los animales mediante la utilización de RB y posterior confirmación a través de ELISA-c. Tras el diagnóstico individual definitivo, se procedió a la eliminación de los reactores y su cría, la reevaluación cuatrimestral del rebaño y semestral de los individuos, la revisión-rediseño del plan de vacunación contra brucelosis y la evaluación-corrección de factores de riesgo mediante la aplicación de una encuesta epidemiológica diseñada para tal fin. Esta notificación no tuvo carácter restrictivo alguno, por lo que el control quedó bajo criterio y voluntad de los directamente involucrados.

#### Análisis estadísticos

Las informaciones procedentes de la investigación se organizaron mediante un software de aplicación Web diseñado con la finalidad de maximizar la eficiencia al momento de manejar la base de datos sobre las fincas, características epidemiológicas, resultados (globales e individuales) y generar informes de forma automática. Este sistema permitió automatizar los procesos de almacenamiento y manejo de la información requerida así como generar sus respectivos informes o almacenar y actualizar de forma fácil y sencilla resultados individuales. Ello permitió definir de forma precisa las variables estudiadas, que luego fueron analizadas y presentadas mediante elementos de es-

tadística descriptiva [1]. Los datos obtenidos fueron ordenados y presentados en Tablas. Los cálculos fueron realizados usando el paquete estadístico Win Episcopo 2,0 [27].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Problemática a nivel de los rebaños (fincas)

Los resultados del monitoreo a nivel de fincas se muestran en la TABLA I. Destaca una alta tasa de participación promedio en los muestreos y una clara tendencia hacia la reducción de la ocurrencia año tras año. Durante el tiempo del estudio, el promedio de cobertura de los muestreos fue superior al 89% (con mínimo del 76,4% para 2005), lo cual permitió cubrir las expectativas y garantizar que todas las explotaciones fueran evaluadas. En relación al nivel de positividad de la enfermedad, si bien considerablemente alto durante el período, resalta una importante propensión a la reducción, aspecto este demostrable no sólo a través de los resultados de la PAL, sino también mediante ELISA-i.

**TABLA I**  
**RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE ANILLO Y ELISA-i**  
**EN LECHE DE FINCAS DOBLE PROPÓSITO DEL**  
**MUNICIPIO MACHIKES DE PERIJÁ/ RING TEST AND iELISA**  
**RESULTS OF MILK SAMPLES FROM DUAL PURPOSE FARMS**  
**LOCATED IN MACHIKES DE PERIJÁ COUNTY**

Años	Fincas Evaluadas	Reaccionantes PAL	Positivos ELISA-i
2003	648 (99,4%)	209 (32,25%)	583 404 (69,29%)
2004	581 (89,1%)	154 (26,51%)	ne
2005	498 (76,4%)	81 (16,27%)	408 201 (49,26%)
2006	572 (87,7%)	75 (13,1%)	486 191 (39,30%)
2007	608 (93,3%)	69 (11,35%)	466 127 (27,22%)
Totales	652		

ne = No evaluado.

Al inicio del programa en el año 2003, con una participación del 99,4% de las fincas, se detectan 209 (32,25%) explotaciones reactivas a PAL y 404 (69,29%) positivas a ELISA-i. Se comienza en ese momento una campaña de información, divulgación y educación a fin de despertar interés de productores y profesionales del agro en lograr el control de la enfermedad en la zona de estudio. Esta iniciativa se basó en la notificación de los resultados y en un llamado a asumir la responsabilidad sobre la problemática. Al mismo tiempo, se proyectaron estrategias para identificar los factores de riesgo asociados a la persistencia de la enfermedad.

Este resultado permitió finalmente, establecer unas recomendaciones básicas acerca del control y erradicación de la enfermedad. Desde el año 2004 y en los subsiguientes, se evidencia la reducción significativa y sostenida de la problemática, detectándose una tendencia de asociación lineal ( $P < 0,50$ )

entre la implementación del programa de control y las tasas de ocurrencia de brucelosis para los años 2005, 2006 y 2007. El nivel de asociación encontrado ( $r^2=91$ ) indica el alto grado de confianza que puede otorgársele a los mecanismos de control ensayados en esta investigación.

