BRUCELOSIS BOVINA: EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA MUESTRAS COMPUESTAS DE LECHE Y MODELOS EPIDEMIOLÓGICOS DE DIFUSIÓN DE LA ENFERMEDAD

Proyecto FPTA-245 Evaluación de instrumentos de vigilancia epidemiológica y desarrollo de herramientas para la toma de decisiones en el control y erradicación de la Brucelosis bovina

Técnicos responsables: **Andrés D. Gil***

José M. Piaggio*

Equipo técnico del Proyecto: Andrés D. Gil, José Piaggio, Alejandra Suanes, Álvaro Nuñez, Alfredo Garín, Mariela Silva, Deborah Cesar, Beatriz di Pace, Gabriel Mautone, Ricardo Zaffaroni, Natalia Chans, Stella Maris Huertas

Colaboración de Referentes Internacionales: Mo Salman, Luis Samartino, David Dargatz

Técnicos que aportaron su experiencia en trabajos de talleres: Francisco Muzio, Nora Negrín, Federico Fernández, Ricardo Perez-Rama, Marcelo Rodríguez, Edgardo Vitale, Leopoldo Amorín, Oscar Caponi, Luis E. Chans, Nicolás Barg, Norman Benett, Eduardo Barre, Luis García, Luis Eduardo Días y Raúl Oyenart

*DV, MS, Ph.D, Dirección General de los Servicios Ganaderos (DGSS-MGAP).
** DMTV, MSA , Facultad de Veterinaria, UDELAR.

Título: BRUCELOSIS BOVINA: EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA MUESTRAS COMPUESTAS DE LECHE Y MODELOS EPIDEMIOLÓGICOS DE DIFUSIÓN DE LA ENFERMEDAD

Técnicos responsables: Andrés D. Gil
José M. Piaggio

Equipo técnico del Proyecto: Andrés D. Gil, José Piaggio, Alejandra Suanes, Álvaro Nuñez, Alfredo Garín, Mariela Silva, Deborah Cesar, Beatriz di Pace, Gabriel Mautone, Ricardo Zaffaroni, Natalia Chans, Stella Maris Huertas

Colaboración de Referentes Internacionales: Mo Salman, Luis Samartino, David Dargatz

Técnicos que aportaron su experiencia en trabajos de talleres: Francisco Muzio, Nora Negrín, Federico Fernández, Ricardo Perez-Rama, Marcelo Rodríguez, Edgardo Vitale, Leopoldo, Amorín, Oscar Caponi, Luis E. Chans, Nicolás Barg, Norman Benett, Eduardo Barre, Luis García, Luis Eduardo Días y Raúl Oyenart

Serie: FPTA N° 36

© 2013, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA

Andes 1365, Piso 12. Montevideo - Uruguay
http://www.inia.org.uy

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

Ing. Agr., MSc., PhD. Álvaro Roel - Presidente

D.M.T.V., PhD. José Luis Repetto - Vicepresidente

MINISTERIO DE GANADERÍA AGRICULTURA Y PESCA
REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

D.M.V. Álvaro Bentancur

D.M.V., MSc. Pablo Zerbino

ASOCIACION RURAL DEL URUGUAY 1871

Federación Rural
CON EL CAMPO PARA EL URUGUAY

Ing. Agr. Joaquín Mangado

Ing. Agr. Pablo Gorriti

CAF

COMISION NACIONAL DE FOMENTO RURAL

CREA

FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18º de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 4o/oo del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.

b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.

c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos. De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.

CONTENIDO

Pág.

I.BRUCELOSIS BOVINA EN URUGUAY

Identificación del Problema 13

Antecedentes y Justificación 14

IV.1. Generalidades 14

IV.2. Antecedentes Nacionales 15

IV.3. Justificación 15

Objetivo General 17

II.SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO APLICADAS SOBRE LECHE MEZCLA

Introducción 19

Materiales y Métodos 19

Resultados 20

Discusión 23

III.EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS PRINCIPALES PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADAS PARA LA VIGILANCIA DE REBAÑOS LECHEROS

Introducción 27

Materiales y Métodos 28

Resultados 30

Discusión 33

IV.DIFUSIÓN DE LA BRUCELOSIS ENTRE REBAÑOS, CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS PARA DEFINIR ESTRATEGIAS DE VIGILANCIA Y CONTROL

Introducción 35

Materiales y Métodos 36

Modelo Epidemiológico 36

Modelo de Simulación 40

Transmisión entre rebaños. 44

- Transmisión por movimiento de portadores 44
- Transmisión por contigüidad (linderos) 47
- Programas de Vigilancia 48
- Supuestos 51
- Salidas del Modelo 51

V.MODELO DE DIFUSIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA INTRA REBAÑOS

Tipo de Producción «Lechera» 53

PROYECTO FPTA 245

EVALUACIÓN DE INSTRUMENTOS DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA Y DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA LA TOMA DE DECISIONES EN EL CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA

Autores y Cargos

- **Andrés D. Gil** (Profesor Bioestadística - Facultad de Veterinaria; Coordinar Unidad de Epidemiología - Dirección General de los Servicios Ganaderos - MGAP),
- **José Piaggio** Técnico Unidad de Epidemiología - Dirección General de los Servicios Ganaderos - MGAP),
- **Alejandra Suanes** (Asistente Bacteriología - Facultad de Veterinaria; Encargada del Laboratorio de Diagnóstico de Leptospirosis - Depto. Bacteriología - DILAVE «M.C. Rubino» Dirección General de los Servicios Ganaderos - MGAP),
- **Álvaro Núñez** (Profesor Adjunto Depto. Patología y Clínica de Rumiantes y Suinos – Facultad de Veterinaria; Director DILAVE «M.C. Rubino» - Dirección General de los Servicios Ganaderos - MGAP),
- **Alfredo Garín** (Jefe Programa Brucelosis – Depto. Programas Sanitarios – División Sanidad Animal - Dirección General de los Servicios Ganaderos - MGAP),
- **Mariela Silva** (Encargada del Laboratorio de Diagnóstico de Brucelosis – Depto Bacteriología - DILAVE «M.C. Rubino» Dirección General de los Servicios Ganaderos - MGAP),
- **Deborah Cesar** (Técnico Asesor del Instituto Plan Agropecuario),
- **Beatriz di Pac**e (Asistente de Proyectos de Bioestadística - Facultad de Veterinaria,
- **Gabriel Mautone** (Asesor Técnico Unidad de Epidemiología - Dirección General de los Servicios Ganaderos - MGAP),
- **Ricardo Zaffaroni** (Veterinario Ejercicio Libre),
- **María Natalia Chans** (Jefa de Servicio de Establecimientos Comestibles, del Depto. de Establecimientos Industrializadores – División Industrial Animal - Dirección General de los Servicios Ganaderos - MGAP),
- **Stella Maris Huertas** (Profesor Adjunto Bioestadística - Facultad de Veterinaria; Directora del Centro Colaborador de OIE en Bienestar Animal).

Pág.

Modelo conceptual 54
Estados 54
Parámetros del Modelo 54
Susceptibilidad 55
Mortalidad 55
Modelo con infección 55
Probabilidad de Aborto 56
Refugo por otras causas 58
Transmisión 58
Probabilidad de infección horizontal 58
Probabilidad de infección vertical 61
Detección 61
Vigilancia 61
Anticuerpos 62
Intervención 62
Salidas «Outputs» del Modelo 62
Salidas (Outputs) de la simulación (5000 iteraciones): 62

VI. CONCLUSIONES 65

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. 67

AGRADECIMIENTOS

INIA; CONAHSA, DGSG-MGAP, Facultad de Veterinaria-UDELAR

I. Brucelosis bovina en Uruguay

Andrés D. Gil[*], José Piaggio[*], Alejandra Suanes[*], Álvaro Núñez[*], Alfredo Garín[*], Mariela Silva[*], Deborah Cesar[**], Beatriz di Pace[***], Gabriel Mautone[*], Ricardo Zaffaroni[****], María Natalia Chans[*], Stella Maris Huertas[***]

[*]Dirección General de los Servicios Ganaderos - MGAP
[**]Instituto Plan Agropecuario
[***]Facultad de Veterinaria
[****]Ejercicio Libre

Proyecto FPTA 245

Período de Ejecución: Feb. 2007-Dic. 2009

IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Uruguay inició un Plan Nacional de Erradicación de la Brucelosis Bovina a partir del año 1998. Este plan implicaba la suspensión de la vacunación, el refuerzo de las actividades de vigilancia, la eliminación de los reactores y el saneamiento de los predios con animales positivos.

Las actividades de vigilancia en los establecimientos lecheros se realizaron a través de la Prueba del Anillo en Leche (PAL) sobre las muestras compuestas de leche extraídas de los tanques. Un PAL positivo lleva a la realización de serología en el establecimiento. Las actividades de vigilancia epidemiológica de los establecimientos que producen animales para carne, estuvieron basadas en muestreos en plantas de faena que se iniciaron a fines del año 2002 y se mantienen e incrementaron hasta la fecha.

La cabaña nacional se monitorea mediante la exigencia de resultados serológicos negativos para el ingreso a las exposiciones, remates ferias, liquidaciones y exportaciones.

La marcha de esta campaña mostró su primer alerta a partir del año 2002, cuando a partir de dos focos iniciales y mediante muestreos serológicos realizados sobre los linderos a ellos por la División Sanidad Animal, se detectaron 104 establecimientos positivos en ganadería de carne en el departamento de Rocha. En este departamento se aplicó la cuarentena (interdicción) con obligatoriedad de serología negativa previa al movimiento de los ganados susceptibles en cinco seccionales policiales.

A mediados del 2003 también surgió una situación de preocupación en el departamento de San José, donde existían un número importante de focos en establecimientos lecheros, lo cual se agravó durante el año 2005 al detectarse como positivo un campo de recría. Cuando se inicio este estudio (2007) había 102 focos activos en ese departamento, siendo actualmente (octubre 2011) 13 y de ellos solo cinco en establecimientos lecheros.

A esta situación sanitaria, se agregó el incremento del diagnóstico de algunos casos de brucelosis en humanos de áreas rurales de zonas del departamento de Rocha, que determinaron, como está establecido, la transmisión de información entre los servicios locales y centrales del MGAP y el MSP para tomar las medidas que correspondían en forma coordinada. Estos casos pusieron sobre la mesa el riesgo que presupone está zoonosis para los individuos que deben estar en contacto con los animales o sus productos.

En el año 2005 la Dirección General creó un Grupo Técnico para delinear un plan de acción y delinear los caminos a seguir para controlar la situación y continuar con la erradicación

El grupo técnico analizó la situación y concluyo que: *De acuerdo a la información existente el objetivo final era alcanzar nuevamente los niveles de prevalen-*

cia adecuados para continuar la erradicación de la Brucelosis bovina en todo el territorio nacional.

Dentro de los principales cambios introducidos se destaca la vacunación con RB51 en el departamento de San José y la obligatoriedad de realizar serología en todos los establecimientos lecheros para la refrendación anual.

El principal motivo para el cambio en la utilización de la Prueba de Anillo en Leche (PAL) por serología fue que esta prueba fue cuestionada por diversos actores como sistema para la detección de animales positivos. Con un rebaño lechero en el entorno de las 450 mil hembras y con un costo estimado de 2,7 dólares por reacción la adopción de la serología obligatoria significo un incremento en el entorno de 1 millón de dólares anuales en la estrategia de erradicación.

