

CAPACIDAD OPERATIVA DE TÉCNICAS DE UNIÓN PRIMARIA Y SEROEPIDEMIOLOGÍA DE LA BRUCELOSIS PORCINA EN LA REGIÓN CENTRO OCCIDENTAL DE VENEZUELA

Validation of Primary Binding Assay and Seroepidemiology Swine Brucellosis in the Central Western Region of Venezuela

Eli Ramón Rubio-Fuenmayor^{1,4}, *Luis Becerra-Ramírez*¹, *Jacqueline Trómpiz-Lachmann*², *Willian Mejía-Silva*³, *Disney Pino-Ramírez*⁴, *Mario Pérez-Barrientos*⁵ y *Alfredo Sánchez-Villalobos*^{4*}

¹Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Policlínica Veterinaria Universitaria, Sección Grandes Animales.

²Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, Departamento de Zootecnia. ³Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra Sistema de Producción y Patología Porcina. ⁴Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Unidad de Investigaciones Clínicas y Unidad de Investigaciones Zootécnicas, Laboratorio de Salud Poblacional Bovina.

⁵Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Enfermedades Infecciosas. *E-mail: saucow33@gmail.com

RESUMEN

Se emprendió una investigación en tres fases a objeto de lograr la validación de fluorescencia polarizada (FPA) y de un inmunoensayo enzimático de competencia comercial (ELISA-c) para el diagnóstico de brucelosis en porcinos y evaluar la seroepidemiología de esta enfermedad en la región centro occidental de Venezuela. La primera fase consistió en comprobar la capacidad operativa diagnóstica de las técnicas frente a un conjunto referencial de sueros con estatus conocido. La segunda midió la ocurrencia en las granjas y su asociación respecto al nivel de tecnologías aplicadas y el estatus reproductivo de los animales. La última consideró la positividad en animales al momento de su beneficio. Los resultados muestran la idoneidad operacional en la detección de brucelosis, con puntos de corte de 78,5 unidades de milipolarización (mP) para FPA y 21 por ciento de inhibición (%I) para ELISA-c, permitiendo predecir de modo preciso el estado de infección con un alto grado de confiabilidad estadística. Ambas técnicas lograron una sensibilidad del 100% (Intervalo de confianza IC_{95%}: 100 - 100%), pero difirieron en cuanto a la especificidad, para FPA: 95% (IC_{95%}: 85,4 - 100,0%) y para ELISA-c: 65% (IC_{95%}: 44,1 - 85,9%); los valores de predicción positivo fueron 97,6 y 85,1%, respectivamente y del negativo fue del 100% para ambas. El valor del área bajo la curva ROC (Receiver Operating Characteristic) fue de 97,7% (IC_{95%}: 92,3-100%) para FPA y de

95,2% (IC_{95%}: 89,7-100%) para ELISA-c. Se demuestra la presencia de infección por *Brucella* spp. en porcinos bajo diversas condiciones reproductivas (4,7%) y en explotaciones con diferentes grados de tecnologías (6,6 y 3,9%). Igualmente se señala la ocurrencia de brucelosis a nivel de la sala de beneficio (7,6%). Se hace un llamado a la implementación de programas de vigilancia epidemiológica y reestructuración del programa de control y erradicación de brucelosis permitiendo la inclusión de estas herramientas diagnósticas.

Palabras clave: Brucelosis porcina, fluorescencia polarizada, inmunoensayo enzimático de competencia, validación operativa.

ABSTRACT

A three phase's research was carried out in order to accomplish the fluorescence polarization and enzyme-linked immunosorbent test validations to the swine brucellosis diagnosis and to evaluate the seroepidemiology of this disease in the central western area of Venezuela. The first phase was based on proving the diagnostic operative ability of the techniques, using a referential group of serum with previous known status. The second one measured the frequency in the herds according to the technological levels and the animals' reproductive status. The last one considered the slaughterhouse animals' positivity. The results showed the operational ideal case in the brucellosis detection, with cutpoints of 78.5mP (FPA) y 21%I (ELISA-c), respectively, allowed predicting accurately the infec-

tion state with a high coefficient of statistical reliability. Both techniques got a 100% sensibility (IC_{95%}: 100 - 100%), however they were different regarding to specificity, for FPA: 95% (IC_{95%}: 85.4 - 100.0%) and for ELISA-c: 65% (IC_{95%}: 44.1 - 85.9%); the positive prediction values were 97.6 and 85.1%, respectively; the negative one was 100% for both of them. The value of the area under the ROC curve was 97.7% (IC_{95%}: 92.3-100%) for FPA and 95.2% (IC_{95%}: 89.7-100%) for ELISA-c. Considering the above, it is proven the presence of *Brucella* spp. infection in swine with different reproductive conditions (4.7%) as in herds with different technologies levels (6.6 and 3.9%). Moreover, it is pointed out the frequency of brucellosis at the slaughterhouse level (7.6%). It is asked to implement epidemiologic survey programs and to restructure the brucellosis control and eradication program allowing the inclusion of these diagnostic tools.

Key words: Swine brucellosis, fluorescence polarization assay, enzyme-linked immunosorbent assay, operational validation.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, el desarrollo de la cría porcina está signado por altibajos que ponen en riesgo la estabilidad de los rebaños [49]. Entre los principales factores condicionantes se describen los altos costos de producción, la inexistencia de un sistema de manejo zootécnico adecuado y fallas en la aplicación de medidas sanitarias [17, 18, 49]. Aunque no existe información confiable sobre la población porcina en Venezuela, algunas estimaciones hechas para el año 2006, consideran que este rubro está representado por 105.000 cerdas madres y alrededor de un millón de cerdos (*Sus scrofa* doméstica), distribuidos en granjas ubicadas principalmente en la región central y centro occidental del país [49].

El 67% de los animales se encuentra en manos de poricultores que implementan una crianza con alta tecnología, pero su estatus sanitario es incierto para varias enfermedades [49]. El panorama se oscurece aún más al considerar a la población perteneciente a pequeños productores, que crían en forma libre o con un escaso nivel tecnológico, donde planes de vacunación y pruebas diagnósticas rara vez se implementan, por lo que problemáticas como el cólera porcino y el complejo respiratorio reproductivo porcino son prevalentes [5, 49] y otras, como brucellosis, podrían estar presentes.