**Áreas geográficas:** Las Parroquias que componen el municipio Machiques de Perijá presentaron desde el momento de la primera medición (año 2003), diferencias estadísticas importantes que señalan una mayor tasa de ocurrencia en una de ellas (TABLA II). Así, en San José de Perijá se detectó una positividad mayor ( $P<0,05$ ) al resto de los espacios que definen el área de estudio. Esta diferencia se asoció directamente con la idiosincrasia y apatía del agroproductor de esa zona. Cabe destacar además, que durante el período de estudio, la evolución de cada Parroquia fue similar, lo que indica que para mediados del 2007, aún mantiene una relativa mayor seroreactividad, que señala persistencia de la infección en el área, razón por la cual -esta Parroquia- se considera crítica a los fines de la investigación.

**Explotaciones positivas reincidentes:** Muy a pesar de las notificaciones realizadas a los propietarios de las fincas problemáticas, un conjunto de 110 (16,87%) unidades de producción fueron identificadas como reincidentes en los distintos períodos diagnósticos. Ello indica que, en muchos momentos, se detectaban las mismas explotaciones, lo cual pone en evidencia un alto grado de indiferencia a las recomendaciones y medidas recomendadas para el control de la problemática. Al estudiar en detalle las características de estas fincas resalta que el 20% de ellas carecía de asistencia veterinaria especializada, mientras el 85% no había realizado un diagnóstico de brucelosis en los animales, individualmente, en al menos los dos últimos años.

**Explotaciones negativas a brucelosis:** Caso contrario, mediante la vigilancia sostenida también ha sido posible identificar 170 (26,07%) fincas negativas a la enfermedad. Estas explotaciones, no reactivas a PAL y ELISA-i en leche, podrán acceder a una clasificación de libre de brucelosis, una vez que demuestren la negatividad de sus rebaños. Sobre este punto, es necesario resaltar que este logro representa un merito propio de los productores y del sistema de vigilancia, dado que el reglamento nacional [7], no contempla ningún tipo de bonificación, ni compensación para los productores que alcancen dicha calificación, salvo el beneficio propio de explotar un rebaño sano. La importancia de estos subsidios ha sido reconocida por programas de control y erradicación de muchos otros países del mundo donde los alcances han sido manifiestos [10, 18, 23].

**Tamaño de los rebaños:** La tasa de positividad de los rebaños no mostró relación estadística con el tamaño de los rebaños (número de vacas en ordeño), TABLA III. Si bien, numéricamente se observa mayor positividad a ELISA-i en el estrato "A", la misma responde proporcionalmente a la composición de la población en estudio, aspecto que se repite en los otros dos estratos. Aspecto que se demuestra desde el punto estadístico, dado que los valores calculados de Ji-cuadrado, resultaron inferiores a la distribución Ji-cuadrado estándar, lo cual descarta correlación entre estos elementos.

Estos resultados discrepan de los presentados por López y col. [10] en Chile, quienes encontraron mayor positividad en las fincas con un volumen superior de animales (más de 100 animales), lo que asociaron a las dificultades propias que implicaría un manejo preventivo de las salas de maternidad. Las diferencias se explican al entender que los resultados de la provincia de Ñuble, corresponden a un tipo de ganadería donde los partos ocurren en maternidades cerradas con piso

**TABLA II**  
**RESULTADOS EN ATENCIÓN A LA DISTRIBUCIÓN GEOPOLÍTICA DEL MUNICIPIO MACHIKES DE PERIJÁ/**  
**RESULTS ACCORDING TO THE GEOPOLITICAL DISTRIBUTION OF MACHIKES DE PERIJÁ COUNTY**

B. de las casas			Libertad			Río Negro			San José		
Fincas	R	%	Fincas	R	%	Fincas	R	%	Fincas	R	%
177	34	19,2	153	23	15,0	128	22	17,2	61	18	29,5

**TABLA III**  
**DISTRIBUCIÓN DE LOS RESULTADOS DE ELISA-i (AÑO 2003) DE ACUERDO AL TAMAÑO DEL REBAÑO/**  
**DISTRIBUTION OF 2003 iELISA RESULTS ACCORDING TO HERD SIZE**

