

PREVALENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA MEDIANTE ELISA COMPETITIVO EN EL MUNICIPIO LA CAÑADA DE URDANETA, ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Prevalence of Bovine Brucellosis Using the Competitive ELISA Test in La Cañada de Urdaneta Municipality, Zulia State, Venezuela

Gerardo D'Pool¹, Sergio Rivera Pirela¹, Teresita Torres², Mario Pérez¹, Arelis García¹, Osiris Castejón¹ y Nelda Rojas²

¹Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias. ²Servicio Autónomo de Sanidad Animal (SASA), Zulia, Venezuela. Telefax: 0261-7596132

RESUMEN

Se realizó una investigación seroepidemiológica en todos los sectores (1 al 10) del municipio La Cañada de Urdaneta del estado Zulia en 1999 con el objetivo de medir, la prevalencia de brucelosis bovina y evaluar los factores de riesgo que favorecen la presencia de la infección. De un total de 387 rebaños bovinos con una población de 47.421 hembras mayores de 24 meses de edad, se analizaron 384 muestras, con el uso de la técnica de ELISA Competitivo en fase sólida (C-ELISA), obteniéndose como resultado una seroprevalencia de 20,3% para rebaños y 9,1% por animal. En lo que se refiere a factores de riesgo, se determinó la existencia de una asociación estadística causal débil ($P < 0,025$) entre: el tipo de explotación, la asistencia veterinaria y su frecuencia, el manejo reproductivo y el manejo de becerras procedentes de vacas positivas relacionado con la presencia de la infección.

Palabras clave: Brucelosis bovina, prevalencia; C-ELISA, Venezuela.

ABSTRACT

A seroepidemiological study was made in all of the sectors (1 to 10) of La Cañada de Urdaneta municipality of Zulia state in 1999 with the purpose of determining the prevalence of bovine brucellosis and evaluating the risk factors which promote the presence of the disease. A random stratified proportional sampling methodology was applied, including 387 herds with a population of 47,421 females over 24 months of age; 384 samples from 143 selected herds were evaluated using a competitive ELISA test in the solid phase (C-ELISA), determining a seroprevalence of 20.3% for herds and 9.1% per animal. In reference to risk factors, a statistical association ($P < 0.025$) be-

tween the type of farm, the veterinary attendance and the frequency, the reproductive handling and the heifer calf handling procedures were determined with positive cows related to the presence of brucella infection.

Key words: Bovine brucellosis, prevalence, C-ELISA, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis bovina es una enfermedad de amplia distribución geográfica en la mayoría de los países del mundo. Sin embargo, la prevalencia más alta se registra en los países en vía de desarrollo. La infección tiene su origen en la población animal siendo el aborto una de las consecuencias de la enfermedad, el cual se produce a mitad de gestación, aunque puede provocar el nacimiento de crías débiles, prematuras o de terneros muertos, así como orquitis e infecciones de las glándulas sexuales accesorias en machos [14]. La enfermedad es conocida bajo diferentes sinónimos: Enfermedad de Bang, aborto contagioso, aborto infeccioso y aborto epizoótico. Como enfermedad zoonótica, clínicamente en el hombre la brucelosis es conocida como fiebre ondulante, fiebre de Malta, fiebre recurrente [6, 20]. El reservorio de la infección humana lo constituyen, el bovino, porcino, caprino, ovino y canino; y la transmisión de la enfermedad ocurre por contacto directo con tejidos, sangre, orina, fetos abortados y en especial, placenta y membranas fetales de animales infectados, así como también, por ingestión de leche cruda y productos lácteos no pasteurizados, y en menor número de casos por la inoculación accidental con vacuna anti-*Brucella* [20].

La transmisión de la enfermedad en los animales ocurre por la ingestión de aguas y pastos contaminados con secreciones y membranas fetales y fetos abortados de vacas infectadas, por contacto directo mediante la inseminación artificial con semen infectado, igualmente las vacas gestantes pueden

transmitir la infección a su cría en el útero dando origen a la infección congénita [2].

Como célula bacteriana, la *Brucella* puede ser dividida en varias fracciones, todas mayoritariamente antigénicas, en donde la fracción lipopolisacárido (LPS), que forma parte de la pared celular, es el principal elemento antigénico activo que a su vez es usado para diferenciar las cepas de *Brucellas* lisas de las rugosas [11] y el que produce la actividad biológica característica de las endotoxinas. El LPS está compuesto por un oligosacárido unido a un lípido A (el cual es parte de la membrana celular) y a una proteína (antígeno M). El oligosacárido tiene dos regiones distintas, un centro de polisacárido y un polisacárido de antígeno "O", el LPS es una molécula que se encuentra expuesta hacia el exterior de la membrana externa, orientación que facilita la inducción de anticuerpos dirigidos contra el antígeno "O", que es de gran valor en el diagnóstico de la brucelosis y en la identificación serológica de las especies de *Brucella*. Además es inmunodominante, porque la mayor parte de los anticuerpos en la respuesta humoral están dirigidos hacia este antígeno [5, 12].