La brucellosis porcina es causada principalmente por *Brucella suis* y sólo ocasionalmente por *B. abortus* y/o *B. melitensis* [2]. El cerdo es portador natural de biovariedades que resultan especialmente patógenas para el hombre [5, 20]. Pese a ello, la ocurrencia nacional y positividad regional de esta infección es desconocida, si bien escasos datos previos sugieren una positividad entre 5 al 89% [14, 50]. La enfermedad en las cerdas puede cursar con aborto en cualquier fase de la gestación y/o nacimiento de lechones muertos o débiles.

En los verracos, el signo más destacado es orquitis, aunque también pueden verse afectadas las glándulas sexuales anexas [2, 3, 45, 47]. Sin embargo, la problemática puede ser clínicamente inaparente y los abortos, si llegaran a ocurrir son tan tempranos que pasan desapercibidos [2, 3, 16-18]. La vacunación contra brucellosis aún no es una estrategia efectiva en los porcinos [3, 6, 19].

El diagnóstico certero de la brucellosis porcina requiere de técnicas bacteriológicas, pero los inconvenientes propios de su implementación hacen que de forma convencional se emita mediante métodos serológicos, sin embargo, ninguna de las pruebas disponibles resulta totalmente confiable [12, 22, 34, 36]. La reacción de fijación de complemento no es adecuada, ya que el complemento de cerdo interactúa con el del cobayo (*Cavia porcellus*) y disminuye la sensibilidad de la determinación [34, 36, 37]. Otro inconveniente común es la reactividad cruzada existente entre el lipopolisacárido de *Brucella* spp y el de otras bacterias Gram negativas, por lo que es frecuente la aparición de falsos positivos [12, 28, 44, 46]; entre ellas, la reactividad cruzada con *Yersinia enterocolitica* 0:9 se define como un problema particularmente importante [12, 14, 21, 27, 34]. Las pruebas recomendadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) [36] con propósitos de comercio internacional y diagnóstico individual son los inmunoensayos enzimáticos indirecto (ELISA-i) y competitivo (ELISA-c) y el ensayo de fluorescencia polarizada (FPA). Otros métodos (de aglutinación y alérgica cutánea) se consideran pruebas alternativas con propósitos de identificar granjas infectadas [36].

A pesar de la importancia de la brucellosis porcina, no existe en Venezuela información actualizada acerca de su situación epidemiológica, incluso son escasas las publicaciones acerca del uso de reacciones de interacción primaria para detectar anticuerpos anti-*Brucella* en cerdos en Latinoamérica. Por esta razón, en el presente estudio se formularon como objetivos: evaluar la capacidad diagnóstica operativa de estas pruebas y determinar la frecuencia de brucellosis en porcinos de la región centro occidental, procedente de granjas con distinto tipo de manejo, empleando de manera simultánea ELISA-c y FPA, y de esta manera contribuir al conocimiento de la epizootiología de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y muestra

El estudio se realizó en tres etapas. La primera radicó en establecer la validación operativa de ambas pruebas diagnósticas [11, 13, 23, 43, 50], para lo cual se reevaluaron 60 muestras de suero sanguíneo de animales con resultados de serología conocido (positivos y negativos), provistas a partir del banco propio de la investigación.

A objeto de la evaluación, la calificación previa se realizó en base a los siguientes criterios: Sueros positivos (n= 40): conjunto de sueros sanguíneos proveniente de granjas proble-

mas y animales positivos a tres diferentes pruebas en serie: rosa de bengala (RBT), 2-mercapto etanol (2-ME) y un inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA-i). Así, cualquier grado de aglutinación a la prueba de RBT se consideró positivo, siempre que reaccionara a una dilución de 1:25 o mayor al 2-ME y obtuviese al menos un resultado >25% al ELISA-i. Por el contrario, fueron consideradas negativas las muestras (n= 20) provenientes de granjas sin antecedentes epidemiológicos ni serológicos de brucelosis. Tal criterio multi ensayo fue necesario dado que para la OIE, ninguna de las pruebas serológicas convencionales utilizadas para el estudio de la brucelosis son fiable para el diagnóstico individual en porcinos y no se pueden recomendar individualmente [36].

La segunda parte (n= 511) se basó en un muestreo poblacional del conjunto de reproductores de 20 granjas porcinas de la región centro occidental de Venezuela, 10 catalogadas como artesanales o con crianza de baja tecnología y 10 tecnificadas; sin embargo, por dificultades propias del manejo, sólo se logró un muestreo del 62,4% de la población, cuya composición final involucró: verracos en un 7,2%; hembras nulíparas en un 15,5%, y cerdas madres en un 77,3%. El muestreo fue hecho al azar, sin existir proporcionalidad entre las granjas de cada grupo. La categorización de las granjas correspondió a los criterios descritos por Farro y col. [8].

La tercera etapa incluyó la evaluación de un conjunto de muestras sanguíneas tomadas directamente a nivel de la principal sala de beneficios de cerdos ubicada en el estado Zulia, pero que sirve a toda la región centro occidental del país (n= 304). Se estimó una matanza promedio de 2.000 cerdos/semana y una prevalencia mínima del 1% [18, 50], lo que para un nivel de confianza del 95% ($IC_{95\%}$), significaba la obtención primaria de 277 muestras, que representaría una fracción de muestreo del 13,9% de la población. Pero, en la dinámica propia del trabajo y a objeto de incluir a todos y cada una de las granjas proveedoras, se colectaron 304 sueros de un total de 1.731 cerdos sacrificados en el lapso de estudio, lo que permitió ajustar la precisión del ensayo, al reducir el error a 3,2% e incrementar el nivel de confianza a 99% [7, 15]. En este esquema de muestreo se logró la participación de 30 granjas, 18 artesanales o con baja tecnología y 12 tecnificadas. La muestra final estuvo integrada por: 40,4% de machos castrados, 5,8% de machos jóvenes enteros, 51,9% de hembras nulíparas, y 1,9% de cerdas múltiparas. Los animales muestreados, en las dos últimas etapas, provenían de explotaciones ubicadas en los estados Zulia, Falcón y Lara.