Vacas en ordeño	Fincas Estudiadas	Negativas	Fincas Positivas	Distribución (%)	Positividad (%)
Estrato "A" hasta 100	272 (46.6%)	75	197	(48,8%)	72,4%
Estrato "B" 101 a 200	212 (36.4%)	66	146	(36,1%)	68,9%
Estrato "C" más de 200	99 (17.0%)	38	61	(15,1%)	61,1%
	583	179	404	(100%)	69,3%

de cemento y camas artificiales que requieren desinfección constante, y no en condiciones de campo que caracterizan a la ganadería doble propósito venezolana.

**Problemática a nivel individual (animales)**

El porcentaje de animales positivos a las pruebas RB y ELISA-c se redujo desde el 0,639% (338/52876) detectado en el 24,65% (106/430) de las fincas evaluadas durante el año 2005, hasta alcanzar 0,380% (158/41630) en 16,67% (26/156) de las explotaciones valoradas en el 2007, TABLA IV. Ello determina una curva de ocurrencia con importante tendencia decreciente en ambas mediciones (59,47% en la positividad individual y 67,63% en el número de fincas involucradas). Ese nivel de infección individual se consideró bajo y accesible a erradicación, pese a su amplia distribución en el área de estudio. Estos resultados en suero sanguíneo coinciden con los datos provenientes de las mediciones en leche y sólo parcialmente con investigaciones precedentes [5, 21, 30].

Las diferencias existentes obedecen probablemente a un sesgo producto de la participación de un mismo conjunto de fincas, que no incluye a pequeños productores de la región, y que se acompaña de gran indiferencia por parte de otros, que parecen no entender la necesidad de implementar medidas de control y erradicación. En consecuencia, la tasa de ocurrencia individual aquí mostrada pudiese no representar la realidad del municipio Machiques de Perijá, en virtud del bajo número de animales probados anualmente, en comparación con la población adulta estimada sujeta a diagnóstico, TABLA IV.

**Problemática a nivel de frigorífico**

Los resultados sobre la indagación en los reproductores destinados al sacrificio en el principal frigorífico de la región se engloban en la TABLA V. En ella se evidencia que el 1,83% de los animales estudiados resultó positivo a *Brucella abortus*. Si bien, esta cifra es casi 5 veces superior a la ocurrencia individual aquí evidenciada, reafirma que los valores de prevalencia de la enfermedad para la zona de estudio están sesgados por

la escasa participación de individuos sujetos a prueba. Los resultados revelan también, que un apreciado número de animales sacrificados carece de una apropiada identificación diagnóstica de la enfermedad a nivel de finca, lo cual pone en peligro la salud de los trabajadores de esta industria. Tal aseveración, es confirmada en la TABLA VI, la cual recoge los resultados del estudio de las muestras provenientes del personal del frigorífico donde se demuestra fehacientemente la coexistencia de la enfermedad dentro del personal.

El 16% del personal estudiado presentó niveles de titulación a las pruebas serológicas lenta en tubo, 2 mercapto etanol y/o resultaron positivas a rosa de bengala. De éstos, 2 (2%) al resultar positivos a rosa de bengala y ELISA-i, se consideraron con una infección activa a brucelosis. No se encontró diferencia estadística para las medias de antigüedad (P<0,05), lo que indica que los trabajadores pertenecientes a cada grupo han sido expuestos durante un tiempo promedio similar. En cambio, si se evidenció diferencia estadística (P<0,05) entre las tasas de ataque de los dos grupos de área – labor según el contacto con el proceso de matanza, vísceras y animales vivos, lo que sugiere un mayor riesgo de infección de los trabajadores con acceso directo a esas tareas. El nivel de capacitación de los trabajadores del frigorífico mostró un riesgo homogéneo.