Después de la infección o posterior a una vacunación con cepa 19 se produce la activación de la respuesta inmune humoral que conlleva a la maduración de las células B plasmáticas productoras de anticuerpo contra el LPS. La célula B ya madura comienza a secretar primeramente IgM específica del antígeno, lo que da un aumento en la producción de esta inmunoglobulina que se manifiesta en la curva de respuesta primaria con un pico a los 13 días posterior a la exposición para luego declinar progresivamente. Después de unos días de penetración de la *Brucella* en el organismo, ocurre un proceso de conmutación por lo que estas células B comienzan a producir anticuerpos del tipo IgG específica del antígeno, los cuales se pueden ver en la curva de respuesta humoral como un aumento posterior a la IgM (28 a 42 días) y que persiste en el caso de ser debido a infecciones o declinan rápidamente en el caso de ser inducidos por vacunación con cepa 19. También se producen células B de memoria que responden a una segunda exposición en forma más rápida con la producción de una concentración alta de IgG y en menor cuantía de IgA y IgE, esto es lo que se conoce como respuesta humoral secundaria [21].

Existen variables epidemiológicas que condicionan el comportamiento de la brucelosis en la población bovina, entre las que se pueden citar: El tipo de explotación, el tipo de alimentación, movilización controlada de los rebaños, asistencia veterinaria, los programas reproductivos y programas sanitarios, el seguimiento de hijas de madres positivas y la realización de vacunaciones periódicas [2, 24].

Posterior a la vacunación de las becerras con cepa 19, a una edad comprendida entre 3 y 8 meses de edad reglamentaria de vacunación en Venezuela [15] se produce una respuesta primaria con una producción mayor de IgM que disminuye a los 20 meses de edad. Si las mismas son expuestas a las cepas de campo, desarrollan una respuesta secundaria con pre-

dominio de IgG y muy baja cantidad de IgM. Pero cuando la vacunación con cepa 19 se realiza más allá de los 8 meses de edad se pueden encontrar niveles tanto de IgM como de IgG que interfieren con los resultados de las pruebas serológicas trayendo como consecuencia fallas en la interpretación.

En Venezuela, según el Reglamento de Lucha contra la brucelosis bovina en su artículo 10 de la Ley de Sanidad Animal del año 1974, designa a la Prueba Rápida en Placa como prueba diagnóstica oficial y como pruebas complementarias, la técnica de aglutinación lenta en tubo, Rosa de Bengala, Fijación de Complemento, ELISA y Mercapto Etanol [1, 15, 28]. Con la utilización de estas pruebas, se ejecutan estudios que se aplicarían a un grupo de población para la identificación presuntiva de la enfermedad. Dentro de estos estudios se engloban los llamados Estudios de Prevalencia [9, 32, 33].

La prueba de ELISA o inmunoensayo enzimático es capaz de medir anticuerpos clase IgG1, aunque éstos se encuentren en muy bajos niveles en el suero y no sean perceptibles por otras pruebas. En el caso de la brucelosis bovina, la técnica se ha desarrollado y utilizado con bastante éxito debido a su alta sensibilidad y especificidad, particularmente la ELISA competitiva (ELISA-C), que posee una alta especificidad para diferenciar anticuerpos vacunales de los producidos por la infección natural dado que utiliza el anticuerpo monoclonal M-84 específico para la cadena "O" del polisacárido [33].

En otra investigación realizada en la Patagonia Argentina, muestras de sueros provenientes de vacas mayores de 2 años (24 meses) fueron examinadas con ELISA-C; 235 resultaron serológicamente negativas, 501 eran sueros serológicamente negativos de vacas vacunadas con vacuna cepa 19 entre los 3 a 8 meses de edad y 186 muestras de suero eran de vacas positivas. En las pruebas Rosa de Bengala y en placa del Antígeno Buferado, la especificidad de ELISA-C fue de 99,6% para las vacas negativas no vacunadas y 99,4% para las vacas negativas vacunadas y la sensibilidad de los animales positivos fue de 100%. Esto concluye que el ELISA-C es una herramienta útil para la determinación de animales vacunados infectados [30].

González (citado por Vargas) [31] señaló, según reportes del Servicio Autónomo Sanidad Agropecuaria (SASA) que el índice de positividad para brucelosis en el país era de 0,8 y 1,2% entre los años 1990 y 1998 respectivamente, de acuerdo a lo reportado por la prueba de seroaglutinación rápida en placa. De igual manera, el Departamento de Sanidad Animal del SASA-ZULIA, según los resultados reportados por esta misma prueba, señala que para 1999, el porcentaje de seropositividad por rebaño fue de 0,58 para la Región Zuliana, y para el municipio La Cañada de Urdaneta de 0,20% [16].

El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de la brucelosis bovina en el mencionado municipio de la Cañada de Urdaneta del estado Zulia, utilizando la técnica de C-ELISA, su comparación con los resultados de la prueba Rápida en Placa y la evaluación de posibles factores de riesgo asociados a la infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación geográfica

La presente investigación se realizó en el municipio La Cañada de Urdaneta del estado Zulia, Venezuela, ubicado en la margen occidental del Lago de Maracaibo. Tiene una superficie de 2.040 km², lo que representa el 4,05% del territorio regional, y sus límites son: al norte, con los municipios Jesús Enrique Lossada y San Francisco; al sur, con el municipio Rosario de Perijá y el Lago de Maracaibo; al este, con el Lago de Maracaibo; y al oeste, con el municipio Rosario de Perijá [7].