Esta situación ameritó que el grupo técnico recomendara evaluar las técnicas de diagnóstico y su utilidad en la campaña, especialmente en lo referente al PAL y otras pruebas de posible uso sobre la leche tanque.

Si bien resulta claro la necesidad de evaluar instrumentos de vigilancia epidemiológica también resulta necesario contar con una herramienta de Apoyo a las Decisiones que permite combinar las diversas estrategias de vigilancia y prevención de forma de buscar la mayor eficiencia.

Este estudio buscó evaluar las principales características de las pruebas disponibles para la vigilancia basada en la leche tanque a través de la comparación de la sensibilidad analítica del PAL, comparado con tres diferentes kits de ELISA y la Prueba de Polarización Fluorescente (FPA).

También se trató de dotar al programa con un modelo de simulación estocástico que permitiera generar diversos escenarios que combinen la vigilancia con diversos instrumentos y medidas preventivas en busca de una mayor eficiencia del programa.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Generalidades

La Brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa producida por bacterias del género *brucella*, siendo considerada por los organismos internacionales como la zoonosis más difundida del mundo. La *Brucella* es una bacteria intracelular facultativa con predilección por el sistema retículo-endotelial y el tracto y órganos reproductivos. El capitán David Bruce fue el primero en aislar el agente de la brucelosis de las cabras, en 1884 en la isla de Malta y el profesor L. F. Bang un veterinario danés describió la *Brucella abortus* de los bovinos en 1895 [24, 25].

Dentro del género *Brucella* se distinguen siete especies y cada una tiene un huésped natural: *Br. abortus* - bovinos, *Br. melitensis* – caprinos, *Bruc. suis* – cerdos, *Bruc. canis* – caninos, *Bruc. ovis* - ovinos, *Bruc. neotomae* – ratas de la madera del desierto y *Bruc. maris* – lobos marinos y delfines.

El factor de mayor relevancia de la Brucelosis radica primariamente en afectar seriamente la salud humana, ya sea por contagio directo con: placentas, fetos y secreciones uterinas o por consumo de leche y sus derivados contaminados. La Brucelosis causa graves pérdidas económicas a la salud pública debido a: tratamientos, hospitalización, días de ausencia en el trabajo, indemnizaciones y juicios laborales. Por otro lado las repercusiones económicas también son graves para la producción animal por: abortos, esterilidad, merma de la producción lechera, gastos veterinarios, reposición de los animales y pérdidas de mercados nacionales e internacionales [13].

En Latinoamérica la enfermedad está presente en todos los países, algunos como México y Perú con prevalencias muy altas y otros como Uruguay cuya prevalencia es baja pero aún se manifiestan brotes aislados [3, 12, 14, 15, 16, 17, 30].

Este proyecto se concentrará en la brucelosis de los bovinos causada por *Brucella abortus*.

Antecedentes Nacionales

Los antecedentes de la Brucelosis Bovina en el Uruguay, comienzan con el primer aislamiento e identificación serológica en bovinos que fuera realizada por Cassamagnaghi en 1926 y su constatación en humanos por Nin y Silva en 1931 [2, 3, 39].

Las acciones contra esta enfermedad se iniciaron en 1928, con su inclusión en el Art. 2 de la Ley 3.606 con lo cual se tornó de denuncia obligatoria. Si bien la vacuna contra la brucelosis bovina ya estaba disponible en el país desde 1946, recién en 1964 se hace obligatoria su utilización hasta 1996 en que es suspendida por el decreto 522/996 [7].

El código zoosanitario de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) establece que un país o región libre de brucelosis será aquella que tenga menos de 0,2% de los rebaños con presencia de la enfermedad, que ningún animal haya sido vacunado en los últimos tres años y que todo animal positivo haya sido sacrificado [7]. En función de esta normativa una posible estrategia sería declarar al país libre a través de la declaración de rebaños oficialmente libres.

El objetivo actual es bajar la prevalencia de la enfermedad de forma significativa, lo cual posibilitará que la gran mayoría de los establecimientos se libren de la enfermedad y por lo tanto de los riesgos y pérdidas que esto implica para la salud pública, el productor y la economía en general.

Inicialmente la vigilancia de los establecimientos lecheros se ha basó en las pruebas de anillo en leche tanque (PAL) con frecuencia trimestral y para todo el ganado vacuno serología teniendo como prueba presuntiva la de Rosa de Bengala (RB) y como confirmatoria la prueba de Rivanol.

Se establecieron criterios para clasificar los establecimientos a través del decreto 20/998 del 22 de enero de 1998 [6, 11]. Este decreto estableció seis categorías para rebaños lecheros y cuatro para rebaños de producción de carne o mixtos, pero su utilización cayó en el desuso con el correr de los años.

También a través de este decreto (20/998), en todos los casos que se detecta animales reaccionantes positivos a las pruebas confirmatorias; estos deben ser eliminados (enviados a sacrificio) en un plazo de 30 días a partir de la fecha del diagnóstico.

Justificación

Si bien las actividades de vigilancia epidemiológica en la lechería se implementaron en forma inmediata a través del PAL, los establecimientos para carne comenzaron a ser vigilados activamente a través de plantas de faena recién a fines del año 2002 con una muestra de 18.997 sueros [11] y en muestreos nacionales con 25.332 sueros aleatorios [16, 17].

Como ya se mencionó la campaña mostró su primer alerta en el año 2002, cuando se detectaron los 104 establecimientos positivos en ganadería para carne en el departamento de Rocha. En este departamento se aplicó además de la cuarentena (interdicción), la obligatoriedad de serología negativa previa al movimiento de los ganados en cinco seccionales policiales y para acelerar el proceso de saneamiento se comenzó a utilizar la vacunación con RB51 (vacuna que no interfiere con el diagnóstico serológico), que se autorizó a través del decreto 432/2002 6/11/02 [7].

En los Cuadros 1 y 2 se observa la evolución de las prevalencias aparentes estimadas de los bovinos y rebaños según el rubro productivo entre 2002 y 2008 [14, 15].

A mediados del 2003 también surgió una situación de preocupación en el departamento de San José, donde existían un número importante de focos en establecimientos lecheros. Esta situación se agravó en el 2005 al detectarse una serie de nuevos focos en ese departamento lo que obligó a: reglamentar los campos de recría, extender la vacunación con RB51 al departamento de San José y exigir serología para la habilitación y refrendación anual de todos los tambos del país (decreto Nº 135/005 del 15/04/05 y resolución 45/005 del 19/05/05).

Cuadro 1. Prevalencia estimada expresada en porcentaje de la Brucelosis bovina en el Uruguay

Bovinos	2002			2004			2006			2007			2008		
	Prev	E E	n	Prev	E E	n	Prev	E E	n	Prev	E E	n	Prev	E E	n
Carne	0,24	0,14	18977	0,16	0,08	12621	0,23	0,21	11940	0,05	0,04	17205	0,30	0,14	20774
Leche	0,02	0,02	6355	0,42	0,26	6840	——	——	6609	0,04	0,04	9886	——	——	7168
Todos	***0,22***	0,13	25332	***0,17***	0,08	19461	***0,22***	0,20	18549	***0,05***	0,04	27091	***0,26***	0,12	27942

Nota: Prev = Prevalencia; EE = Error Estándar; n = tamaño de la muestra.

Cuadro 2. Porcentaje de establecimientos estimados como positivos a la Brucelosis bovina en el Uruguay

Bovinos	2002			2004			2006			2007			2008		
	Prev	E E	n	Prev	E E	n	Prev	E E	n	Prev	E E	n	Prev	E E	n
Carne	2,04	1,65	246	0,92	0,49	437	2,20	1,15	342	1,45	0,72	346	1,30	0,66	399
Leche	0,25	0,19	119	4,50	2,38	230	——	——	134	0,69	0,69	192	——	——	137
Todos	***1,70***	1,34	365	***1,06***	0,49	667	***2,02***	1,06	477	***1,39***	0,67	538	***1,10***	0,55	536

Nota: Prev = Prevalencia; EE = Error Estándar; n = tamaño de la muestra.

La sola adopción de la serología para la refrendación anual implica teóricamente unas 440 mil pruebas serológicas por año. Estas serologías según el arancel 2010 de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay SMVU (http://www.smvu.com.uy/aranceles.php) tienen un costo de $75 c/u lo que equivale aproximadamente a U$S 3,75 e implican un gasto anual superior a 1,6 millones de dólares americanos.

Diversos actores han cuestionado la capacidad de las pruebas utilizadas para hacer un trabajo eficiente y promovieron «la investigación y evaluación de las pruebas diagnósticas...» como fue reclamado por la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay (Informe del Grupo de trabajo de Brucelosis 18/05/2005). No se ha realizado un trabajo sistemático de validación de las pruebas oficiales a nivel nacional y se utilizan estimaciones de sensibilidad y especificidad tomadas de la literatura. Es así que se asume que la prueba de rosa de bengala RB tiene una sensibilidad de 95,2% y una especificidad de 98,5% [22], pero por otro lado no se desconoce que hay reportes en la literatura de sensibilidades mucho más bajas estimadas con animales con aislamientos positivos [35]. Una reciente revisión de la literatura reporta los siguientes valores medios para las técnicas que se utilizan en el país Rosa de Bengala sensibilidad 81,2% y especificidad 86,3%, Rivanol sensibilidad 89,6% y especificidad 63,1%. Prueba de anillo en leche tanque PAL sensibilidad 89,5% y especificidad 74,5% [10]. En otra revisión se expresa que el rango de variaciones de RB para sensibilidad va de 21,0% a 98,3% y para especificidad de 68,8% a 100% y en Rivanol la variación es de 50,5% a 100% en sensibilidad y 21,9 a 100% en especificidad [26].

Resulta obvio que el comportamiento de todas las pruebas que se están utilizando en Uruguay tienen una especificidad superior a la media estimada por Gall y col. [8], ya que si no tendríamos más de un 25% de reactores en el PAL y una serología positiva superior al 8% asumiendo un comportamiento independiente del RB y el rivanol y una prevalencia de 0.

En base a los datos del Cuadro 1 se puede afirmar que la combinación de pruebas serológicas que se están utilizando en el Uruguay están teniendo un comportamiento de especificidad superior al 99%. Por otro lado no se cuenta con elementos que permitan hacer una estimación de la sensibilidad de las pruebas que se están utilizando, lo cual justifica la preocupación de los actores ya que este es un elemento esencial para la detección de los focos existentes y el avance de la campaña.

Como podemos observar el control de esta enfermedad requiere una actualización constante de los instrumentos y estrategia del combate que se resumen en:

- vigilancia epidemiológica,
- control de movimientos,
- vacunación y
- eliminación de reactores.

El ajuste de estos instrumentos determinará el éxito o fracaso del programa (campaña) y el costo involucrado en el mismo. Dado la variedad de estrategias posibles para erradicar la enfermedad, probar cada una en situaciones en terreno es poco práctica, extremadamente costosa y los resultados tardarían mucho tiempo en ser obtenidos.

Otra alternativa es desarrollar un «modelo» de simulación de la dispersión de la enfermedad en tiempo y espacio que permita predecir los posibles resultados y costos de cada cambio estratégico, como forma de ayudar a la planificación y toma de decisiones.