**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

El análisis y evaluación de los resultados presentados permite señalar que en el municipio Machiques de Perijá, la

TABLA V

**RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN SEROLÓGICA EN LOS REPRODUCTORES BOVINOS SACRIFICADOS EN EL MATADERO INDUSTRIAL DE MACHQUES/ SEROLOGICAL SURVEY OF CATTLE (BOVINE BREEDERS) SLAUGHTERED AT THE MACHQUES COUNTY INDUSTRIAL SLAUGHTERHOUSE**

Animales en estudio	Rosa de bengala	Lenta en tubo	Mercapto etanol	ELISA-i
109	2 (1,83%)	3 (2,75%)	2 (1,83%)	2 (1,83%)

TABLA IV

**ANIMALES REACTORES POSITIVOS A LAS PRUEBAS ROSA DE BENGALA Y ELISA-c (CRITERIO SERIADO)/ POSITIVE REACTORS TO ROSE BENGAL TEST AND cELISA (serial criterium)**

Año	Número de evaluaciones		Reactores positivos (RB + ELISA-i +)	
	Animales	Fincas	Animales	Fincas
2003	nd	nd	nd	nd
2004	nd	nd	nd	nd
2005	52876	430	338 (0,639%)	106 (24,65%)
2006	62065	327	290 (0,468%)	69 (21,10%)
2007 *	41630	156	158 (0,380%)	26 (16,67%)

\* Resultados parciales enero – agosto 2007; nd= No disponible.

TABLA VI

**RESULTADOS SEROLÓGICOS DE LA DETERMINACIÓN DE BRUCELOSIS EN EL PERSONAL DE MATANZA DEL FRIGORÍFICO INDUSTRIAL DE MACHQUES/ SEROLOGICAL RESULTS OF BRUCELOSIS IN MACHQUES COUNTY INDUSTRIAL SLAUGHTERHOUSE WORKERS**

Trabajadores en estudio	Rosa de bengala	Lenta en tubo	Mercapto etanol	ELISA-i
100	2 (2,0%)	8 (8,0%)	1 (1,0%)	1 (1,0%)
Área-Labor	Tasa de ataque (%)		Antigüedad (meses)	
Sin contacto directo	1,8		115,6	
Con contacto directo	26,4		90,4	

brucelosis bovina posee una amplia distribución geográfica con diferencias estadísticas significativas entre Parroquias y mayor tasa para San José de Perijá. Su ocurrencia interesa al menos, al 27,22% de las fincas doble propósito de la región; con resultados de positividad por animal inferiores al 1%, para las fincas integradas al sistema de vigilancia, pero variable y desconocido para el grupo de explotaciones que no han seguido las indicaciones dadas. Su evolución, medida tras cinco años de trabajo, refiere una sustancial tendencia hacia la reducción de casos individuales y fincas reactivas; pese a ello, se demuestra el sacrificio de reproductores bovinos sin la debida identificación necesaria para garantizar la salud humana en los grupos de riesgo, cuya ocurrencia también se evidencia.

El bajo interés mostrado por un importante grupo de productores y profesionales de la medicina veterinaria, ponen en peligro los alcances del programa multidisciplinario de control y vigilancia, y evidencia las siguientes debilidades: dependencia del diagnóstico de pruebas tradicionales; falta de incentivos para los agroproductores y necesidad de aplicación de medidas restrictivas de control.

El monitoreo en leche es reconocido como herramienta básica de trabajo; sin embargo, ante los progresos alcanzados en la reducción de la problemática, se vislumbra a corto plazo la necesidad de evaluar la capacidad diagnóstica operativa de PAL y ELISA-i en la vigilancia. Urgencia similar es requerida respecto la valoración comparativa de RB, ELISA-c y la inclusión del ensayo de fluorescencia polarizada en el diagnóstico individual de los bovinos.

La falta de incentivos económicos se identifica como obstáculo para el seguimiento del programa por parte de los ganaderos, que junto a la inexistencia de medidas restrictivas de comercialización y movimiento de animales para las fincas problemas, debilita la participación en el proyecto. Ello requiere del apoyo del Estado y sus instituciones, como rectores y ejecutores del programa oficial, garantizando mediante ese apoyo, el control y erradicación de la brucelosis. Es así mismo necesario entender que, el sistema de vigilancia epidemiológica debe extenderse a los pequeños productores de queso y proveedores de queseras artesanales, como vía expedida para el control de la enfermedad en la región.