Dentro de sus principales características se destaca la calidez de su clima, cuya temperatura promedio anual se encuentra entre 28° y 29°C. Su vegetación comprende pastos establecidos con dos zonas de vida como son el bosque muy seco tropical y el bosque seco tropical. La evaporación es de 2 a 4 veces superior a la precipitación en la zona de bosques muy secos tropical, mientras que en la zona de bosque seco tropical es de 0,9 a 2 veces la precipitación [7].

Las oportunidades comerciales para este Municipio están representadas por la explotación ganadera y avícola con tendencia a la industrialización, que sumado a su privilegiada posición geográfica, le permite comercializar sus productos con el resto del Estado y de Venezuela [7].

Tipo y diseño de investigación

La presente investigación corresponde a un estudio epidemiológico transversal y causal dado que, en una primera oportunidad se determina la prevalencia de la enfermedad en un momento establecido y luego se analiza la presencia de la infección con diversos factores de riesgo y sin la manipulación de las variables estudiadas [10].

Instrumentos

Para la recolección de la información se elaboró una encuesta epidemiológica a través de la cual se recogieron datos generales de los fundos, así como lo relacionado con el manejo sanitario y reproductivo del rebaño. Se utilizó además, el protocolo del Laboratorio Regional de Diagnóstico del SASA-Zulia para registrar los resultados de los diagnósticos serológico.

Población y muestra

La población de referencia estuvo conformada por 47.421 hembras bovinas mayores de 24 meses de edad existentes en 327 fundos que conforman los 10 sectores agrícolas del municipio La Cañada de Urdaneta.

El tamaño de la muestra se estimó considerando desconocida la prevalencia poblacional [13, 25], y para garantizar que la misma fuera representativa de la población de referencia, se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 \alpha / 2}{4 (e)^2}$$

donde:

n = Tamaño de la muestra.

Z = 1,96 (Valor para el 95% de confianza)

e = Error máximo permisible = 0,05

α = Nivel de significación = 0,05

Bajo estas condiciones, la muestra quedó conformada por 384 animales procedentes de 143 fundos.

Muestreo

Se utilizó un muestreo estratificado proporcional en función al total de hembras bovinas existentes en cada sector y la selección de los animales, se hizo en forma sistemática en aquellos fundos con más de 5 animales de iguales características a la población de referencia.

En la TABLA I se presenta el número de fundos, la población bovina existente en cada sector y el número de unidades elementales que participaron en el estudio.

Pruebas Serológicas

A cada animal seleccionado se le extrajo 10 ml de sangre. Posteriormente esta muestra fue transportada al Laboratorio Regional de Diagnóstico del SASA Zulia del Ministerio de Producción y Comercio (MPC), donde se centrifugó a 3.500 rpm para la obtención del suero y su inmediata conservación a -20°C, hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Zulia.

TABLA I
FUNDOS, POBLACIÓN BOVINA EXISTENTE Y TAMAÑO DE LA MUESTRA SEGÚN SECTORES. MUNICIPIO LA CAÑADA DE URDANETA. ESTADO ZULIA. 1999

Sectores	Fundos Existentes	Población Bovina N	Unidades Elementales n
1	16	1.237	10
2	20	976	8
3	28	2.522	20
4	48	17.343	140
5	58	9.536	77
6	48	6.536	53
7	15	792	7
8	32	5.402	44
9	35	2.565	21
10	27	507	4
Total	327	47.421	384

La prueba rápida en placa, fue utilizada por ser la prueba oficial para el diagnóstico de brucelosis en nuestro país. Esta es una prueba de aglutinación que al igual que la prueba lenta en tubo, mide principalmente anticuerpos clase IgM contra el antígeno O del LPS de la bacteria. El procedimiento de la prueba se llevó a cabo según lo señalado en el boletín técnico de la FAO/WHO, 1972 citado por Casas [4]. Se consideraron como reacciones sospechosas las aglutinaciones incompletas a partir de la dilución 1/50 y como positivas las aglutinaciones completas a partir de una dilución 1/100.

La prueba de ELISA empleada fue el Inmuno-ensayo enzimático Competitivo en fase sólida (ELISA-C) que está diseñado para detectar anticuerpos específicos contra brucelosis en muestras de sueros de diferentes especies animales. El procedimiento de la prueba tiene su basamento en que las muestras de suero son expuestas a un antígeno lipopolisacárido de *Brucella abortus* lisa (S-LPS) unido al fondo de los pozos de una microplaca de poliestireno, conjuntamente con la adición de un anticuerpo monoclonal de ratón específico para un epítotope sobre una porción del polisacárido o del antígeno S-LPS (SVANOVA BIOTECH, Uppsala, Suecia).