De esta forma se podrán considerar las interacciones entre factores epidemiológicos, ambientales y sociopolíticos, seleccionar la forma más eficiente de erradicar la enfermedad e identificar las principales restricciones del programa.

Los modelos de simulación para brucelosis son escasos y en su mayoría se centran sobre aspectos económicos de los programas [1, 5, 36], en la dinámica poblacional de especies salvajes [29], o en la difusión predial [9, 18] y solo uno en los aspectos epidemiológicos esenciales de su control [4, 20].

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los instrumentos de vigilancia epidemiológica disponibles para la ganadería de leche y desarrollar un modelo de simulación de la dispersión de *Brucelosis bovina* en el país, como herramientas para la toma de decisión en la campaña de control /erradicación de la Brucelosis bovina en Uruguay.

Andrés D. Gil[*], Mariela Silva[*], Alejandra Suanes[*], Beatriz di Pace[**], Ricardo Zaffaroni[***], María Natalia Chans[*], José Piaggio[*], Álvaro Núñez[*]

[*]Dirección General de los Servicios Ganaderos - MGAP
[**]Facultad de Veterinaria
[****]Ejercicio Libre

II. Sensibilidad analítica de las pruebas de diagnóstico aplicadas sobre leche mezcla

INTRODUCCIÓN

La Prueba de Anillo en Leche (PAL) ha sido y es utilizada mundialmente para la vigilancia de los rebaños lecheros con un desempeño aceptable. En el Uruguay ha tenido un desempeño malo, no permitiendo la detección de la mayoría de los focos que han afectado al sector lechero. Por esta razón se torno imprescindible la realización de serologías completas de los rebaños lecheros, a los efectos de poder detectar los focos de la enfermedad en este sistema productivo.

La Prueba de Anillo en Leche (PAL) fue originalmente utilizada en Dinamarca para la detección de rebaños infectados por *Brucella abortus* en estudios sobre la leche de los tarros recibidos en las plantas [(32)]. Posteriormente un estudio similar demostró que juntar dos o tres tarros de leche no reducían significativamente el comportamiento de esta prueba, pero si reducían los costos y esfuerzos que implica este tipo de vigilancia [(33)].

El pasaje de la utilización de tarros a tanques refrigerados colectores de leche puso las primeras dudas sobre la habilidad del PAL para detectar la enfermedad.

La prueba diagnóstica a utilizar sobre leche del tanque debe ser muy sensible para poder detectar la enfermedad en forma temprana y superar el efecto de dilución de la mezcla en el tanque. Por esta razón se determinará la sensibilidad analítica que permitirá establecer el alcance de cada prueba.

El objetivo de estos ensayos es determinar la sensibilidad analítica de las pruebas disponibles (PAL, ELISA y Polarización Fluorescente), para ser utilizadas sobre leche mezcla simulando la extraída de los tanques de ordeñe.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para esto se recurrió a animales infectados naturalmente, que fueron identificados por la vigilancia realizada dentro del programa de brucelosis. Se identificaron 17 vacas lecheras, que fueron positivas a las pruebas serológicas oficiales (Rosa de Bengala y Rivanol) y pertenecían a establecimientos lecheros con aislamiento del agente. Previo al envío a faena de estas vacas, se procedió a la toma de muestras de sangre y leche que se remitió refrigerada para su análisis en el laboratorio. Una vez que las muestras fueron recibidas en el laboratorio se repitieron las pruebas serológicas y la leche individual fue controlada por la Prueba de Anillo en Leche (PAL).

Las leches negativas que se utilizaron para las diluciones fueron extraídas de los tanques de ordeñe de establecimientos que no tuvieron antecedentes de la enfermedad en los últimos 10 años, que no registraban antecedentes de PAL positivo y que las serologías anuales de vigilancia (Rosa de Bengala y Rivanol) sobre todas sus vacas siempre fueron negativas. Luego de agitar en forma conveniente la leche en los tanques de refrigeración se procedió a la toma de estas muestras y su envío al laboratorio. Una vez recibidas las muestras en el laboratorio fueron verificadas a través de la realización de las pruebas involucradas

en este ensayo: PAL, ELISAs y Ensayo de Polarización Fluorescente (FPA).

Las diluciones utilizadas para las leches positivas fueron realizadas sobre base 2, arrancado de la muestra individual. Las diluciones obtenidas fueron de 1 en: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 y 1.024. En el caso de las pruebas de ELISAs se repitió el mismo ensayo y diluciones por dos operadores diferentes, de forma de estimar si el operador podría influir en pruebas que se estiman objetivas en cuanto a la medición del resultado de las mismas.

La prueba PAL fue realizada de acuerdo al protocolo que se utiliza oficialmente en el Uruguay y que surge de las recomendaciones de CEPANZO [6]. A los efectos de estandarizar la prueba y de acuerdo a la experiencia del laboratorio oficial, las pruebas de PAL se realizaron aproximadamente a las 48 horas de obtener las muestras de leche para obtener los resultados más confiables. El protocolo recomienda que las muestras se procesen entre las 24 y 72 horas. Las muestras diluidas se mantuvieron refrigeradas a una temperatura de 4 a 6 °C hasta una hora previa a la realización del PAL, momento en que se las lleva a temperatura ambiente. De acuerdo al protocolo oficial se ajustó el volumen de acuerdo al tamaño del rebaño (n° de animales en lactación). Para diluciones menores a 150 se utilizó 1 ml, para diluciones de 151 a 450 2 ml y para muestras superiores a 451 3 ml. Las muestras se consideraron negativas cuando el anillo de crema es blanco y la columna azul, en los otros casos fueron considerados positivos.

Las tres pruebas de ELISAs indirectas utilizadas fueron realizadas con kits comerciales de IDEXX, POURQUIER y SVANOVA. Se realizaron de acuerdo a los protocolos recomendados por estos laboratorios y utilizaron los puntos de corte también por ellos recomendados. Para la medición de las densidades ópticas de las pruebas de ELISA se utilizó un lector de placas Multiskan II, de Labsystem.

El Ensayo de Polarización Fluorescente se realizó con antígenos conjugado con fluoresceína, utilizando el kit comercial de PRIONICS, realizando la lectura en un lector Sentry para una muestra. Previo al procesamiento de las muestras el equipo es calibrado según especificaciones del proveedor.

En el análisis de los datos se observó la correlación entre los operadores en cada una de las pruebas de ELISA para los títulos obtenidos. Una vez que los datos fueron categorizados en positivos y negativos para cada operador y por prueba de ELISA se estudio el acuerdo entre los operadores a través del estadístico Kappa de Cohen.

La resultados obtenidos para cada prueba fueron analizados por la regresión de «probit» donde la variable respuesta de carácter binario fue el «*resultado*» (negativo=0 y positivo=1) de la prueba y como variables explicativas independientes se incluyeron el logaritmo de base 2 de la dilución «*log_dil*» y la variable categórica «*prueba*» que corresponde a la prueba de diagnóstico utilizada.

Este modelo permite calcular la probabilidad de obtener un resultado positivo basado en la dilución y la prueba utilizada, así como su error estándar de estimación lo cual se utilizó para las estimaciones. El modelo probit utiliza la función de distribución acumulada de la normal estandarizada. Una vez ajustado el modelo se probaron a través de una prueba lineal de hipótesis todos los pares posibles de pruebas de diagnóstico. Rechazándose la hipótesis de igualdad entre las pruebas cuando su valor de probabilidad es menor a 0,05.

Para los análisis estadístico se utilizó el paquete STATA versión 11 [34].

A los efectos de tener una visión del impacto de cada dilución en función de la población de establecimientos lecheros del Uruguay, se analizó la composición del rebaño lechero en función del número de vacas en ordeñe según la declaración jurada de DICOSE 2008.

RESULTADOS

Los valores de correlación entre los títulos obtenidos por los dos operadores diferentes en las pruebas de ELISA fueron: IDEXX 0,96; Pourquier 0,85 y SVANOVA 0,94. Estos valores son en todos los casos altamente significativos y fueron calculados sobre 176 observaciones.

Cuadro 3. Grado de acuerdo entre los dos operadores que realizaron las pruebas de ELISA para leche mezcla en todas las diluciones, los valores de Kappa y su nivel de significación

ELISA	Acuerdo		Kappa	Error Estándar	z	p-value
	Observado	Esperado				
IDEXX	97,73%	84,41%	0,8542	0,0754	11,33	0,0000
Pourquier	91,48%	72,63%	0,6886	0,0678	10,16	0,0000
SVANOVA	94,32%	79,80%	0,7188	0,0743	9,67	0,0000

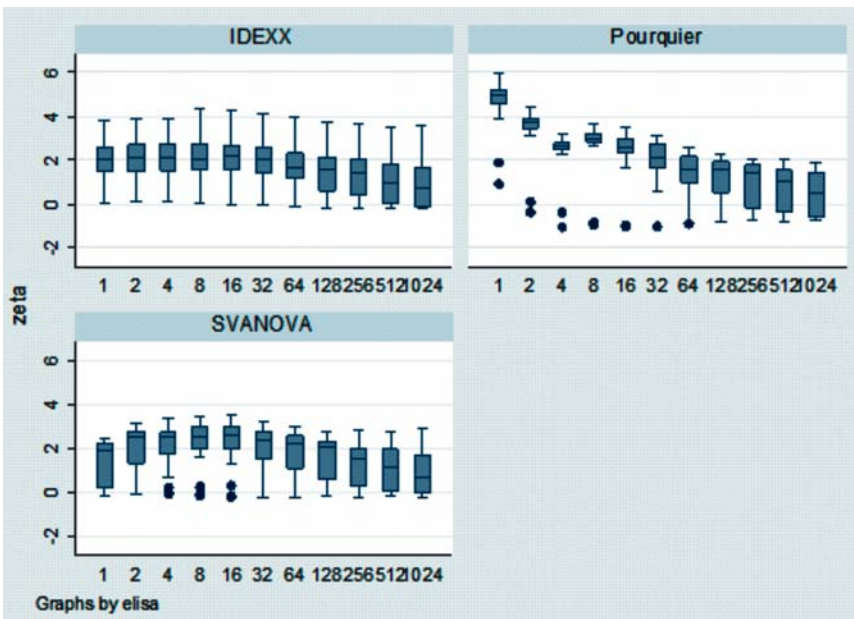

Figura 1. Valores estandarizados de los títulos de ELISA (y) en función de la dilución de la leche brucelósica.

La prueba de Kappa, cuyos resultados se muestran en el Cuadro 3, confirman las mismas tendencias observadas a través de los coeficientes de correlación.

En la Figuras 1 se muestran los títulos para cada kit de ELISA estandarizados al punto de corte recomendado por cada uno de los laboratorios productores. Una línea paralela imaginaria al eje de las «x» que corta el eje de las «y» en el cero está separando los resultados positivos de los negativos.

En el Cuadro 4 observamos el modelo de regresión probit, observando que se trata de un modelo significativo donde las variables explicativas logaritmo en base 2 de la dilución y prueba diagnóstica son significativas.

La Figura 2 nos permite observar la caída de la sensibilidad analítica en función del factor de dilución para cada una de las pruebas en los valores estimados para las mismas a través del modelo de regresión.