Finalmente, las acciones y alcances del sistema de vigilancia epidemiológica para brucelosis del municipio Machiques de Perijá deberán ser consideradas como programa piloto e incentivar el establecimiento de similares programas municipales, estatales e incluso a nivel nacional a objeto de dar dinamismo al programa nacional de control y erradicación.

#### AGRADECIMIENTO

Los resultados mostrados se derivan de los trabajos del "Sistema de Vigilancia Epidemiológica para brucelosis del municipio Machiques de Perijá" (SVE), y han sido posibles gracias a la colaboración de la Sociedad Civil Ganaderos de Ma-

chiques (GADEMA), Colegio de Médicos Veterinarios del estado Zulia seccional Machiques, Servicio Autónomo de Sanidad Animal, Ministerio de Sanidad y, muy especialmente, al conjunto de empresas lácteas de la región. El SVE ha sido cofinanciado por GADEMA, las industrias lácteas y la Comisión de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad del Zulia (CONDES-LUZ).

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARGIMON-PALLÁS, J.M.; JIMÉNEZ-VILLAS, J. Contextos de la investigación en ciencias de la salud. **Métodos de Investigación Clínica y Epidemiológica**. 3era Ed. Madrid. 1-404pp. 2004.
- [2] ALONSO, B.; BAGNAT, E.; MANETTI, J.; NICOLA A. Pruebas Serológicas. **Manual de procedimientos técnicos de diagnóstico de Brucelosis bovina**. Versión 2,0. Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 70pp. 1978.
- [3] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES: COVENIN. LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS, MÉTODOS PARA LA TOMA DE MUESTRAS. Norma 938-83. Fondonorma. 1-22pp. 1983.
- [4] CRUZ, M.L.; BASCO DE D., M.; WILDE, O.R.; RABASA DE SAL, A. Prevalencia de la Brucelosis Bovina en la Cuenca Lechera de la Provincia de Tucumán, **Vet Argent**. 13 (130):703-707. 1996.
- [5] D'POOL, G.; PIRELA, S.R.; TORRES, T.; PÉREZ, M.; GARCÍA, A.; CASTEJÓN, O.; ROJAS, N. Prevalencia de brucelosis bovina mediante ELISA competitivo en el municipio La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela. **Rev Científ. FCV- LUZ**. 14 (2):168-176. 2004.
- [6] FUERNAYOR, W. **Atlas del estado Zulia. Síntesis Socio Histórico y Cultural**. Universidad del Zulia. Facultad de Humanidades y Educación. Departamento de Geografía. Mapoteca Agustín Codazzi. 4ª Ed. 96-113pp. 1998.
- [7] GACETA OFICIAL DE LA REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA. Resolución 127. Normas para el programa de prevención, control y prevención de la brucelosis. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela. 2003.
- [8] GARCÍA C., C. Brucelosis Animal y humana en las Américas. **Pruebas suplementarias para el diagnóstico de la brucelosis**. Centro Panamericano de Zoonosis. Nota Técnica No. 25. OMS. Buenos Aires, Argentina. 56pp. 1982.
- [9] JAIMES, E.J.; PINEDA, N.; MENDOZA, J. Homogeneidad mesoclimática de algunas zonas de vida de Venezuela. **INCI** 31 (11):772-786. 2006.
- [10] LÓPEZ, J.; BEST, A.; MORALES, C. Diagnóstico de brucelosis bovina en leche por el Ring Test y ELISA en le-