La interpretación diagnóstica se realizó tomando en cuenta los criterios establecidos por el fabricante LPS (SVANOVA BIOTECH, Uppsala, Suecia), al respecto se diagnosticó como positivas aquellas muestras con un porcentaje de inhibición mayor del 30%, y negativas cuando el mismo fuera menor del 30%.

A todos los animales positivos en RP y C-ELISA se les practicaron pruebas confirmatorias Lenta en tubo y 2 Mercapto Etanol realizadas según los parámetros establecidos en el boletín técnico de la FAO/WHO, 1972 citado por Casas [4].

Para la determinar la sensibilidad y la especificidad se utilizaron las fórmulas siguientes [9]:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Positivas verdaderas}}{\text{Positivas verdaderas} + \text{negativas falsas}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Negativas verdaderas}}{\text{Negativas verdaderas} + \text{positivas falsas}} \times 100$$

Determinación de la prevalencia y factores de riesgo

En la presente investigación, la prevalencia de la enfermedad se determinó de acuerdo al número de animales y rebaños seropositivos en los diferentes sectores que conforman el municipio La Cañada de Urdaneta. Se estableció una relación entre la presencia de la infección con los siguientes factores de riesgos:

- Tipo de explotación pecuaria: Se categorizaron como explotaciones lecheras aquellas destinadas exclusivamente a la producción láctea, y como doble propósito aquellas que se dedican a la producción de leche y carne.

- Tipo de alimentación: Este se caracterizó en pastoreo exclusivo, cuando los rebaños son alimentados exclusivamente con el pasto existente en los potreros, y como pastoreo y suplementación, cuando además del pasto se suministra otro tipo de alimento para complementar la ración.
- Asistencia veterinaria: Se refiere a la prestación de servicios por parte de profesionales de la Medicina Veterinaria y la frecuencia del servicio. Esta se categorizó en permanente cuando la asistencia es continua, y eventual cuando es solicitada con un fin específico y en situaciones de emergencia.
- Estado inmunitario: Es el grado de inmunidad que presentan los animales para el momento en que se realizó el estudio, y estuvo medido por las vacunaciones anti-brucélicas realizadas, fundamentadas éstas por las respuestas afirmativas o negativas concerniente a su realización.
- Ingreso de Animales y Requisito de Ingreso: Este fue analizado en función a las respuestas afirmativas y negativas sobre la exigencia o no de certificados de vacunación y realización reciente de las pruebas serológicas a los animales que se incorporan al rebaño.
- Manejo reproductivo: Se categorizó en inseminación artificial, monta controlada y monta no controlada.
- Manejo de becerras de vacas positivas: Infiere al destino que se les da, categorizados en: permanencia en el rebaño con separación y permanencia en el rebaño sin separación.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La metodología estadística que se siguió es la citada por Evans y Albornoz [9]. En aquellos casos en que se evidenció significancia estadística entre un factor de riesgo y la presencia de la infección se determinó la Razón de Desigualdades (Rd). Asimismo, se empleó la prueba Z para diferencia de proporciones. Se procesaron los datos en el programa STATISTIX versión 1,0 para Windows 95. El ANOVA se utilizó para comparar los resultados obtenidos por las técnicas RP y C-ELISA. Para el Rd se tomaron como asociación los resultados iguales o superiores a "1". La "P" se consideró significativa cuando los resultados de las pruebas estadísticas arrojaron un valor inferior o igual a 0,025 con un nivel de confianza de 95%.

RESULTADOS

El uso de la técnica de ELISA Competitivo (ELISA-C) permitió, para el municipio La Cañada de Urdaneta, determinar

la prevalencia de brucelosis en hembras bovinas y mayores de 24 meses de edad, en un 20,3% (TABLA II).

En la misma TABLA se presenta la prevalencia para cada uno de los sectores que conforman el área de estudio, destacándose que los sectores 3, 4 y 5, refieren la tasa más alta.

En lo que respecta a la prevalencia por animal, esta se determinó en 9,1% para el Municipio. Este resultado y los correspondientes a cada sector se observan en la TABLA III.

Los resultados inherentes a la asociación entre los factores de riesgos analizados en este estudio y la presencia de la infección se muestran en la TABLA IV. En este sentido, se determinó una asociación entre el tipo de explotación, la asistencia veterinaria y su frecuencia, el manejo reproductivo, el manejo de las becerras de vacas positivas y el estado inmunitario. En la misma TABLA se presentan los resultados correspondientes al Rd, los cuales indican una asociación causal pero débil entre dichos factores de riesgos y la presencia de la infección. Se determinó también la ausencia de asociación causal con el tipo de alimentación, ingreso de animales y requisitos de ingresos. Estos hallazgos se aprecian en la misma TABLA.

Con la finalidad de analizar el manejo sanitario de los rebaños con respecto a la realización de pruebas serológicas, para detectar la infección de brucelosis bovina en el rebaño, se analizó esta actividad y su frecuencia, lo cual permitió determinar que en el 92,5% de los rebaños se realizan pruebas serológicas para brucelosis anualmente, pero mediante el empleo del estadístico Z para proporciones permitió determinar que no hubo diferencias entre la positividad a la infección y la frecuencia de realización de las pruebas serológicas.