La Figura 3 nos muestra la relación entre la sensibilidad analítica y la dilución de real de una vaca positiva según la estimación del modelo probit. En ambas Figuras 2 y 3 es fácil discriminar entre las cinco pruebas diagnósticas utilizadas y ponerlas en orden de sensibilidad.

Lo que estas figuras no dicen es si las diferencias observadas son estadísticamente significativas o se pueden atribuir a las variaciones del muestreo.

En el Cuadro 5 se observan los valores de las prueba de hipótesis posteriores al modelo probit, que comparan cada una de las pruebas diagnósticas con respecto a las otras utilizadas en este trabajo.

Cuadro 4. Modelo de regresión «probit» del resultado de la prueba diagnóstica en función de la prueba (PAL, ELISAs y FPA) y log de la dilución

Probit regression

Number of obs = 891
LR chi²(5) = 185.77
Prob > chi² = 0.0000
Log likelihood = -381.57534 Pseudo R² = 0.1958

result	Coef.	Std. Err.	z	P>|z|	[95% Conf.	Interval]
log_dil	-.1777257	.0151847	-11,70	0,000	-.2074871	-.1479643
Prueba						
1	.3205961	.1442362	2,22	0,026	.0378983	.6032939
2	1.323628	.1465094	9,03	0,000	1.036475	1.610781
3	.93419	.1337148	6,99	0,000	.6721138	1.196266
4	1.085494	.1369201	7,93	0,000	.8171352	1.353852
_cons	1.164675	.1277665	9,12	0,000	.9142571	1.415093

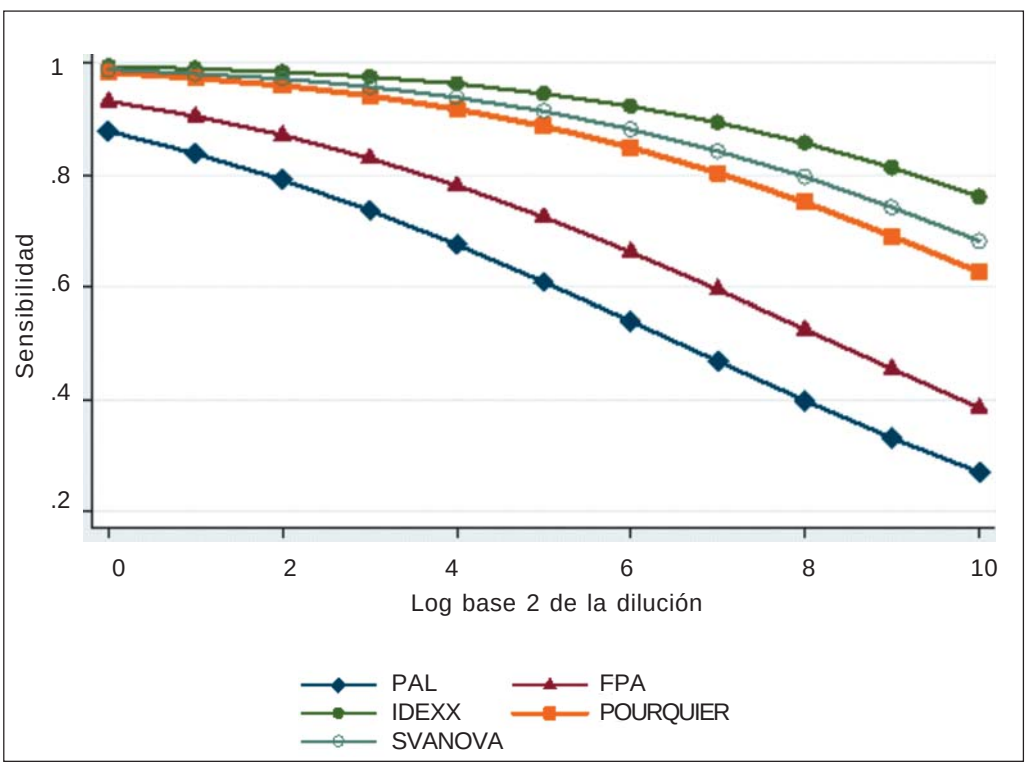

Figura 2. Sensibilidad analítica de las pruebas de diagnóstico sobre leche mezcla (pool) en función de la dilución de la leche de animales positivos.

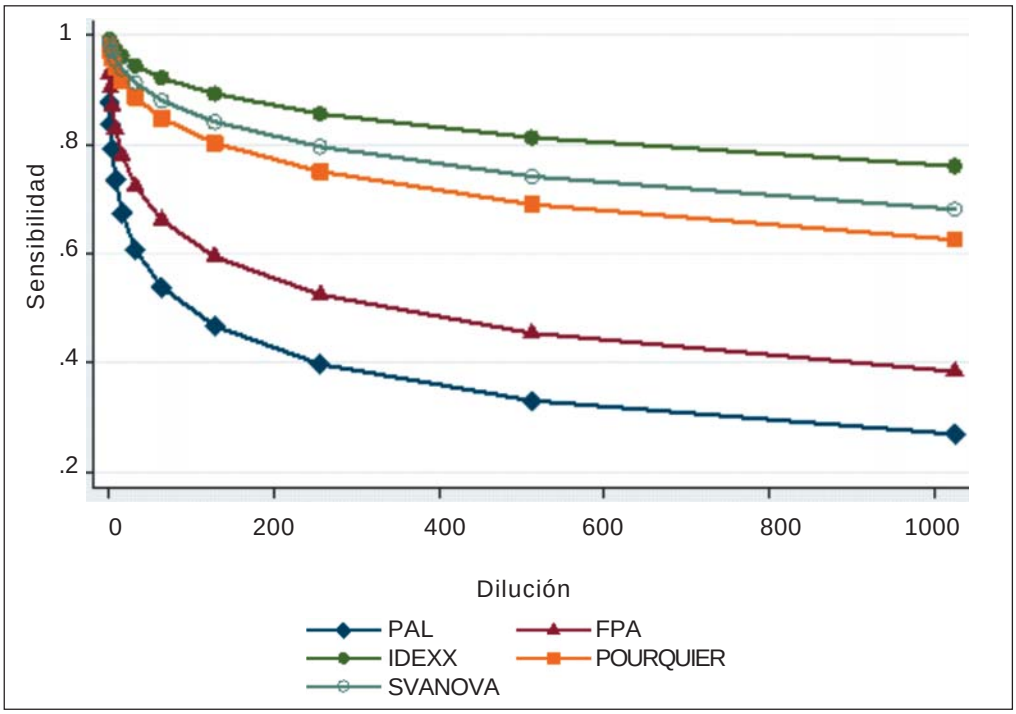

Figura 3. Sensibilidad analítica de las pruebas de diagnóstico sobre leche mezcla (pool) en función de la dilución real de la leche de 1 animal positivo.

Cuadro 5. Chi² de Wald y valor «p» de significación de las pruebas lineales de hipótesis de comparación de pares de las prueba utilizadas

Pruebas	FPA		IDEXX		POURQUIER		SVANOVA	
	Chi²	p-value	Chi²	p-value	Chi²	p-value	Chi²	p-value
PAL	4,94	0,0262	81,62	0,0000	48,81	0,0000	62,85	0,0000
FPA			44,84	0,0000	19,88	0,0000	29,53	0,0000
IDEXX					8,03	0,0046	2,87	0,0904
Pourquier							1,39	0,2386

En el Cuadro 6 observamos la sensibilidad analítica estimada para cada prueba diagnóstica ensayada y su correspondiente error de estimación.

En la Figura 4 podemos observar para Uruguay la distribución de las vacas lecheras y los establecimientos lecheros (tambos) de acuerdo a las diluciones utilizadas para la evaluación de las pruebas de acuerdo a la Declaración Jurada de Lechería de DICOSE.

DISCUSIÓN

Los altos valores de correlación lineal entre los títulos en las pruebas de ELISA, obtenidos en forma ciega por dos operadores sobre las mismas muestras, ponen en evidencia que más allá de errores operativos se trata de pruebas objetivas que le pueden aportar transparencia a la vigilancia de los rebaños lecheros.

El acuerdo entre los resultados obtenidos por dos operadores con las pruebas de ELISAs, utilizando la interpretación de Landis y col. [27] nos muestra que en el caso de IDEXX fue casi perfecto y en los otros dos kits muy buenos (substancial). En base a estos indicadores podemos concluir que las pruebas de ELISAs nos ofrecen resultados con una alta repetitividad y objetividad.

Los resultados de ELISAs estandarizados, que observábamos en la Figura 1,

Cuadro 6. Estimaciones puntuales de sensibilidad analítica y errores estándares por prueba diagnóstica de las estimaciones realizadas a través del modelo de regresión probit según dilución

Dilución	Prueba Anillo de Leche		Polarización Fluorescente		ELISA IDEXX		ELISA POURQUIER		ELISA SVANOVA	
	Estimación	Error Est.	Estimación	Error Est.	Estimación	Error Est.	Estimación	Error Est.	Estimación	Error Est.
1	87,79	12,7767	93,13	13,5709	99,36	14,9740	98,21	13,2021	98,78	13,5083
2	83,82	11,8736	90,45	12,6615	98,96	13,9315	97,26	12,1163	98,09	12,4529
4	79,08	11,1055	87,07	11,8773	98,35	12,9833	95,94	11,1321	97,09	11,5016
8	73,61	10,5021	82,95	11,2444	97,47	12,1513	94,13	10,2788	95,70	10,6823
16	67,50	10,0929	78,06	10,7896	96,22	11,4611	91,74	9,5915	93,81	10,0273
32	60,87	9,9021	72,46	10,5359	94,52	10,9393	88,69	9,1077	91,33	9,5705
64	53,92	9,9423	66,24	10,4979	92,25	10,6110	84,91	8,8609	88,18	9,3409
128	46,84	10,2106	59,53	10,6780	89,33	10,4942	80,37	8,8709	84,28	9,3554
256	39,85	10,6900	52,53	11,0654	85,69	10,5960	75,08	9,1368	79,63	9,6128
512	33,18	11,3537	45,45	11,6395	81,29	10,9102	69,12	9,6375	74,24	10,0945
1024	27,01	12,1717	38,51	12,3744	76,15	11,4194	62,61	10,3389	68,19	10,7705

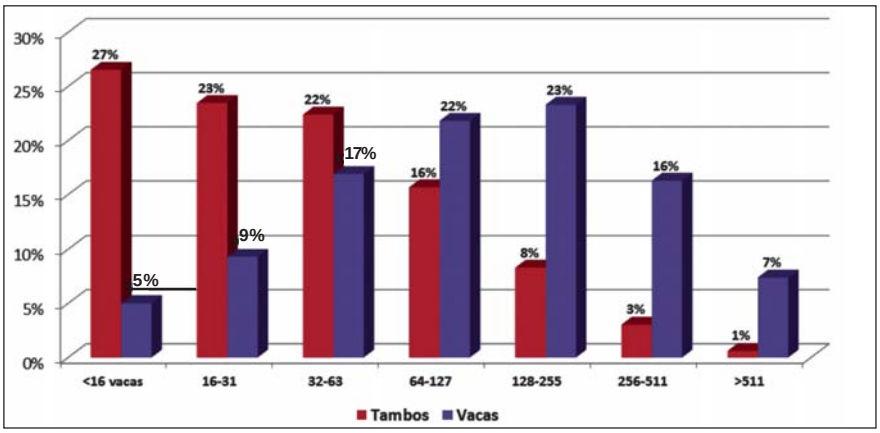

Figura 4. Distribución de la población de establecimientos lecheros y vacas en función del número de vacas lecheras en el establecimiento.

ponen en evidencia la tendencia a la caída de la sensibilidad cuando se incrementa la dilución y que a su vez aumenta la variabilidad de los resultados lo cual es una situación esperable dado las características de este estudio.