Unidad de análisis

En las granjas se incluyeron los animales con finalidad reproductiva mayores a seis meses, independiente de su raza, sexo o estado físico. La muestra se obtuvo vía yugular, con el auxilio de agujas 18 G x 1,5cm, previa inmovilización, de pie y colocando al cerdo en posición tal que permitiera tener el cuello recto y estirado. A cada uno se le extrajo entre 4 a 6 mL. La sangre se recolectó en tubos de ensayo que se dejaron en re-

poso a la sombra. Dos horas después fue sometida a centrifugación (Clay Adams, Serofuge 2002, EUA) a 1.500 G, durante 10 minutos. Los sueros se almacenaron bajo congelación a menos 40°C (Revco, Thermo Electron Corporation, EUA) hasta el momento de su procesamiento. A nivel de la sala de beneficio, la sangre se obtuvo en el momento del desangrado, su manejo posterior fue similar a lo anteriormente descrito.

Procesamiento

Fluorescencia polarizada

El diagnóstico mediante FPA se realizó atendiendo las indicaciones del manual de procedimiento de la OIE [29, 36] y las observaciones sobre su aplicabilidad para Venezuela [37]. Para la prueba se empleó como antígeno un fragmento de 22 kD de la porción O del lipopolisacárido (LPS) de *B. abortus* (S1119-3) proveniente de Diachemix® DLL, EUA. Las lecturas se efectuaron mediante un lector portátil de fluorescencia polarizada de tubo (Sentry 100, Diachemix DLL, EUA). La prueba se consideró válida de acuerdo al criterio de verificación del fabricante, al encontrarse que los sueros controles negativos y positivos se mantuvieron dentro de los valores estándares. El resultado se expresó en unidades de milipolarización (mP). A objeto de lograr la expresión máxima de anticuerpos, los sueros con resultado primario superior al estándar fueron sometidos a una segunda prueba de FPA variando la relación suero:conjugado a 2:1 [32, 41].

ELISA competitivo

El ELISA-c utilizado (Svanovir® *Brucella abortus*, Svanova Biotech, Suecia) detecta anticuerpos específicos contra *B. abortus*. La metodología empleada a tal efecto ha sido descrita con anterioridad [10, 22, 35, 37, 38]. La densidad óptica fue medida en un espectrofotómetro modelo Elx 800 de Bio-Tek Instruments®, EUA a 450 nm. La validez de la prueba se estableció según criterios del fabricante, los cuales se cumplieron satisfactoriamente. Posteriormente se calcularon los valores de densidad óptica (DO) para los controles y las muestras, que conllevaron al porcentaje de inhibición (%I) de la siguiente manera:

$$\%I = 100 - \left(\frac{DO \text{ del control o muestra} * 100}{DO \text{ del Control Conjugado}} \right)$$

Análisis estadístico

Las informaciones procedentes de la investigación se organizaron, analizaron y presentaron mediante elementos de estadística descriptiva [7], lo que permitió definir de forma precisa las variables estudiadas. Los datos concernientes se presentaron en TABLAS. La capacidad para discriminar sueros positivos de los negativos fue evaluada usando el análisis de las características operativas del receptor (ROC: Receiver Operating Characteristic) empleando métodos no paramétricos mediante el software Win Episcopo 2,0 [11, 13, 45, 48]. Los valores de corte óptimos y otros parámetros estadísticos se utilizaron para com-

parar las pruebas. El análisis ROC también se utilizó para determinar el área bajo la curva (AUC) mediante el método de Wilcoxon, una medida de precisión [11, 13, 48]. El programa se obtuvo de http://infecepi.unizar.es/ratio/soft_sp.htm. Para evaluar la concordancia entre los kits y el sistema referencial de diagnóstico se utilizó el índice *kappa* [7, 11, 13].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los puntos de corte estimados mediante el análisis ROC fueron de 78,5mP para FPA y 21,4% para ELISA-c, lo que refiere que sobre estos niveles los sueros fueron considerados positivos, FIG 1 y 2. Si bien, estos valores resultan exigentes comparativamente a los descritos en otras indagaciones [10, 23, 25, 29, 32, 37] responden a los factores propios del manejo animal estudiado, al uso de modificaciones del ensayo de FPA que han permitido su optimización [41], y al hecho que los cerdos, pese a ser susceptibles a la infección con *Brucella* spp, su respuesta humoral resulta muy limitada [1, 2, 38].

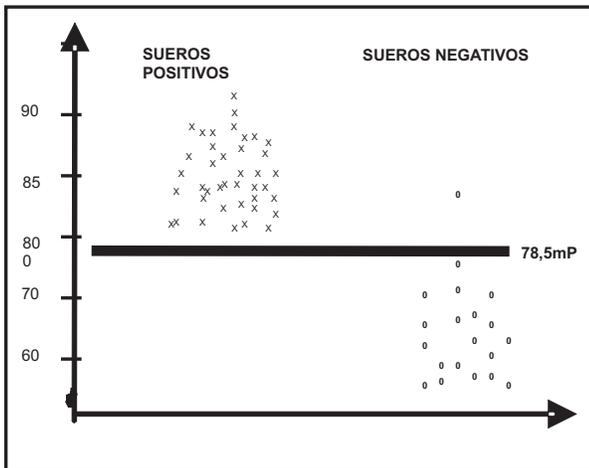


FIGURA 1. DIAGRAMA DE PUNTOS DE LAS UNIDADES DE MILIPOLARIZACIÓN DEL FPA PARA *B. Suis*.