La prevalencia de brucelosis obtenida para el municipio La Cañada de Urdaneta en el estado Zulia, utilizando la prueba rápida en placa fue de 4,5% mientras que la prueba C-ELISA arrojó 9,11%, resultando esta diferencia significativa. Comparando las pruebas serológicas Rápida en Placa (RP) y C-ELISA aplicadas a los mismos animales, se observó una gran diferencia entre la sensibilidad de ambas técnicas ubicándose la RP en 69% y la C-ELISA en 88,71%. La especificidad también mostró diferencias obteniéndose un 28% para RP y 31% para C-ELISA.

La prueba C-ELISA mostró una diferencia significativa $P = 0,0162$ entre las muestras positivas de hembras vacunadas (31/384) en comparación con los resultados obtenidos en RP (9/384), TABLAS V y VI.

DISCUSIÓN

Según los datos obtenidos, la prevalencia de brucelosis con C-ELISA para el estado Zulia se ubica en 9,11%. Trabajos anteriores realizados en el Edo. Zulia [25], mostraron una gran diferencia entre las prevalencias de brucelosis bovina según los resultados de las pruebas Rápida en Placa y ELISA, reportando también una diferencia significativa a favor de esta última.

TABLA II
BRUCELOSIS BOVINA: PREVALENCIA EN REBAÑOS
SEGUN SECTORES. MUNICIPIO LA CAÑADA
DE URDANETA AÑO 1999

Sectores	Rebaños			Prevalencia en %
	N	n	Positivos	
1	16	06	01	17
2	20	04	-	-
3	28	11	04	36
4	48	31	10	32
5	58	30	0.6	20
6	48	24	04	17
7	95	04	-	-
8	32	17	03	18
9	35	12	01	08
10	27	04	-	-
	327	143	29	20,3

Prevalencia Esperada (I.C. 95%): $13 \leq P \leq 27$.

TABLA III
BRUCELOSIS BOVINA. PREVALENCIA EN ANIMALES
SEGUN SECTORES: MUNICIPIO LA CAÑADA
DE URDANETA. AÑO 1999

Sectores	Animales		Prevalencia en %
	n	Positivas	
1	10	1	10
2	8	0	0
3	20	4	20
4	140	14	10
5	77	06	8
6	53	05	9
7	7	0	0
8	44	04	9
9	21	01	5
10	4	0	0
Total	384	35	9,1

Esta diferencia fue particularmente significativa en los animales vacunados con cepa 19, en los cuales, la técnica de C-ELISA detectó 31 animales positivos en comparación de 9 detectados por la rápida en placa. Sin embargo, ambas pruebas detectaron la misma cantidad de animales (4 animales positivo) entre los no vacunados.

De ser ciertos los datos aportados por las encuestas en cuanto a la vacunación, un alto porcentaje de animales vacunados estarían revelando anticuerpos de infección contra brucela.

TABLA IV
BRUCELOSIS BOVINA: PRESENCIA DE LA INFECCIÓN, FACTORES DE RIESGO Y RAZÓN DE DESIGUALDADES.
MUNICIPIO LA CAÑADA DE URDANETA. 1999

Factores de riesgo	Relación de asociación	Valor P significacion	Rd
Tipo de explotación	Explotación lechera	0,025	1,80
Tipo de alimentación	Sin asociación	-	-
Asistencia veterinaria	Con asistencia veterinaria	0,025	1,41
Frecuencia de la asistencia veterinaria	Asistencia veterinaria permanente	0,025	1,43
Estado inmunitario	Vacunados	0,0179	3,42
Ingreso de animales	Sin asociación	-	-
Requisitos de ingreso	Sin asociación	-	-
Manejo reproductivo	IA con MC (ASO)	0,025	2.48
	IA con MNC (ASO)	0,025	1.96
	MC con MNC (SIN)	-	-
Manejo de becerras	Permanencia sin separación	0,025	2,09

IA: Inseminación artificial. MC: Montá Controlada. MNC: Montá no Controlada.

TABLA V
RESULTADOS DE LA PRUEBA RÁPIDA EN PLACA PARA BRUCELOSIS EN SUEROS PROVENIENTES DE BOVINOS DE LA CAÑADA DE URDANETA, ESTADO ZULIA

Sector	Muestras Negativas		Muestras Positivas		Total
	Hembras Vacunadas	Hembras No Vacunadas	Hembras Vacunadas	Hembras No Vacunadas	
1	1	9	-	-	10
2	5	3	-	-	8
3	17	2	1	-	20
4	110	28	1	1	140
5	46	26	2	3	77
6	34	18	1	-	53
7	5	2	-	-	7
8	37	7	-	-	44
9	10	7	4	-	21
10	2	2	-	-	4
Total	267	104	9	4	384