En el modelo de regresión de «probit» (Cuadro 4) la variable de respuesta es la distribución acumulada de la normal estandarizada. El modelo incluye dos variables independientes el logaritmo de base 2 de la dilución como variable cuantitativa y la prueba como variable con cinco categorías. Las dos variables muestran un alto nivel de significación para el modelo.

Como es esperable la dilución tiene un coeficiente negativo significando que cuando aumenta cae la sensibilidad analítica para todas las pruebas involucradas.

La variable prueba toma como referencia al PAL correspondiendo los números del cuadro a: 1 = FPA, 2 = IDEXX, 3 = Pourquier y 4 = SVANOVA. Del cuadro se desprende que todos los coeficientes son superiores al cero (positivos) lo que significa que todas las pruebas muestran ser superiores al PAL y esto es significativo como podemos ver por los valores de z y sus valores de probabilidad que en todos los casos son menores a 0,05.

El tamaño de los coeficientes del modelo nos permite ver cuán superiores son cada una de las pruebas al PAL y observamos que el coeficiente menor es FPA y el de mayor valor se corresponde con la prueba de IDEXX. El ordenamiento de las pruebas se puede observar también a través de las Figuras 2 y 3. En estas figuras observamos que las pruebas de ELISAs tienen en todos los casos mayor sensibilidad analítica y que están bien separadas de la prueba PAL y FPA.

El Cuadro 5 muestra los resultados de la comparación de cada una de las pruebas entre sí. En la primera fila del cuadro aparece la comparación de pares entre el PAL y las otras pruebas lo cual reproduce la misma información que lo que veíamos en el Cuadro 4 ya que el Chi^2 en este caso es igual al valor de «z» elevado al cuadrado. Las otras filas del cuadro 5 muestran que así como la prueba PAL es significativamente diferente a todas las pruebas, también lo es la prueba FPA dejando claro que los ELISAs tiene un comportamiento superior. La comparación entre los ELISAs estaría mostrando diferencia entre el kit de IDEXX y Pourquier, inclusive si utilizamos la corrección de Bonferroni para controlar por el número de comparaciones realizadas a través del valor de significación. No contamos con elementos que muestren diferencia entre el kit de IDEXX y SVANOVA en cuanto a la sensibilidad analítica.

En el Cuadro 6 vemos la sensibilidad analítica de las diferentes pruebas, lo cual nos podría ayudar a tomar una decisión si quisiéramos considerar como variable el grado de dilución que se traduce a través del número de vacas en ordeñe en los establecimientos. Aquí podemos observar que la sensibilidad analítica menor de los ELISAs a la más alta dilución (1/1.024) es de 63% lo cual es un

valor comparable al obtenido por el PAL a la dilución (1/32) y con el FPA a la dilución (1/128).

Los valores de sensibilidad analítica del PAL obtenidos son bastante inferiores a los que obtuviera Roepke y col [32] lo cual se puede explicar por otras variables, como las mencionadas por González Tomé y col [19], no consideradas en este estudio como ser el título de la leche de vacas infectadas. No obstante esto se trata de las mismas muestras para cada prueba, lo que a los efectos comparativos es útil.

Pensando en el peor escenario para la detección de un animal positivo, que es cuando hay una sola vaca infectada en el rebaño, claramente las pruebas de ELISA serían las recomendables. Si bien este es el peor escenario para la detección de una muestra por otro lado es el mejor escenario para el control de la enfermedad, o sea su detección en las etapas más tempranas y no esperar a que tengamos muchos abortos y varias vacas infectadas.

Observando cómo se distribuye la población de establecimientos lecheros (tambos) en Uruguay (Figura 4), el cambio de prueba de diagnóstico en los establecimientos con menos de 32 vacas en ordeñe no tendría un impacto significativo en cuanto a la detección de esta enfermedad e incrementaría los costos de la prueba en el 50% de la población de menores recursos. Por otro lado el 86% de las vacas en ordeñe están en el 50% de los tambos que ordeñan más de 31 vacas. Probablemente la diferencia de costos por el cambio de técnica (pasar de PAL a ELISA) será muy rentable para aquellos que hagan una detección temprana de la brucelosis bovina en sus rebaños, lo cual es un objetivo primordial del programa de combate de esta enfermedad.

En conclusión, estos resultados nos llevan a recomendar el cambio de pruebas para la vigilancia sobre leche tanque, pero previo a ello deberíamos tener información sobre la especificidad de estas pruebas a nivel de terreno. Un incremento en el número de «Falsos Positivos» no solo aumentaría los costos sino que haría perder credibilidad a la herramienta de vigilancia que apliquemos sobre la leche tanque y al propio programa.

Andrés D. Gil[*], Alejandra Suanes[*], Alfredo Garín[*], Beatriz di Pace[**], Mariela Silva[*], Beatriz di Pace[*], José Piaggio[*], Álvaro Núñez[*]

[*]Dirección General de los Servicios Ganaderos - MGAP
[**]Facultad de Veterinaria

III. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de las principales pruebas de diagnóstico utilizadas para la vigilancia de rebaños lecheros

INTRODUCCIÓN

Es conocido que la probabilidad de detección de vacas infectadas por *Brucella abortus* con la prueba del anillo en leche (PAL) decrece en la medida que aumenta el tamaño del rebaño, dada la dilución de la muestra [19, 32]. Este cuestionamiento llevó, en el capítulo precedente, al estudio de las sensibilidades analíticas de las diferentes pruebas disponibles para su aplicación sobre muestras de leche mezcla obtenidas de los tanques de ordeñe. En los resultados pudimos observar que si bien la dilución afecta a todas las pruebas, la mayoría de ellas son menos afectadas que el PAL y por lo tanto deberían ser menos cuestionadas que esta prueba para su utilización en la vigilancia epidemiológica.

La sensibilidad analítica de las pruebas de diagnóstico establece la capacidad de dichas técnicas para detectar presencias mínimas de anticuerpos en las muestras compuestas procesadas Si bien la sensibilidad analítica es un buen indicador sobre una prueba de diagnóstico, la misma no nos da información sobre la sensibilidad y especificidad diagnósticas de las pruebas involucradas.

Definimos como sensibilidad de una prueba diagnóstica la capacidad que tiene la misma de identificar como positivo a un individuo, dado que el mismo tiene la enfermedad o infección de interés. P(T+|E+) = Probabilidad de prueba positiva (T+) dado que el individuo está enfermo (E+).

La probabilidad complementaria de la sensibilidad es la probabilidad de obtener un Falso Negativo (FN), o dicho de otra forma la posibilidad de obtener una prueba negativa dado que el individuo está enfermo o infectado.

FN = P(T-|E+) = 1-Sensibilidad.

Definimos como especificidad de una prueba diagnóstica la capacidad que tiene la misma de identificar como negativo a un individuo dado que el mismo está sano, no tiene la enfermedad o infección de interés. P(T-|E-) = Probabilidad de prueba negativa (T-) dado que el individuo está sano (E-).

La probabilidad complementaria de la especificidad es la probabilidad de obtener un Falso Positivo (FP), o dicho de otra forma la posibilidad de obtener una prueba positiva dado que el individuo está sano.

FP = P(T+|E-) = 1-Especificidad.

Obviamente la prueba de diagnóstico ideal es aquella que tiene un 100% de sensibilidad y de especificidad, lo que determinaría la no existencia errores: ni falsos positivos, ni falsos negativos. Este ideal de una prueba perfecta casi nunca es logrado, ya que el aumento de una de las características de las pruebas (sensibilidad o especificidad) generalmente opera en forma contraria a la otra característica. Según los avances en los programas de control de una enfermedad se podrá priorizar alguno de estos aspectos en detrimento del otro, según los costos involucrados con un resultado falso. En

general con situaciones de altas prevalencias se busca pruebas más sensibles y con bajas prevalencias pruebas más específicas, pero obviamente con un balance adecuado de ambas características. En las pruebas que obtienen como resultado una medición (Densidad Óptica, Polarización, etc.) se puede ajustar el punto de corte de acuerdo al objetivo y costos del programa. En las pruebas de carácter categórico no es recomendable modificar el criterio de categorización, pues se incrementa la subjetividad en la evaluación de los resultados.

Los resultados del estudio de sensibilidad analítica destacan que las pruebas de ELISA tienen comparativamente una mayor capacidad de detección en muestras muy diluidas que las otras pruebas utilizadas (PAL y FPA). Reportes de la literatura muestran para las pruebas de ELISA valores de sensibilidades entre 95,3 y 98,1% y especificidades entre 88,1 y 95,1% [31, 40], los cuales ya de por si son muy buenos y son corroborados por otros autores que comparando la prueba PAL con ELISA encuentran 8,3% mayor sensibilidad en estas últimas [28].

Dadas las condiciones de evolución del programa de control de brucelosis en el Uruguay y la potencialidad de otras pruebas diagnósticas para la vigilancia sobre muestras de leche extraídas del tanque de ordeñe, se considera necesario: evaluar la sensibilidad y especificidad de las pruebas de rebaño (PAL, ELISA y Polarización Fluorescente) para las condiciones de producción lechera nacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la sensibilidad y especificidad de las pruebas de rebaño se utilizaron rebaños positivos (focos) y negativos que serán validados por serología. Requiriéndose además que los establecimientos negativos no tuvieran antecedentes registrados de la enfermedad en los últimos 10 años.

Se trabajó fundamentalmente sobre el universo de establecimientos lecheros remitentes a plantas pasteurizadoras en todo el país. De cada uno de ellos a través de su número de DICOSE se corroboró sobre la base de datos del Sistema de Información en Salud Animal (SISA) del MGAP los antecedentes sanitarios relativos a brucelosis de cada uno de los establecimientos involucrados.

Se obtuvieron un total de 1.075 muestras de leche del tanque de ordeñe que fueron enviadas al laboratorio para su procesamiento. De los establecimientos negativos a la brucelosis bovina se utilizaron 990 muestras y de los establecimientos positivos (focos) 85 muestras.

Las muestras de leche de tanque fueron colocadas en frascos de 50 ml y refrigeradas en el laboratorio, posteriormente a la identificación con un número correlativo y distintivo.

Las muestras de leche fueron enfriadas en heladera a 4 ºC por 2 h. Las muestras fueron probadas por la Prueba de Anillo en Leche y luego fueron descremadas mediante el método de centrifugación por 10 minutos a 3.500 r.p.m. y la fracción clarificada se conservó en freezer a -20 °C para su posterior análisis por las pruebas de Polarización Fluorescente y ELISAs.