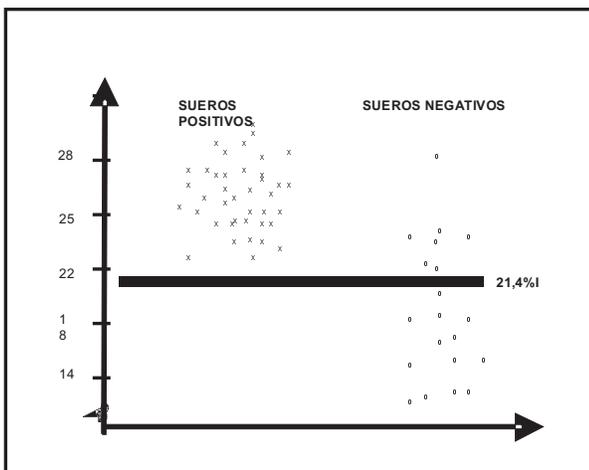


FIGURA 2. DIAGRAMA DE PUNTOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL ELISA-c PARA *B. Suis*.

Estos puntos de corte difieren de manera importante de los hallazgos de Paulo-Silva y col. [38] que calcularon los mismos en 87,7mP y 29%, respectivamente, trabajando con poblaciones de referencia constituidas exclusivamente por sueros positivos a *B. suis* de origen geográfico foráneo [38]. En la actualidad, Argentina ha establecido como punto de corte oficial para FPA en cerdos 84mP [44]. Respecto a ELISA-c también se ha reportado variabilidad en los puntos de corte en distintos países, utilizando para el cálculo el análisis ROC, encontrándose en un rango entre 18 para Costa Rica a 44 en Argentina, Chile en cambio ha asumido 29% [39].

Las técnicas de FPA y ELISA-c lograron segregar adecuadamente los sueros positivos, estimándose una sensibilidad (Se) del 100% (IC_{95%}: 100 - 100%), pero difirieron en cuanto a la clasificación de los negativos, ya que mientras FPA alcanzó una especificidad (Es) de 95% (IC_{95%}: 85,4 - 100,0%), el ELISA-c comercial obtuvo un 65% (IC_{95%}: 44,1 - 85,9%). Así mismo, los valores de predicción positiva fueron 97,6 y 85,1%, respectivamente y el negativo fue del 100% para ambas, TABLA I. El valor del área bajo la curva fue de 97,7% (IC_{95%}: 92,3-100%) para FPA y de 95,2% (IC_{95%}: 89,7-100%) para ELISA-c, FIG. 3a y 3b. La comparación de estos valores de Se y Es con resultados de otros autores debe ser hecho con cautela, pues existen diferencias en cuanto a la composición del complejo que sirvió de referencia y los puntos de corte adoptados.

Los altos valores del área bajo la curva ROC corresponden a una alta exactitud, mostrando la habilidad de las pruebas de unión primaria para discriminar entre sueros positivos y negativos, en relación al conjunto diagnóstico que sirvió de referencia. El área calculada para FPA demuestra que en el 97,7% de los casos, un animal que arroja un resultado por encima del valor de corte se identificó correctamente.

Adicionalmente, de la TABLA I se deduce la excelente capacidad operativa de las pruebas estudiadas (sumatoria de Se y Es) frente al reto que representó la identificación de las muestras con estatus previo conocido. Se identifica una diferencia estadística significativa (P<0,05) a favor de FPA (195,0 vs 165,1). De igual manera, los resultados referentes a los valores de predicción demuestran superioridad en la capacidad diagnóstica de FPA. Esto se corrobora al observar que el grado de correspondencia (índice *kappa*) entre el estatus previo y FPA fue muy buena (0,962), mientras que la concordancia con ELISA-c (0,712) califica como buena [15]. Similarmente, otros autores [23 - 25, 31 - 33, 41] han reportado valores de capacidad diagnóstica alta para FPA y/o para ELISA-c.

La utilización de ambas pruebas en conjunto no parece justificable desde el punto de vista estadístico y menos desde el ángulo económico, ya que por un lado, el uso en paralelo conduciría a un ligero decrecimiento de la capacidad operativa (161,8) por pérdida en la especificidad. En el caso de la interpretación en serie, si bien casi logra perfección diagnóstica (199,7), ello no representa una mejora que justifique la inversión en tiempo y dinero que se requeriría en los laboratorios

TABLA I
RESULTADOS COMPARATIVOS DE ELISA-c Y FPA FRENTE AL RETO DE MUESTRAS
CON ESTATUS PREVIO CONOCIDO PROM (IC_{95%})

Parámetro	FPA (%)	ELISA-c (%)	Paralelo (%)	Serie (%)
Sensibilidad (%)	100 (100,0 -100,0)	100 (100,0 -100,0)	100	100
Especificidad (%)	95,0 (85,4 – 100,0)	65,0 (44,1 – 85,9)	61,8	98,3
V. Predictivo + (%)	97,6 (92,8 – 100,0)	85,1 (74,9 – 95,3)	83,9	99,1
V. Predictivo – (%)	100 (100,0 -100,0)	100 (100,0 -100,0)	100	100
Índice Kappa	0,962 (0,888 – 1,036)	0,712 (0,512 -0,913)		
Capacidad operativa	195,0	165,0	161,8	198,3