- cherías de la provincia de Ñuble (VIII Región) **Arch de Med Vet.** 30 (1):133-138. 1998.
- [11] LOPETEGUI, P. Bovine brucellosis control and eradication programme in Chile: vaccine use as a tool within the programme. **Dev. in Biol.** 119:473-9. 2004.
- [12] LORD, V.R.; SCHURIG, G.G.; CHERWONOGRODZKY, J.W.; MARCANO, M.J.; MELÉNDEZ, G.E. Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. **Am. J. Vet. Res.** 59(8):1016-20. 1998.
- [13] MARTÍNEZ, J.; NOGUERA, N.; PETERS, W.; CLAVERO, T. Suelos y pastos de referencia en la región Machiques-Colón. **Rev. de la Fac. Agron. (LUZ)**. 12(1): 59-69. 1995.
- [14] MCGIVEN, J.A., TUCKER, J.D.; PERRETT, L.L.; STACK, J.A.; BREW, S.D.; MACMILLAN, A. P. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and IELISA. **J. of Immunol. Meth.** 278 (1-2):171-178. 2003.
- [15] NIELSEN, K.; SMITH, P.; YU, W.; NICOLETTI, P.; ELZER, P.; ROBLES, C.; BERMÚDEZ, R.; MINAS, A. Towards single screening tests for brucellosis. **OIE Revue Scientif et Tech.** 24 (3):1027-1038. 2005.
- [16] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. Brucellosis bovina. **Manual de la OIE sobre animales terrestres.** 445-476pp. 2006.
- [17] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Brucellosis. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.** Publicación científica y técnica 580. 3ra Ed. 28-56pp. 2001.
- [18] POESTER, F.P.; GONCALVES, V.S.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. **Vet. Microbiol.** 90 (1-4):55-62. 2002.
- [19] RAMÍREZ, M.; ERNST, S.; ELVINGER, F.; RIVERA, A.; ROSENFELD, C. Respuesta serológica y tiempo de saneamiento en rebaños bovinos con brucellosis vacunados con Cepa 19 o Cepa RB51; X Región, Chile. **Arch. Med. Vet.** 34 (2). 2002.
- [20] RENTERÍA, T.; NIELSEN, K.; FEDOROVISH, A.; MONTAÑO, M.; MORENO, J. Evaluación de un programa de control de la brucellosis bovina en hatos lecheros de Baja California. **Téc. Pec. Méx.** 8 (41): 275-282. 2003.
- [21] RIVERA, S.; CUIEL, J. Epidemiología Serológica de la Brucellosis Bovina en el Municipio Rosario de Perijá, estado Zulia, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** V (2):174-1124. 1993.
- [22] RIVERA, D.Y.; RUEDA, O.E.; CALDERÓN, C.P.; MARIÑO, O.C.; GALL, D.; NIELSEN, K. Comparative evaluation of the indirect enzyme-linked immunosorbant assay in milk for the detection of cattle infected with *Brucella abortus*, in herds located in the province of Cundinamarca, Colombia. **Rev. Sci. Tech.** 22(3):1065-75. 2003.
- [23] RIVERA, S.A.; RAMÍREZ, M.C.; LOPETEGUI, I. P. Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de Los Lagos, Chile. **Vet. Microbiol.** 90 (1-4):45-53. 2002.
- [24] SAMARTINO, L. E. Brucellosis in Argentina. **Vet. Microbiol.** 90 (1-4):71-80. 2002.
- [25] SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO, CHILE. Programa Oficial de Erradicación de Brucellosis Bovina PEBB/MP1 Procedimientos de Erradicación de Brucellosis Bovina. Anexo 2. 33pp. 2004.
- [26] SILVA J, F.; MEGID, J.; NOZAKI, C. N.; PINTO, J. P. Avaliação do teste do anel em leite na vigilância epidemiológica da brucelose bovina em rebanhos e em laticínios. **Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoot.** 59 (2):295-300. 2007.
- [27] THRUSFIELD, M.; ORTEGA, C.; DE BLAS, I.; NOORDHUIZEN, J. P.; FRANKENA, K. Win Episcopy 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. **Vet. Rec.** 148 (18):567-572. 2001.
- [28] VANZINI, V.; AGUIRRE, N.; VALENTINI, B.; TORIONI DE E., S.; LUGARESI, C.; MARCHESINO, M.; NIELSEN, K. Comparison of and indirect ELISA with the *Brucella* milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples. **Vet. Microbiol.** 82:55-60. 2001.
- [29] VANZINI, V.; AGUIRRE, N.; LUGARESI, C.; TORIONI DE E., S.; CANAVESIO, V. G.; GUGLIELMONE, A.; MARCHESINO, M.; NIELSEN, K. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. **Prev. Vet. Med.** 36:211-217. 1998.
- [30] VARGAS, F. Brucellosis in Venezuela. **Vet. Microbiol.** 90 (1-4):39-44. 2002.