Para el PAL una hora antes de comenzada la prueba las muestras fueron retiradas de la heladera y llevadas a temperatura ambiente. La prueba de PAL es una prueba que detecta anticuerpos (Ac) en leche contra la *Brucella abortus.* Los anticuerpos reaccionan con el antígeno coloreado de *Brucella* formando un complejo que se adhiere al glóbulo de grasa de la leche y asciende con ellos para formar una capa de crema coloreada.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Se dejó una hora antes a temperatura ambiente la muestra de leche y antígeno.
2. Se mezcló cada muestra invirtiendo varias veces el recipiente.
3. Se colocó 1 ml de leche en un tubo de 12 x 75 mm
4. Se agregó 0,03 ml de antígeno a cada tubo, y mezcló bien invirtiendo el tubo varias veces.
5. Se incubó a 37 ºC por 1 hora.

De acuerdo al protocolo se ajustó el volumen de acuerdo al tamaño del rebaño (n° de animales en lactación). Para diluciones menores a 150 se utilizó1 ml,

para diluciones de 151 a 450 2 ml y para muestras superiores a 451 3 ml. Las muestras se consideraron negativas cuando el anillo de crema es blanco y la columna azul, en los otros casos fueron considerados positivos.

Para la detección de anticuerpos contra *Brucelosis bovina* se utilizó la técnica de ELISA indirecto. Se emplearon 3 kits comerciales de ELISA indirecto del laboratorio IDEXX, POURQUIER® y SVANOVA.

El principio general de la prueba de ELISA indirecto, consiste en que las placas de micro-titulación están tapizadas con un antígeno inactivado de *Brucella abortus*. Cualquier anticuerpo específico para *B. abortus* se une al antígeno que tapiza el pocillo de la placa de micro-titulación y forma un complejo antígeno anticuerpo en la superficie. El material que no queda unido se elimina mediante lavados. Posteriormente se añade un conjugado formado por una IgG-anti-bovina marcada con una enzima, susceptible de unirse a los anticuerpos bovinos que forman el complejo con el antígeno de *B. abortus*. El conjugado no unido se elimina mediante lavados. Por último se añade un sustrato a los pocillos. El grado de color desarrollado (medido como densidad óptica OD) es directamente proporcional a la cantidad de Ac específicos contra *B. abortus* presentes en la muestra.

Si bien el principio de las pruebas de ELISA fue el mismo, existieron diferencias sobre todo en los tiempos de incubación para las diferentes etapas en los diferentes kits comerciales. Para el kit de IDEXX como para el de SVANOVA las muestras requirieron de una incubación a 37 ºC por 1 hs. Para el kit de Pourquier la incubación fueron de 21 ºC por 1 y 30 h.

Para los 3 kits la densidad óptica fue medida a 450 nm en un lector de placas Multiskan II, de Labsystem.

La interpretación de la prueba de ELISA IDEXX y Pourquier se realizó a partir de los valores de densidad óptica obtenidos a 450 nm (DO_{450}). Este valor se obtuvo a partir de la fórmula: S/P = (DO_{450} de la muestra - DO_{450} control negativo) / (DO_{450} del control positivo - DO_{450} control negativo * 100). Para el kit de SVANOVA se determino el porcentaje de positividad (PP): DO de la muestra/ DO control positivo * 100.

Para los tres kit se colocaron controles positivos y negativos los cuales fueron validados en función de las características solicitadas por cada proveedor.

Interpretación de los resultados:

- IDEXX (S/P): negativo < 30%, positivo ≥ 30%.
- Pourquier (S/P): negativo < 55% y positivo ≥ 55%. (Si bien el fabricante define como resultados dudosos los que caen entre >45 y <55 a nuestros efectos fueron considerados negativos).
- SVANOVA (PP): negativo < 10 %, positivo ≥ 10 %.

El principio de la prueba de Polarización Fluorescente (FPA) se basa en la rotación aleatoria de las moléculas en solución. El tamaño molecular es el factor principal que influencia la velocidad de rotación de las moléculas. Las moléculas pequeñas, antígeno (*Brucella abortus*) marcado con isotiocianato de fluoresceína emitirá una reacción que puede medirse por la luz polarizada. Si esta molécula se une a los anticuerpos en solución, presentes en la muestra, aumentará su tamaño y la velocidad de rotación de las mismas descenderá, provocando una medida menor.

La prueba de polarización fluorescente se realizó con un kit comercial de PRIONICS. Para la lectura se utilizó un lector de polarización de fluorescencia (Sentry) para una muestra.

Previo al procesamiento de las muestras el equipo es calibrado según especificaciones del proveedor.

El proveedor del kit utiliza como antígeno un fragmento de bajo peso molecular del OPS del lipopolisacárido de *B. abortus* marcado con isotiocianato de fluoresceína.

Este antígeno se añade al suero de leche diluido y posteriormente se incuba. Por último se obtiene una medida del contenido de anticuerpos mediante un analizador de polarización de fluorescencia en unidades de milipolarización (mP).

El título de corte usado para las muestras de leche fue para los positivos de ≥ 90 mP.

Protocolo de la PFA:

1. Se añade 1 ml de tampón Tris (Buffer) a tubos de vidrio de borosilicato de 10 x 75 mm y después 10 µl de suero de leche. Se mezcla bien. Se obtiene una lectura en el equipo Sentry para determinar la dispersión de la luz.
2. Se añade 10 µl al tubo, volumen de antígeno que corresponda a una intensidad total de fluorescencia de 250-300 x 103 y se mezcla bien. Se obtiene una segunda lectura en el equipo Sentry después de una incubación a temperatura ambiente de 2 minutos.
3. Una lectura superior al umbral predeterminado indica una reacción positiva.

El análisis de los resultados se realizaron utilizando la curva de caracterización operativa ROC (Receiver Operating Characteristic análisis) para cada uno de los ensayos de tipo cuantitativo (ELISAs y FPA). Este análisis genera los gráficos de la sensibilidad en función de los falsos positivos (1-Especificidad) para cada posible punto de corte de las pruebas y comparar las áreas definidas para cada prueba.

El análisis ROC cuantifica la certeza de una prueba diagnóstica u otras modalidades utilizadas para discriminar entre dos estados o condiciones (en este caso infectadas o no infectadas por brucelosis bovina). Esta certeza discriminatoria es medida por la habilidad para clasificar correctamente un individuo (muestra) en las dos categorías posibles (enfermo sano, infectado no infectado, positivo o negativo). El comportamiento global de una prueba es resumido por el área bajo la curva ROC. Esta área se interpreta como la probabilidad que el resultado de una prueba diagnóstica de un individuo infectado seleccionado aleatoriamente, obtenga resultados más altos que los obtenidos por la misma prueba en otro individuo seleccionado aleatoriamente entre los no infectados. Cuanto mayor el área de la curva ROC mejor comportamiento tiene la prueba diagnóstica, correspondiendo el área de una a una prueba perfecta y la de 0,5 a una prueba que no es mejor que el azar para clasificar a un individuo.

Los análisis fueron realizados con el programa STATA/SE versión 11.0 [34].

RESULTADOS

En la Figura 5 se observa la distribución de las muestras de leche tanque para la población de establecimientos positivos (BrB+) y negativos (BrB-) a la brucelosis bovina participante de este estudio. Se observa que la distribución no fue similar, observándose una tendencia a muestras de establecimientos gran-

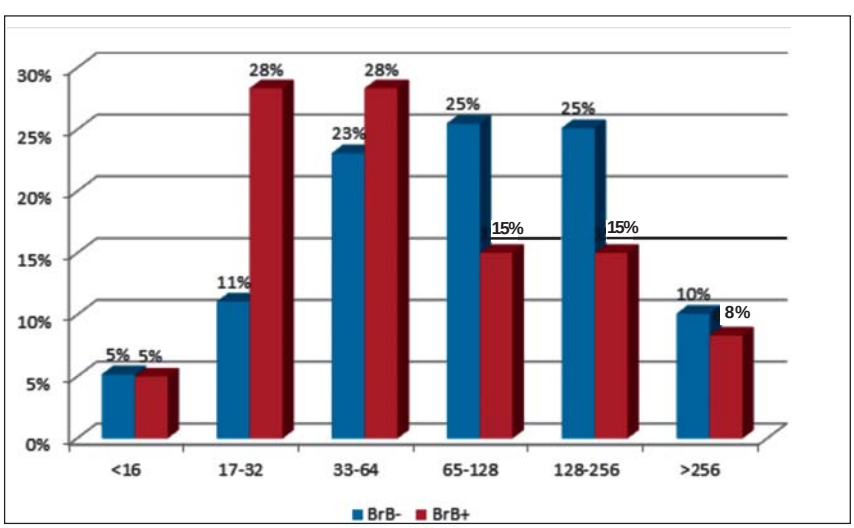

Figura 5. Distribución de las muestras de leche tanque en función del número de vacas en ordeñe para las poblaciones de establecimientos positivos y negativos a Brucelosis bovina.

des en los negativos y una tendencia a establecimientos con menos vacas en ordeñe en las muestras positivas.

En el Cuadro 7 podemos observar los valores de especificidad para cada una de las pruebas empleadas en este estudio así como los errores estándares de la estimación y los límites de confianza del 95%.

Las estimaciones de punto más extremas 92,6% (IDEXX) y 98,8% (Pourquier) correspondieron a las pruebas de ELISA, pero el desempeño general en este parámetro es en todos los casos alto.

Se observa que en el caso del PAL se perdieron 24 muestras (2,4%) y en el caso de la FPA se perdieron 239 las muestras (24%). En el primer caso no se pudieron realizar en tiempo de acuerdo al protocolo y en el segundo corresponden al primer año del estudio donde aún no se había puesto a punto la técnica como para obtener resultados confiables.

En el Cuadro 8 observamos las estimaciones de punto para las sensibilidades, los errores estándares de las mismas y sus intervalos de confianza. En este caso se puede observar que los errores estándares en valores absolutos son muy superiores a los obtenidos para las especificidades lo cual está determinado fundamentalmente por los tamaños muestrales utilizados en uno y otro caso. Estos resultados muestran una superioridad para estos parámetros de las pruebas de ELISAs frente al PAL y FPA, lo cual se puede observar a través de los intervalos de confianza.

En las Figuras 6, 7 y 8 observamos las curvas ROC para cada una de las pruebas de ELISA y en su conjunto. Se observa que salvo pequeñas variaciones todas ellas muestran un buen poder discriminante entre las poblaciones involucradas con áreas cercanas a la perfección. En el Cuadro 9 se reportan las áreas ajustadas para cada prueba y los resultados de la prueba de hipótesis sobre diferencia entre el tamaño de las áreas. El Chi^2 de Wald muestra que no es posible rechazar la hipótesis nula y por lo tanto no se puede demostrar diferencias estadísticamente significativas entre las pruebas de ELISA involucradas ($p \geq 0,26$).