En una investigación donde se analizaron 6 técnicas de ELISA para el diagnóstico y epidemiología de la brucelosis bovina se conformó un banco de 1.251 sueros sanguíneos de vacas adultas provenientes de tres niveles epidemiológicos diferentes: 244 de vacas infectadas, vacunadas cuando terneras con cepa 19 de *B. abortus*; 507 vacas pertenecientes a fundos libres de infección y vacunadas cuando terneras con cepa 19 y 500 libre de infección y sin vacunación. Todos los sueros fueron sometidos a los test rutinarios de Rosa de Bengala (RB), Rivanol (RIV) y Fijación de Complemento (FC) y adicionalmen-

te a tres enzimoimmunoensayo (ELISA); dos de ellos fueron técnicas de ELISA-indirecto, uno utilizando anticuerpos policlonales (I-ELISAp) y el otro, utilizando anticuerpos monoclonales (I-ELISAm). El tercer ELISA fue de competencia (ELISA-C), efectuado con antígeno LPSs, anticuerpo monoclonal M-84 y anticuerpo anti-ratón preparado en cabra, conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRPO). Al detectar los reactores positivos a partir del estrato de animales infectados se encontró en RB 13,5%, RIV 11,9%, FC 12,7%, I-ELISAp 50,8% e I-ELISAm 22,9% y ELISA-C fue de 44,4%; observándose en la

TABLA VI
RESULTADO DE C-ELISA. MUNICIPIO URDANETA

Sector	Muestras Negativas		Muestras Positivas		
	Hembras Vacunadas	Hembras No Vacunadas	Hembras Vacunadas	Hembras No Vacunadas	Total
1	3	6	1	-	10
2	5	3	-	-	8
3	15	01	4	-	20
4	86	40	12	02	140
5	47	24	05	01	77
6	31	17	05	-	53
7	06	01	-	-	07
8	33	07	03	01	44
9	14	06	01	-	21
10	02	02	-	-	04
Total	242	107	31*	4	384

detección de reactores un porcentaje mayor en el ELISA de competencia y el I-ELISAp [23].

Por otra parte, el ELISA de Competencia o C-ELISA, superó en especificidad al ELISA Indirecto (ELISA-I) por lo cual puede ser ampliamente recomendado para ser utilizado en áreas endémicas donde es muy probable la exposición a *Brucella* sin el desarrollo de la enfermedad. En el campo se ha utilizado el C-ELISA, para distinguir anticuerpos inducidos por vacuna, de los anticuerpos inducidos por una infección natural [25]. Por tal motivo, podemos indicar, que los animales vacunados positivos a C-ELISA, los cuales no pudieron ser detectados por la prueba rápida en placa están infectados con *Brucella abortus*. Este ensayo permite distinguir animales infectados con *Brucella* y animales vacunados con la cepa 19 y además infectados con otros patógenos que dan reacción cruzada con bacterias Gram negativas.

Siguiendo los resultados de la prueba C-ELISA, la prevalencia general de brucelosis bovina y la encontrada en los sectores 1, 4, 5, 6 y 8 se considera moderada, y alta en el sector 3 dado que los índices de infección son mayores del 10% y del 35% respectivamente, según los criterios establecidos por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en brucelosis para América Latina [19]. Estos criterios infieren de niveles de infección bajos en los rebaños con índices de infección menores del 10%; de moderados en rebaños que tienen entre un 10% a un 35% de infección y como altos cuando la positividad es superior al 35%. Así mismo, la prevalencia fue menor a la positividad encontrada por Torres [29] de 18% en el municipio La Cañada de Urdaneta en 1996. De igual forma, fue mayor a la positividad re-

portada de 0,58% para el estado Zulia y de 0,20% para el municipio La Cañada de Urdaneta por el SASA-ZULIA en el 1999. Otros autores, como Silva y col. [26], en Sri-Lanka reportaron un 4,7% entre los años de 1992 a 1995. Cruz y D'Onofrio [8], en Argentina en 1995 obtuvieron un 2,4%. Estos datos difieren de manera importante y son muy inferiores a las prevalencias de brucelosis encontradas por Salgado y Jaramillo [25] de 52,38% en México en 1995; Boquis y Kjellgren [3] de 75% en Guinea 1996; Rojas y Alonso [23] de 44% en Chile en 1995; Navarro y col.; [17] de 36,3% en Argentina, a la de Spath y Moreira [27] de 45% también en Argentina en 1997 y a la reportada por Omer [18] de 36% en Eritrea, Asmara en el 2000 las cuales pueden ser clasificadas como altas.

En lo referente a la prevalencia por animal, ésta fue mayor a la encontrada por Rivera y Curiel [22] de 4,5% en el municipio Rosario de Perijá, estado Zulia, Venezuela en 1993. Spath y col. [27] reportan un 7,2% en Necochea, Argentina en 1997; Navarro y col. [27] de un 4,2% en la ciudad de Tandil, en Argentina en 1997. Sin embargo, Salgado y Jaramillo [25] obtienen un 16,72% de prevalencia de brucelosis en Guerrero, México en 1995.

En cuanto a la prevalencia por animal, ésta se consideró moderada en los sectores 1, 4, 5, 6, 8 y 9, en virtud de que la misma oscila entre un 5% y un 10%, y para el sector 3 como alta, por ser mayor del 10%. Según los criterios establecidos por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis [19], que señala como niveles de infección bajos una positividad por animal menor del 3%, niveles de infección moderados entre un 3% a un 10% de animales infectados, y niveles de infección altos cuando los índices de infección son superiores al 10%.