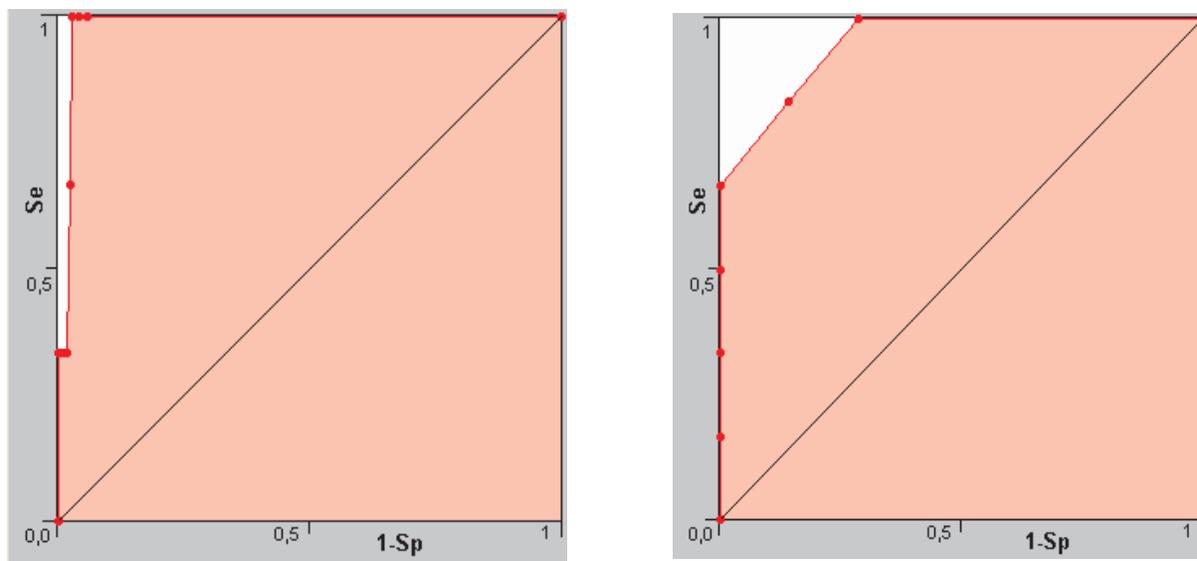


FIGURA 3. ÁREA BAJO LA CURVA (AUC) PARA FPA (FIG. 3a) Y PARA ELISA-c (FIG. 3b).

para someter a todas las muestras problemas a ambas técnicas, más si la capacidad operativa diagnóstica de FPA brinda, por si misma, una excelente posibilidad para el diagnóstico de brucelosis en porcinos (TABLA I).

Cabe resaltar que los valores aquí descritos se derivan de una comparación directa basada en criterios de positividad y negatividad asumidos, los cuales pueden conllevar a demostrar capacidad operativa irreal, dado que las pruebas serológicas que sirvieron de base, no son confiables para el diagnóstico presuntivo de la brucelosis porcina en animales individuales [36]. Las pruebas de aglutinación en placa, como RBT, prescrita por la OIE poseen baja sensibilidad y especificidad [28, 36, 44]. La prueba de 2-ME no está recomendada, ni incluida en manual de la OIE [36]. Los ELISA-i, aunque de sensibilidad y especificidad mayores que las pruebas convencionales, presentan problemas de reacción cruzada con anticuerpos provenientes de infección por otros microorganismos [14, 21, 27, 33]. Pese a que las pruebas seleccionadas como referencial diagnóstico no presentan características de prueba de oro (gold standard), este criterio de inclusión ha sido ampliamente usado en los trabajos de validación [6, 10, 11, 23, 24, 26, 30, 31, 33, 51].

Observando que el problema de reactividad cruzada es general para todos los ensayos convencionales y algunas pruebas de unión primaria, incluyendo ELISA-c, especialmente por la detección de anticuerpos derivados de infecciones por exposición a *Y. enterocolitica* O: 9 [6, 14, 21, 27], en el presente estudio se trató de minimizar esta dificultad con la interpretación en serie de las pruebas, por lo que los sueros positivos constituyen una fuerte evidencia que los anticuerpos detectados se correspondían a anticuerpos específicos inducidos por *Brucella* spp. de campo. Debe entenderse que el efecto de esta tendencia se traduciría en un incremento aparente de los valores de Se y Es. Esto puede explicar, en parte, la razón por la cual la capacidad diagnóstica operativa del ELISA-c, en otros reportes [29, 38, 40], resulta ligeramente superiores a la de FPA.

Estas diferencias pueden deberse también, entre otras ya mencionadas, a que en el presente estudio, la población de referencia usada para el proceso de validación se caracterizó por su escasa homogeneidad [12], con variantes en cofactores como raza, edad y nivel sanitario específicos de los individuos que le conformaron. La Es estimada indicaría la incapacidad del ELISA-c comercial para clasificar adecuadamente un nú-

mero no despreciable de individuos negativos, es decir, generaría una cantidad considerable de falsos positivos que se traduciría en el sacrificio innecesario de porcinos sanos, probablemente debido a una reacción cruzada con *Y. enterocolitica* O: 9, aspecto este no estudiado, pero que ha sido documentado por otros autores [10, 14, 21, 27, 29, 37, 38, 40].

La TABLA II resume los resultados referentes al estudio de los reproductores porcinos donde se identifica una prevalencia de brucelosis cercana al 5%, con mayor ocurrencia en el grupo de hembras reproductoras adultas (madres) que duplica a la de los verracos, aunque posiblemente la primera sea consecuencia de la última, ya que la transmisión durante la monta, a diferencia de la brucelosis bovina (*Bos taurus* – *Bos indicus*), puede ser posible como enfermedad venérea, por lo que el semental juega un importante papel en la epizootiología de la enfermedad como portador [2], otra explicación se deriva del mayor tiempo de permanencia de las múltiparas en las explotaciones. La menor frecuencia en las hembras de reemplazo (núlparas) puede explicarse porque la infección por *B. suis* es mucho más autolimitante que la ocasionada por otras especies de *brucella* y puede ser ocasionalmente eliminada. Así, una proporción significativa de cerdos y cerdas se recuperará de la infección, con frecuencia en unos 6 meses, pero muchos permanecerán infectados de forma permanente [2, 40, 45, 47].

Estos resultados parecen sugerir que la situación actual de la región centro occidental de Venezuela muestra progre-

esos importantes respecto a la presencia de brucelosis, si se toma en cuenta que, para el año 1997 se reportaban tasas entre 19,6 y 52,87% de positivos mediante pruebas en tubo, 2-ME y RBT [14]. La prevalencia descrita resulta inferior a la detallada por Castro y col. en Argentina [4], que refieren positividad entre 8,0 al 21,0% mediante métodos de aglutinación y ELISA-i, pero significativamente superior a los hallazgos mediante RBT y 2-ME de Dajer-Abimerhi [6] en una región de México. Estas datas no permiten mediciones comparativas directas al excluir los ensayos de unión primaria aquí evaluados.