En el Cuadro 10 se resumen los datos a los fines comparativos tomando como valor fijo de la especificidad el logrado por

Cuadro 7. Valores estimados de especificidad, error estándar y límites de confianza del 95% para cada prueba diagnóstica utilizada sobre leche mezcla extraída del tanque de ordeñe de establecimientos sin brucelosis bovina

Prueba	Especificidad		Interv. Confianza 95%		n
	Estimación	Error Estand.	Lím Inf	Lím Sup	
PAL	98,14%	0,4353	97,28%	98,99%	966
FPA	94,94%	0,8003	93,37%	96,51%	751
IDDEX	92,63%	0,8310	91,00%	94,26%	990
POURQUIER	98,79%	0,3483	98,10%	99,47%	989
SVANOVA	97,17%	0,5277	96,13%	98,20%	989

Cuadro 8. Valores estimados de sensibilidad, error estándar y límites de confianza del 95% para cada prueba diagnóstica utilizada sobre leche mezcla extraída del tanque de ordeñe de establecimientos en saneamiento por brucelosis bovina

Prueba	Sensibilidad		Interv. Confianza 95%		n
	Estimación	Error Estand.	Lím Inf	Lím Sup	
PAL	55,29%	5,42	44,51%	66,08%	85
FPA	67,50%	5,27	57,01%	77,99%	80
IDDEX	91,25%	3,18	84,92%	97,58%	80
POURQUIER	82,50%	4,27	74,13%	90,87%	80
SVANOVA	88,75%	3,56	81,67%	95,83%	80

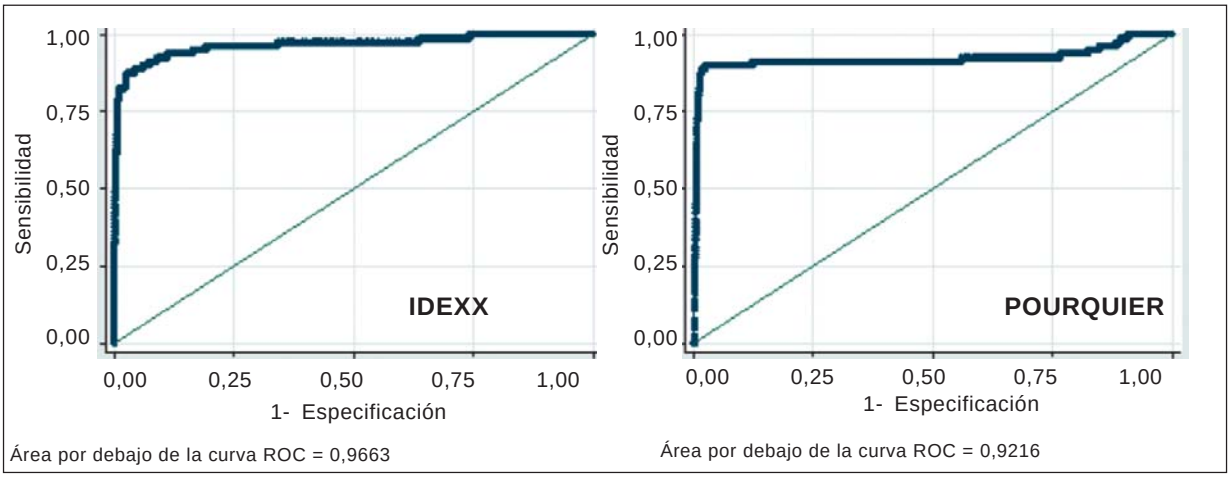

Figura 6. Curvas ROC para las pruebas de ELISA IDEXX y Pourquier.

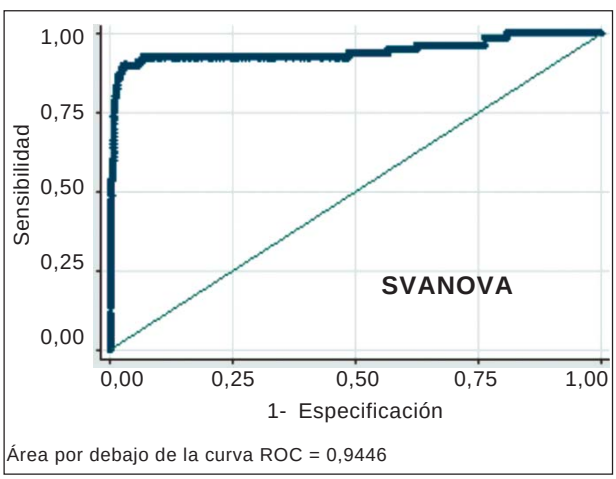

Figura 7. Curva ROC para la prueba de ELISA SVANOVA.

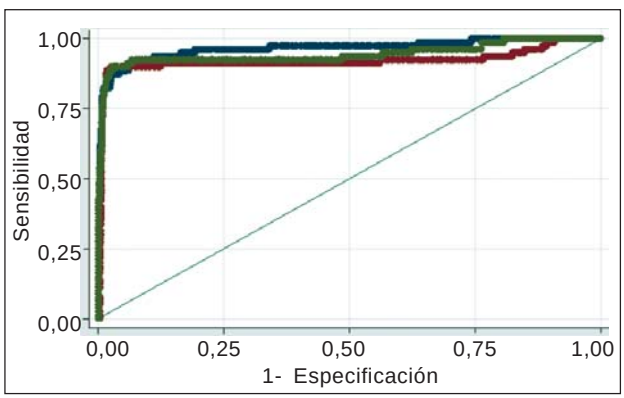

Figura 8. Curvas ROC para las pruebas de ELISA. Los colores corresponden a: azul=IDEXX, marrón=Pourquier y verde= SVANOVA.

Cuadro 9. Áreas ROC y errores estándares de su estimación para las prueba de ELISA

ELISAs	ROC			-Asymptotic Normal-	
	Obs	Area	Std. Err.	[95% Conf. Interval]	
IDEXX	1070	0,9663	0,0132	0,94046	0,99207
POURQUIER	1069	0,9216	0,0260	0,87072	0,97250
SVANOVA	1069	0,9446	0,0200	0,90533	0,98390

Ho:área(1) = área(2) = área(3). $chi^2_{(2)}$ = 2.64 . Prob>chi2 = 0,2668.

Cuadro 10. Valores de sensibilidad y clasificación correcta para una especificidad fija de 98,14%

Prueba	Punto de Corte	Sensibilidad	% corrección
PAL	NC	55,29	NC
IDEXX	➢ 78,47	82,50	97,01%
POURQUIER	➢ 22,69	88,75	97,38%
SVANOVA	➢ 15,69	86,25	97,29%

la prueba PAL 98,14%. Se determinan los puntos de corte de las diferentes pruebas de ELISA para esa especificidad y se extraen los valores de sensibilidad y porcentaje de clasificación adecuada de la población.

DISCUSIÓN

Cuando se diseño este estudio existía un gran número de establecimientos lecheros que estaban identificados como focos activos de la enfermedad. Durante el proceso de evaluación, aprobación y comienzo efectivo del proyecto, la gran mayoría de estos establecimientos se sanearon; lo cual llevo a una extensión en el tiempo de la captura de este tipo de establecimientos para el cumplimiento de los objetivos planteados.

El muestreo de establecimientos negativos fue suficiente en número como para permitir hacer estimaciones sólidas y representativas de la población de establecimientos que remiten leches a plantas procesadoras. Si observamos las Figuras 4 y 5 veremos que las tendencias de los establecimientos negativos a brucelosis bovina de la Figura 5 tienen una distribución más aproximada al de la población de vacas de la Figura 4. Esta situación probablemente se debe a que los establecimientos con pocas vacas en ordeñe tienen una producción más artesanal en el propio establecimiento sin remitir a plantas procesadoras.

Los valores de especificidad obtenidos por todas las pruebas (PAL, ELISAs y FPA) en el peor de los casos fue del 92,6% lo cual se puede considerar satisfactorio para este tipo pruebas que serán utilizadas en la vigilancia epidemiológica como de «*screening*».

Los valores de sensibilidad obtenidos van desde el PAL con 55,3% hasta un ELISA (IDEXX) 91,3%. Estos valores de sensibilidad muestran diferencias entre las diferentes pruebas como ya había sido demostrado en las pruebas de sensibilidad analítica. Probablemente la brecha entre las pruebas es menor debido a que las muestras tienden a provenir de establecimientos con menor cantidad de vacas en ordeñe que lo que sería previsible para los establecimientos remitentes. De todas formas las pruebas de ELISA muestran su superioridad en sensibilidad con respecto al PAL y FPA.

De la comparación de las áreas de las curvas ROC de las pruebas de ELISA se observa que las mismas se aproximan al área máxima y sus diferencias no son estadísticamente significativas. Esta situación y las diferencias en sensibilidad y especificidad de las pruebas de ELISA ponen en evidencia que las diferencias son más atribuibles a los puntos de cortes que a los comportamientos de las pruebas; ya que las de mayores sensibilidades fueron las peores cuando se trato de especificidad.

Este aspecto queda más clarificado cuando establecemos un punto de corte arbitrario para cada prueba de forma de que todas tengan una especificidad como la obtenida por el PAL 98,14% (Cuadro 10). En este caso queda evidente que el PAL sigue teniendo una sensibilidad claramente inferior y que las pruebas de ELISA tiene un comportamiento similar entre ellas.

Los valores de sensibilidad reportados en el Cuadro 10 oscilan entre 82 y 89% los cuales son inferiores a otros reportes de la literatura. Esto puede ser debido a que cuando se extrajeron algunas de las muestras ya hubieren sido eliminados algunos de los reaccionantes positivos. Por otro lado, el tamaño relativamente bajo de la muestra de establecimientos positivos aumentó los errores de muestreo los cuales podrían estar incidiendo. De todas formas hay un amplio margen para ajustar los puntos de cortes de las técnicas de forma de incrementar sustancialmente la sensibilidad sin detrimento de la especificidad.

Estos resultados como los anteriores permiten concluir que sería una medida estratégica el cambio de la vigilancia de los establecimientos lecheros a través de la leche tanque con pruebas de ELISA. De esta forma se tendría una mayor objetividad en las pruebas y se podría reducir sustancialmente los costo de vigilancia en el sector, si pérdida significativa de la eficacia.

Habíamos informado que la utilización de una serología anual por establecimiento lechero tenía un costo aproximado 1,6 millones de dólares.

Con un costo individual por serología de 3,75 dólares según el arancel de la SMVU.

En el Cuadro 11 se trabajo los datos según la hipótesis de cambiar la serología anual por 4 muestreos anuales de leche tanque por establecimiento. Se calcula el costo en función de un costo estimado de US$ 17 por muestra de leche tanque y se estima el número de establecimientos falsos positivos y el número de serologías que esto determinaría por ciclo. El costo final de las 14.500 muestras de leche tanque en el año y de las serologías de los 288 resultados falsos positivos que requerirán 40.088 serologías se estima para el año en US $ 396.836.

Estos valores significarían un ahorro de 1,2 millones de dólares o una reducción del 75% de los costos actuales de vigilancia para el rubro lechero, lo cual tendría un impacto muy favorable.

Cuadro 11. Población de establecimientos lecheros, número de ELISAs por ciclo de vigilancia, previsión de falsos positivos (FP) y costos involucrados

Vacas en ordeñe	N° Tambos	N° de ELISAs	N° Falso positivos	Serologías por FP	US$ Elisa	US$ serología	Total/ ciclo	4 ciclos/ anuales
1 -30	778	778	16	240	13226	900	14126	56504
31- 65	919	919	18	864	15623	3240	18863	75452
66 -100	573	573	11	968	9741	3630	13371	53484
101 -200	742	742	15	2250	12614	8438	21052	84208
200 -500	452	452	9	3150	7684	11813	19497	77988
Más de 500	161	161	3	2550	2737	9563	12300	49200
Total	**3625**	**3625**	**72**	**10022**	**61625**	**37584**	**99209**	**396836**

Andrés D. Gil[*], Alfredo Garín[*], Gabriel Mautone[*] José Piaggio[*]

[*]Dirección General de los Servicios Ganaderos - MGAP

IV. Difusión de la brucelosis entre rebaños, características demográficas y epidemiológicas para definir estrategias de vigilancia y control

INTRODUCCIÓN

Definimos como modelo una representación simplificada de un sistema o proceso real ya sea en forma verbal, física o matemática. Un sistema es una colección de componentes que trabajan conjuntamente para producir un resultado, que es consecuencia de la operación de todas las partes del mismo. La modificación de las entradas del sistema tendrá influencia en esos componentes y afectará los resultados de salida.