Con respecto a los factores de riesgo estudiados no se encontró ninguna asociación entre el tipo de alimentación con la presencia de la infección. Este resultado difiere a los hallados por Silva y col. [26] en Sri Lanka, quienes señalaron mediante la razón de desigualdad (Rd) una asociación entre el pastoreo y la presencia de la infección de 1,8. Omer y col. [18] en Eritrea en el 2000 reportan una asociación entre la presencia de la brucelosis bovina y el tipo de explotación, ubicándose la Rd en 5,2.

Evidentemente, los rebaños más afectados son los lecheros. Ni la asistencia veterinaria frecuente ni la vacunación, siempre y cuando las encuestas revelen la situación real de las fincas, favorecen la erradicación de la brucelosis. La presencia de machos, castrados o no, podrían considerarse como fuentes de infección permanente dado que los mismos no son vacunados.

Sin embargo, si la probabilidad de que un rebaño adolezca de una enfermedad es casi siempre pequeña, como es el caso del rebaño de La Cañada de Urdaneta, es muy probable que para detectar evidencias epidemiológicas de diferencias de riesgos, se requieran analizar un número suficientemente grande de rebaños, durante un periodo de tiempo razonable [13].

CONCLUSIONES

Se confirma la mayor sensibilidad de la prueba de C-ELISA comparada con la RP, pudiéndose detectar prevalencias de brucelosis que duplican las anteriormente reportadas específicamente en el renglón de hembras vacunadas.

Los factores asociados a la enfermedad incluyen la explotación lechera, la inseminación artificial con o sin monta controlada, la permanencia de becerras de madres positivas a brucelosis y el estado inmunitario.

RECOMENDACIONES

Para detectar los animales positivos con infección brucélica se hace necesario monitorear con técnicas de ELISA, preferiblemente con C-ELISA. Se debe reforzar el estado inmunitario de los animales especialmente con cepas de *Brucella* que no generen anticuerpos para facilitar el diagnóstico. Igualmente se recomienda la eliminación de hembras hijas de madres positivas y revisar los toros utilizados en las montas controladas.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue cofinanciado por el CONDES. Los Autores agradecen al personal del Laboratorio Regional de Diagnóstico del SASA Zulia y del laboratorio de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de LUZ por su colaboración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ACHA, P.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2ªEd., Publicación Científica Nº 503. 14-20 pp. 1992.
- [2] BLOOD, D. C.; HENDERSON, J.; RADOSTITIS, O.M. Brucelosis. **Medicina Veterinaria**. 7ªEd. Editorial Interamericana-México. 729-735 pp. 1992.
- [3] BOQUIS, S.; KJELGREN, Á. The Prevalence of *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans*, serovar hardjo in cow and the presence of *Mycoplasma capricolum* Subsp. *capripneumoniae* in goats in the region Guinea, Bissaus-Minorfield 6. Studies, International Office, Swedish University of Agricultural Sciences. 3. 26 pp. 1997.
- [4] CASAS, R. **Diagnostico Serológico de la Brucelosis Bovina**. Boletín Centro Panamericano de Zoonosis OPS/OMS. 3-5 pp. 1974.
- [5] CHERWONOGRODZY, J.; MARIÑO, J.O. Antigenos de *Brucella* y su posible Aplicación en ensayos Inmunoenzimáticos. **Revista ICA**. 2(25): 99-111. 1990.
- [6] CONTRERAS, J. Brucelosis. **Enfermedad de los Bovinos causada por Agentes Virales, Bacterias, Rickettsiales y Protozoarias: Diagnóstico, Tratamiento y Control**. Segunda Edición. Barquisimeto-Venezuela, 405-420 pp. 1996.
- [7] CONZUPLAN, **Atlas del Zulia**. Gobierno del Zulia 19 pp. 1990.
- [8] CRUZ, M.L.; BASCO DE D'ONOFRIO, M. Prevalencia de la Brucelosis Bovina en la Cuenca Lechera de la Provincia de Tucumán. 1-4 pp. 2001.
- [9] EVANS, R.; ALBORNOZ, R. Estudios Transversales. **Principios de Epidemiología**. Imprenta Universitaria UCV. 293-314 pp. 1994.
- [10] HERNÁNDEZ, R.; FERNÁNDEZ, C.; BATISTA, P. Diseños no Experimentales de Investigación. **Metodología de la Investigación**. 2ªEd Editorial Mc Graw-Hill. Inter Americana. México. 187-206 pp. 1994.
- [11] HOET, A.; LANDAETA, A.; MENDOZA, A. Antigenicidad Cruzada en Brucelosis Bovina. **Rev. Científ., FCV-LUZ**. VII(1): 5-12 . 1997.
- [12] LÓPEZ, A. **Brucelosis: Avances y Perspectivas**. Pub. Técnica del INDRE. N Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo. México, DF. Nº6: 19-22 pp. 1991.
- [13] MÁLAGA, H. Cualificación y Cuantificación de la Enfermedad-Estudios Epidemiológicos de Factores de Riesgo. **Epidem. Vet**. EDILUZ 47-58, 191-193 pp. 1999.
- [14] MERCK, C.O. Inc. **El Manual de Merck de Veterinaria**. 4ª Ed. S.A. Barcelona, España. 768-775 pp. 1993.