En referencia a la categoría de las granjas, el mayor índice de positividad se presentó en las no tecnificadas, con una razón de desigualdad cruda (unadjusted odds ratios) -calculada en base a los resultados de la TABLA II- de 1,74 veces más posibilidad de encontrar un animal reactor a brucelosis en una granja artesanal que en una tecnificada, pero dicha diferencia no resultó estadísticamente significativa (OR= 1,74; IC95% 0,70 – 4,27; P ≥0,19). En contraste, indagaciones en Perú [8] refieren importante asociación entre brucelosis porcina y bajo uso de tecnologías. Así, la presencia de *Brucella* spp. estaría coligada a sistemas de crianza de escasos o deficientes niveles tecnológicos, donde las condiciones zoonosanitarias son propicias para la transmisión [8]. Las diferencias obedecen, probablemente, a estructuración de los diseños y manejos de las poblaciones participantes.

La TABLA III demuestra que en la sala de beneficio existe presencia de brucelosis en cerdos provenientes de diversas

TABLA II
RESULTADOS BRUCELOSIS (ELISA-c / FPA EN PARALELO) EN GRANJAS: PORCINOS REPRODUCTORES PROVENIENTES DE EXPLOTACIONES CON DIFERENTES GRADOS DE TECNOLOGÍA

Categoría (granjas)	Población	Reproductores en granjas			Positivos		
		Muestras	Positivos	%	Verracos	H. Vírgenes	Madres
Artesanales No Tecnificadas (10)	251	152 (60,5%)	10	6,6	1	1	8
Tecnificadas (10)	568	359 (63,2%)	14	3,9	0	0	14
Total	819	511 (62,4%)	24	4,7	1/37 2,7%	1/79 1,3%	22/395 5,6%
Composición de la muestra					7,2%	15,5%	77,3%

TABLA III
RESULTADOS BRUCELOSIS (FPA) EN SALA DE BENEFICIO: PORCINOS PROVENIENTES DE GRANJAS CON DIFERENTE GRADO DE TECNOLOGÍA

Categoría (granjas)	Matanza	Sala de beneficio				Positivos	
		Muestreo	Positivos	♂ Castrados	♂ Enteros	H. Vírgenes	Madres
Artesanales no tecnificadas (18)	541	122 22,6%	7 (5,7%)	2	1	3	1
Tecnificadas (12)	1190	182 15,3%	16 (8,8%)	7	1	8	0
Total	1731	304 17,6%	23 (7,6%)	9/135 6,7%	2/24 8,3%	11/131 8,4%	1/14 7,1%
Composición de la muestra				40,4%	5,8%	51,9%	1,9%

granjas de la región centro occidental de Venezuela con una tasa general de positividad del 7,6%. Cabe destacar que se observaron diferencias estadísticas entre las categorías de las granjas ($P < 0,05$), revelando una mayor presencia en cerdos provenientes de explotaciones tecnificadas. Si bien, las razones de tal resultado no fueron exploradas durante el estudio, otros investigadores [8, 42, 46] han sugerido que la vigilancia de esta enfermedad es más continua y eficiente a nivel de granjas tecnificadas que en las granjas artesanales, lo que se traduce en una especulación incierta apenas razonable como explicación pausable para este caso.

También se evidencia diferencia ($P < 0,05$) en cuanto a la clasificación de los grupos investigados, destacando mayor frecuencia de la enfermedad en porcinos machos castrados y hembras núlparas, pero ante la ausencia de protocolos oficiales de diagnóstico previo al sacrificio, no es posible establecer inferencias a cerca de su estatus sanitario y correspondencia con la vigilancia epidemiológica de la enfermedad. Por lo que las razones de dichas diferencias son desconocidas y requieren de nuevas investigaciones.

El hallazgo de animales con serología positiva alerta sobre el riesgo potencial de infección para el hombre en contacto con ellos y sugiere la necesidad de aplicar medidas preventivas y normativas para el control de esta enfermedad en los cerdos, con inclusión de las pruebas de unión primaria como base para el diagnóstico en la reglamentación vigente [9]. Deben extenderse estos estudios serológicos a otras zonas de Venezuela donde se desarrollan planes de crianza de cerdos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados de este reporte demuestran la idoneidad operacional de los ensayos de FPA y ELISA-c en la detección de brucelosis en los porcinos, especialmente si son usadas en serie, lo cual podría permitir predecir de modo preciso el estado de infección con un alto grado de fiabilidad estadística. Los puntos de corte calculados (78,5 mP y 21%I, respectivamente) podrán utilizarse como referencia para programas de control y erradicación en Venezuela.

Se demuestra la presencia de infección por *Brucella* spp. en porcinos de diversas condiciones reproductivas y en granjas con diferentes grados de tecnologías. Igualmente se demuestra su ocurrencia a nivel de salas de beneficio.

Se hace un llamado a la implementación de programas de vigilancia epidemiológica y reestructuración del programa nacional de control y erradicación de brucelosis permitiendo la inclusión de estas valiosas herramientas diagnósticas.

AGRADECIMIENTO

Los resultados mostrados derivan de los trabajos del Sistema de Vigilancia Epidemiológica para brucelosis, y han