- [15] MINISTERIO DE PRODUCCIÓN Y COMERCIO. Reglamentación de la Lucha Contra La Brucelosis Bovina, 1974. Art10. Caracas. Venezuela, 8 pp. 1974.
- [16] MINISTERIO DE PRODUCCION Y COMERCIO. Departamento de Sanidad Animal. SASA-ZULIA. Actividades de brucelosis. Consolidado. **Reporte Anual**. 14 pp. 1999.
- [17] NAVARRO, F.; GREGORET, R.; BIDONDE, J.; SAMARTINO, L.; Determinación de la Prevalencia Serológica de la Brucelosis Bovina en el Partido Tandil. Argentina. **Rev Med Vet**, 78 (5): 311-314. 1997.
- [18] OMER, M.K.; SKJERVE, E.; WOLDEHIWET, Z.; HOLSTAD, G. Risk Factor for Brucella spp . Infection in Dairy Cattle Farms in Asmara, State of Eritrea. **Prevent Veter Med**.46: 257-265. 2000.
- [19] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD FAO/OMS. **Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Trasmisibles y Zoonosis**. Publicación Científica 288-78 pp. 1974.
- [20] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD OPS/OMS. **Control de las Enfermedades Trasmisibles en el hombre**. Informe Oficial de la Asociación Americana de la Salud Pública. OPS/OMS. Universidad del Zulia Publicación Científica 564. 26-28 pp. 1997.
- [21] RIVERA, S. Respuesta inmune específica inducida por la introducción de antígenos en el organismo. Facultad de Ciencias Veterinarias. LUZ. Curso Avanzado de Inmunología. Maracaibo, Venezuela. 2 Noviembre. 53-66 pp. 1996.
- [22] RIVERA, S.; CURIEL, J. Epidemiología Serológica de la Brucelosis Bovina en el Municipio Rosario de Perijá, estado Zulia, Venezuela. **Rev Científ. FCV-LUZ** V(2):174-124. 1993.
- [23] ROJAS, X.; ALONSO, O. ELISA for the Diagnosis and Epidemiology of Brucella abortus Infection in cattle in CHILE. **Arch. Vet**. XXVII. Nª Extraordinario: 45- 50. 1995.
- [24] RUIZ, L. Brucelosis. **Enfermedades Zoonóticas en Venezuela**. Boletín Unidad de Epidemiología, Barquisimeto. Venezuela. 8-20 pp. 1995.
- [25] SALGADO, G.; JARAMILLO, A.; SÁNCHEZ, L. S.; SÁNCHEZ, H.F.; GARCIA, J.; ROMERO, J.G. Prevalencia de Brucelosis Bovina a partir de Muestras de Leche en el Estado Guerrero en México. **Veterin México**. Abstract 07. 1995.
- [26] SILVA, I.; DANGOLLA, A.; KULACHELVY, K. Seroepidemiology of Brucella abortus Infection in bovis in Sri Lanka. **Prevent Veter Med**. 46: 51-59. 2000.
- [27] SPATH, J.A.; MOREIRA, A.R.; GARCIA, J.J.; ARANO, C. Seroprevalencia de Brucelosis Bovina en el Distrito de Necochea. **Rev Med Vet** 78(1): 6-8. 1997.
- [28] TARRADAS, C.; LUQUE I.; MALDONADO, A.; ARENAS, B.; HUERTA, C.; BORGE.; ASTORGA, R. **Zoonosis Transmitidas por los Animales de Experimentación**. Departamento de Sanidad Animal. FCV Universidad de Córdoba. 1-7 pp. 2001.
- [29] TORRES, T. Determinación de Brucelosis Bovina en Leche Cruda Producida en el municipio La Cañada de Urdaneta del estado Zulia. Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias (Tesis de grado). 1-35 pp. 1996.
- [30] UZAL, F.A.; CARRASCO, A.E.; NIELSEN, K.H. Evaluación de un ELISA competitivo para el diagnóstico de Brucelosis Bovina. Bariloche Argentina. **Vet. Res**. 20(5): 421-426. 1996.
- [31] VARGAS, F. Efecto de la Vacunación de Toros Adultos con Cepa 19. RB51 de Brucella abortus. Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracaibo, Venezuela (Tesis de grado). 1-6 pp. 2001.
- [32] VARGAS, M. Vacunas y Estrategias de Vacunación en los Programas de Control/erradicación de la Brucelosis. **Reunión de Consulta de Expertos de la OPS/OMS**. Santiago de Chile Septiembre-Octubre. 1-8 pp. 1999.
- [33] VÁSQUEZ, A.; COMACH, G.; SÁNCHEZ, E.; SOSA, G. Desarrollo y evaluación de las pruebas Elisa Indirecta y Competitiva en el diagnóstico de la brucelosis en cerdos. **Memorias del Simposio Internacional de Brucelosis**. Maracay 26-27 de Mayo. Venezuela. 60-62 pp. 1999.