sido posibles gracias al cofinanciado de la Comisión de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad del Zulia (CONDES-LUZ). Especial agradecimiento a las empresas Daniel Boscoboinik de Argentina y Diachemix de EUA por el apoyo brindado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARESTEGUI, M.B.; GUALTIERI, C.A.; TORIONI, E.S.; AGUIRRE, N.; DELGADO, G.; PERALTA, L.; BESSO, R.; GENTILE, N.; SCHAROVSKY, O.G. IgG isotypes ratio and reproductive performance in sows naturally infected with *Brucella suis*. **Vet. Immunol. and Immunop.** 128 (1-3):239-240. 2009.
- [2] BARDENSTEIN, S.; STRADA, V.; BANAI, M. *Brucella*: A fastidious bacteria but a virulent pathogen. **The Vet. J.** 184 (2):126-127. 2010.
- [3] CANDELO, N.; VALLE, A.; MARCANO, M.; MELÉNDEZ, G. Efecto de la vacuna *anti-Brucella* Cepa RB51 en cerdas preñadas. **Vet. Trop.** 27(1): 17-24. 2002.
- [4] CASTRO, H.A.; GONZÁLEZ, S.R.; PRAT, M.I.; BALDI, P.C. Detección de anticuerpos anti-*Brucella* spp en cerdos mediante técnicas de aglutinación y ELISA indirecto en las provincias de Buenos Aires y La Pampa, Argentina. **Rev. Arg. de Microbiol.** 38:75-78. 2006.
- [5] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Brucella suis* infection associated with feral swine hunting - three states, 2007-2008. **Morb. Mortal. Wkly Rep.** 58(22):618-21. 2009.
- [6] DÁJER-ABIMERHI, A.; GUTIÉRREZ-RUIZ, E.; ZAPATA-VILLALOBOS, D. Estudio serológico de Brucelosis Porcina en el estado de Yucatán, México. **Rev. Bioméd.** 5 (2):84-87. 1994.
- [7] DANIELS, WW. Estadística descriptiva, Análisis de regresión y Estadística no paramétrica. **Bioestadística: Bases para el análisis de las ciencias de la salud.** Limusa Wiley Editores. 4ta Ed. México. Pp15-39, 519-552 y 660-669. 2010.
- [8] FARRO, R.D.; FALCÓN, P.N.; MANCHEGO, A.; RIVERA, H. Frecuencia de *Brucella* spp. en porcinos procedentes de granjas tecnificadas y no tecnificadas beneficiados en dos mataderos de Lima. **Rev. Inv. Vet. Perú.** 13 (2):72-77. 2002.
- [9] 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. Pp 1-8. 2003.
- [10] GALL, D.; COLLING, A.; MARINO, O.; MORENO, E.; NIELSEN, K.; PÉREZ, B.; SAMARTINO, L. Enzyme Immunoassays for Serological Diagnosis of Bovine Brucel-

- losis: A Trial in Latin America. **Clin. and Diagn. Laborat. Immunol.** 5(5):654-661. 1998.
- [11] GARDNER, I.A.; GREINER, M. Receiver-operating characteristic curves and likelihood ratios: improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. **Vet. Clin. Pathol.** 35 (1):8-17. 2006.
- [12] GODFROID, J.; SAEGERMAN, C.; WELLEMANS, V. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when inespecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. **Vet. Microb.** 90 (1-4):461-477. 2002.
- [13] JACOBSON, R.H. Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, OIE, France. Pp 8- 15. 1996.
- [14] JUNGENSEN, G.; SØRENSEN, V.; GIESE, S.B.; STACK, J.A.; RIBER, U. Differentiation between serological responses to *Brucella suis* and *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 after natural or experimental infection in pigs. **Epidemiol. Infect.** 134(2):347-57. 2006.
- [15] LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biomet.** 33:159-174. 1977.
- [16] LORD, V.R.; FLORES, R. *Brucella* spp. from the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Venezuela: serologic studies and metabolic characterization of isolates. **J. Wildl. Dis.** 19 (4):308-314. 1983.
- [17] LORD, V.R.; LORD, R.D. *Brucella suis* infections in collared peccaries in Venezuela. **J. Wildl. Dis.** 27(3):477-81. 1991.
- [18] LORD, V.R.; CHERWONOGRODZKY, J.W.; MARCANO, M.J.; MELÉNDEZ, G. Serological and bacteriological study of swine brucellosis. **J. Clin. Microbiol.** 35: 295-297. 1997.
- [19] LORD, V.R.; CHERWONOGRODZKY, J.W.; SCHURIG, G.G.; LORD, R.; MARCANO, M.; MELÉNDEZ, G. Venezuelan field trials of vaccines against brucellosis in swine. **Am. J. Vet. Res.** 59(5):546-552. 1998.
- [20] LUCERO, N.E.; AYALA, S.M.; ESCOBAR, G.I.; JACOB, N.R. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. **Epidemiol. Infect.** 136(4): 496-503. 2008.
- [21] MAINAR-JAIME, R.C.; MUÑOZ, P.M.; DE MIGUEL, M.J.; GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; MORRIÓN, I.; BLASCO, J.M. Specificity dependence between serological tests for diagnosing bovine brucellosis in Brucella-free farms showing false positive serological reactions due to *Yersinia enterocolitica* O:9. **Can. Vet. J.** 46(10): 913-6. 2005.
- [22] MALDONADO, J.; KOWALSKI, A.; MILLA, M.; RODRÍGUEZ, M.; VILLASMIL, C. Implementación de la prueba del anillo en leche y Elisa indirecta para el diagnóstico de brucellosis en rebaños doble propósito del estado Lara, Venezuela. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XX (3):240-244. 2010.
- [23] 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.
- [24] MCGIVEN, J.A.; SAWYER, J.; PERRETT, LL.; BREW, S.D.; COMMANDER, N.J.; FISHER, A.; MCLARNON, S.; HARPER, K.; STACK, J.A. A new homogeneous assay for high throughput serological diagnosis of brucellosis in ruminants. **J. of Immunol. Meth.** 337 (1) :7-15. 2008.
- [25] MONTAGNARO, S.; LONGO, M.; MALLARDO, K.; PISANELLI, G.; DE MARTINO, L.; FUSCO, G.; BALDI, L.; PAGNINI, U.; IOVANE, G. Evaluation of a fluorescence polarization assay for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in water buffalo (*Bubalus bubalis*) **Vet. Immunol. and Immunop.** 125 (1-2):135-142. 2008.
- [26] MUMA, J.B.; TOFT, N.; OLOYA, J.; LUND, A.; NIELSEN, K.; SAMUI, K.; SKJERVE, E. Evaluation of three serological tests for brucellosis in naturally infected cattle using latent class analysis. **Vet. Microb.** 125 (1-2):187-192. 2007.
- [27] NIELSEN, K. The serological response of cattle immunized with *Yersinia enterocolitica* O:9 or O:16 to *Yersinia* and *Brucella abortus* antigens in enzyme immunoassays. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 24:373-382. 1990.
- [28] NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Vet. Microb.** 90 (1-4):447-45. 2002.
- [29] NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; VIGLIOCCO, A.; PÉREZ, B.; SAMARTINO, L.; NICOLETTI, P.; DAJER, A.; ELZER, P.; ENRIGHT F. Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. **Vet. Microb.** 68 (3-4) :245-253. 1999.
- [30] NIELSEN, K.; KELLY, L.; GALL, D.; BALSEVICIUS, S.; NICOLETTI, P.; KELLY, W. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 48 :285-291. 1995.
- [31] NIELSEN, K.; GALL, D.; JOLLEY, M.; LEISHMAN, G.; BALSEVICIUS, S.; SMITH, P.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. A homologous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. **J. Immunol. Meth.** 195 :161-168. 1996.
- [32] NIELSEN, K.; GALL, D.; LIN, M.; MASSANGILL, C.; SAMARTINO, L.; PÉREZ, B.; COATS, M.; HENAGER, S.; DAJER, A.; NICOLETTI, P.; THOMAS F. Diagnosis of

- bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 66: 321-329. 1998.
- [33] NIELSEN, K; GALL, D. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. **J. Immunoassay Immunochem.** 22(3):183-201. 2001.
- [34] 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.
- [35] NIELSEN, K.; SMITH, P.; YU, W.; ELMGREN, C.; HALBERT, G.; NICOLETTI, P.; PÉREZ, B.; CONDE, S.; SAMARTINO, L.; NICOLA, A.; BERMÚDEZ, R.; RENTERIA, T. Validation of a second generation competitive enzyme immunoassay (CELISA) for the diagnosis of brucellosis in various species of domestic animals. **Vet. Immunol. and Immunopathol.** 125 (3-4): 246-250. 2008.
- [36] OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Porcine brucellosis. OIE Terrestrial Manual. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Paris. Pp 1108-1114. 2009.
- [37] POLANCO, J.E.; COMACH, G. Aplicación de las técnicas ELISA y Dot- ELISA en el diagnóstico de brucelosis porcina. **Vet. Trop.** 21(1): 85-102. 1996.
- [38] PAULO-SILVA, A.M.; VIGLIOCCO, A.; RAMONDINO, R.F.; MARTICORENA, D.; BISSI, E.; BRIONES, G.; GORCHS, C.; GALL, D.; NIELSEN, K. Evaluation of primary binding assays for presumptive serodiagnosis of swine brucellosis in Argentina. **Clin Diagn Lab Immunol.** 7(5):828-31. 2000.
- [39] RIVERA, A.; PÉREZ, B.; ROJAS, X.; VILLARROEL, M. Seguimiento de la validación de un ELISA de competencia con antígeno sLPS para el diagnóstico de brucelosis bovina en el sur de Chile. **Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics.** Viña del Mar, 19-23 August. Pp 1-4. 2003.
- [40] ROGERS, R.J.; COOK, D.R.; KETTERER, P.J.; BALDOCK, F.C.; BLACKALL, P.J.; STEWART, R.W. An evaluation of three serological tests for antibody to *Brucella suis* in pigs. **Austral. Vet. J.** 66 :77-80. 1989.
- [41] SÁNCHEZ, V.A.; PINO, R.D.; BECERRA, R.L.; GUTIÉRREZ, J.C.; BOSCÁN, O.J.; GARCÍA, B.D.; MOLERO, S.G. Validación de la prueba fluorescencia polarizada en el diagnóstico de brucelosis y comparación con otras pruebas bajo condiciones naturales de infección en Venezuela. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XVII (Supl. 1):497-498. 2008.
- [42] SÁNCHEZ, V.A.; VILLARROEL, R.; OVIEDO, A.; SANDREA, G.; BOSCÁN, J.; PINTO, R.; PIRELA, F.; BECERRA, L.; LÓPEZ, E. Monitoreo epidemiológico para *Brucella abortus* en fincas doble propósito del municipio Machiques de Perijá, Venezuela: prevalencia, riesgo y efecto de un programa de control. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XIX (4):325-333. 2009.
- [43] SÁNCHEZ, V.A.; VILLARROEL, R.; OVIEDO, A.; SANDREA, G.; BOSCÁN, J.; PINTO, R.; PIRELA, F.; BECERRA, L.; LÓPEZ, E. Monitoreo epidemiológico para *Brucella abortus* en fincas doble propósito del municipio Machiques de Perijá, Venezuela. Parte II: validez y seguridad de las pruebas de anillo de la leche y rosa de bengala. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XIX (5):466-474. 2009.
- [44] SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD y CALIDAD AGROALIMENTARIA ANIMAL (SENASA). Manual de diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. Versión 3.0/2009. Publicaciones SENASA. Pp 1-95. 2010.
- [45] SOLORIO-RIVERA, J.L.; SEGURA-CORREA, J.C.; SÁNCHEZ-GIL, L.G. Incidencia de seroconversión a *Brucella abortus* en hatos lecheros de Michoacán, México. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XX (6):584-589. 2010.
- [46] STOFFREGEN, W.C.; OLSEN, S.C.; WHEELER, C.J.; BRICKER, B.J.; PALMER, M.V.; JENSEN, A.E.; HALLING, S.M.; ALT, D.P. Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. **J. Vet. Diagn. Invest.** 19(3):227-237. 2007.
- [47] THIRLWALL, R.E.; COMMANDER, N.J.; BREW, S.D.; CUTLER, S.J.; MCGIVEN, J.A.; STACK, J.A. Improving the specificity of immunodiagnosis for porcine brucellosis. **Vet. Res. Commun.** 32(3):209-213. 2008.
- [48] THRUSFIELD, M.; ORTEGA, C.; DE BLAS, I.; NOORDHUIZEN, J.P.; FRANKENA, K. Win Episcope 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. **Vet. Rec.** 148 (18):567-572. 2001.
- [49] UTRERA, V. La producción de cerdos en Venezuela. ¿Estamos listos para MERCOSUR? **Memorias. VIII Congreso Feporcina.** Choróni. Septiembre, 26. Venezuela. Pp 1-12. 2006.
- [50] VARGAS, F. Brucellosis in Venezuela. **Vet Microbiol.** 90 (1-4):39-44. 2002.
- [51] WRIGHT, P.F.; NILSSON, E.; VAN ROODIJ, M.; LETENTA, M.; JEGGO, M. Standardization and validation of enzyme linked immunosorbent assay techniques for detection of antibody in infectious diagnosis. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.** 12: 435-450. 1993.