En el Uruguay no hay antecedentes de modelos estocásticos de simulación sobre enfermedades de interés veterinario. Se considera esta una buena oportunidad de comenzar a desarrollar esta área, que es muy importante en los aspectos de planificación y apoyo a los programas de control y/o erradicación de las enfermedades.

En el desarrollo de esta propuesta participaron las unidades de la Dirección General de los Servicios Ganaderos involucradas en el Programa de Brucelosis Bovina y por otro lado el departamento de Bioestadística e Informática de la Facultad de Veterinaria.

La mayoría de los modelos de simulación para enfermedades animales más desarrollados, han sido creados para simular la dispersión de fiebre aftosa y otras enfermedades altamente contagiosas. Solo unos pocos modelos han sido desarrollados para simular la dispersión de enfermedades endémicas de carácter más crónico como lo es la Brucelosis bovina [1, 4, 5, 9, 18, 20, 26, 29, 36, 37, 38].

Un modelo de simulación de una enfermedad generalmente es utilizado para analizar los efectos de planes alternativos de control y estimar las perdidas en productos como ser carne y leche. La determinación de las pérdidas físicas y los costos de las intervenciones, que generalmente son incluidos en las salidas de los modelos de simulación, pueden ser utilizados como los parámetros para los posteriores estudios económicos [1].

La primera etapa en el desarrollo de un modelo de simulación es el desarrollo de un modelo conceptual, que recoja los principales componentes del sistema a simular. En este caso el modelo conceptual deberá recoger los principales elementos epidemiológicos que determinan la presencia y difusión de la enfermedad, así como también los procesos de intervención que se pudieran aplicar para su control.

La siguiente etapa consiste en el desarrollo de módulos del modelo de simulación que permitan estimar la difusión de la enfermedad entre rebaños en las condiciones pastoriles del Uruguay frente a diferentes: giros productivos (leche-

ros y ganaderos), estrategias de vigilancia y control y factores geográficos y epidemiológicos. El objetivo del modelo entre-rebaños es observar los resultados de la interacción entre la presencia y difusión de la enfermedad y los sistemas de vigilancia y prevención de la *Brucelosis bovina* que se pudieran aplicar. Las salidas permitirán el estudio de costos, pérdidas y recursos necesarios para el combate.

MATERIALES Y MÉTODOS

A través de la conformación de un equipo multidisciplinario, la revisión de la literatura y a la opinión de expertos se desarrolló el modelo conceptual con dos módulos principales. El primer módulo representa la epidemiología y difusión de la enfermedad entre rebaños (Figura 9) y el segundo las diferentes intervenciones que puede aplicar un programa de control de la *Brucelosis bovina* (Figura 12).

Se simulará la difusión de la enfermedad entre rebaños en las condiciones pastoriles del Uruguay frente a diferentes: tipos de producción (lecheros y ganaderos), estrategias de vigilancia y control y factores geográficos y epidemiológicos. Se procederá a la descripción cada uno de los componentes conceptuales del modelo y luego se establecerán las relaciones entre los mismos. Para los análisis preliminares y la implementación se utilizó como software de base @risk y Stata/SE [34].

La información de base analizada, se corresponde a los sistemas de información de la Dirección General de los Servicios Ganaderos (DGSG) a través de los sistemas información en Salud Animal (SISA), muestreos nacionales, sistemas de información geográfica, bases de datos de movimientos y bases de datos de existencias ganaderas. Estos datos proporcionarán los insumos básicos de entrada en el modelo.

MODELO EPIDEMIOLÓGICO

El ciclo natural de esta enfermedad se puede separar arbitrariamente en su difusión a través de los rebaños y su difusión dentro de los mismos. En este capítulo nos centraremos exclusivamente en la situación entre los rebaños en el Uruguay, siendo por lo tanto estos nuestra principal unidad de análisis.

Se define como rebaño a un conjunto de animales que comparten un espacio físico (establecimiento ganadero) y un manejo común independiente de los propietarios de esos animales [28].

En el Uruguay se definen 44.808 unidades físicas productivas con bovinos, que a los efectos de este trabajo serán consideradas como rebaños. Los rebaños se caracterizan según su giro productivo (ganadería de carne o lechería), pues su manejo, composición y riesgo frente a la enfermedad son diferentes. La situación sanitaria de estos rebaños se esquematiza en el modulo 1 del modelo conceptual que dio origen a la Figura 9.

La unidad de tiempo que utilizará el modelo «t» será anual, ya que la característica de ser crónica de esta enfermedad y su asociación al ciclo reproductivo del bovino que también es anual permiten caracterizar la evolución del estado sanitario de un año hacia otro [8, 17, 24, 25].

Desde el punto de vista de la enfermedad los rebaños son categorizados en un tiempo «t_0» como infectados o libres de la enfermedad. La transmisión entre rebaños se dará desde los infectados a los no infectados en forma genérica por movimiento de material infectivo o contaminado (fetos, placentas, instrumentos, etc.) y de los contactos a través de los alambrados que determinan los límites entre los rebaños (contacto por contigüidad o linderos).

Los rebaños infectados se clasifican en dos grupos los detectados y los no detectados. Estos últimos son establecimientos infectados sin programas de control y sin limitaciones para transmitir la enfermedad.

Los rebaños detectados (focos de la enfermedad) son aquellos que su estatus sanitario ha sido determinado por los sistemas de vigilancia aplicados. Estos rebaños están cuarentenados (imposibilitados de mover animales susceptibles con destino a otros rebaños) y en proceso de saneamiento que consiste en la identificación de animales infectados y sacrificio de los mismos, hasta la extin-

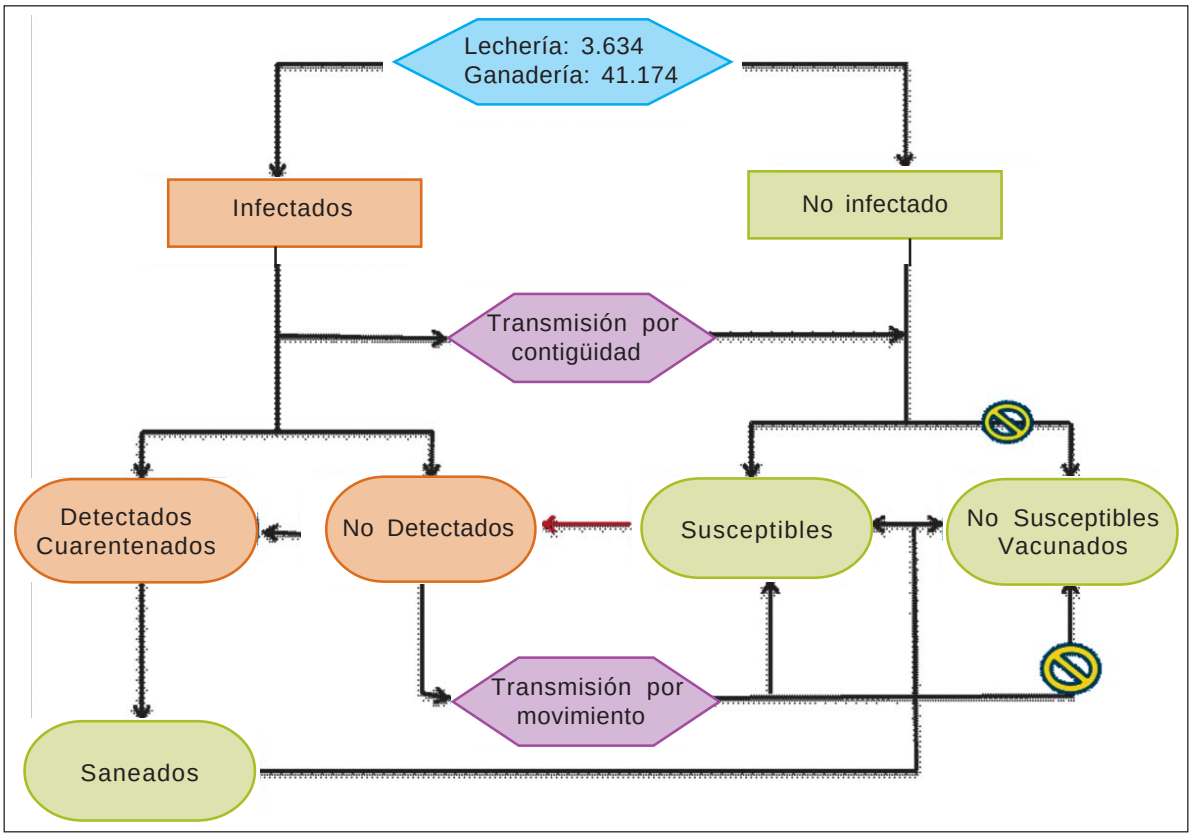

Figura 9. Modelo conceptual de difusión de la Brucelosis bovina entre rebaños.

ción de la infección y eliminación de las fuentes de infección. Una vez concluido el proceso de saneamiento estos rebaños pasan a la categoría de «No Infectados».

Los rebaños «Infectados», «No Detectados» son las principales fuentes de transmisión entre rebaños ya que el movimiento de cada animal portador con destino a un establecimiento «No Infectado» determinará que este se infecte y pase a la categoría de un nuevo rebaño infectado «No Detectado».

Se realizó un análisis de la base de datos de movimientos del año 2009 para las categorías susceptibles por tamaños de los rebaños dentro de cada giro productivo de forma de poder caracterizar (modelar) los mismos.

Según el Sistema de Información en Salud Animal (SISA), al mes de abril del 2010 hay 343 rebaños infectados-detectados, de los cuales aproximadamente el 8% son del giro lechero, Figura 10. Los rebaños «infectados-no-detectados», por el actual sistema de vigilancia, se estimaron a través de un muestreo nacional que se finalizó a diciembre del 2009 [21].

Dentro de los rebaños «No Infectados» se han categorizado los mismos en dos grupos «Susceptibles» y «No susceptibles». Los rebaños susceptibles son aquellos que se infectarán cuando tengan oportunidad de contactarse con fuentes de infección.

Se consideran rebaños «No Susceptibles» aquellos en que sus categorías susceptibles han sido vacunadas, asumiéndose para estos casos que el contacto con fuentes de infección no serán efectivas para la transmisión de la enfermedad. Se establecerá la proporción de estos rebaños en función de la tasa de cobertura de vacunación de rebaños.

La tasa de difusión de la brucelosis a nuevos rebaños se estimará en función del número de animales portadores que se moverán de establecimientos infectados-no-detectados a susceptibles. La tasa de detección de rebaños infectados será función de la historia natural de la enfermedad y de la cobertura del sistema de vigilancia.

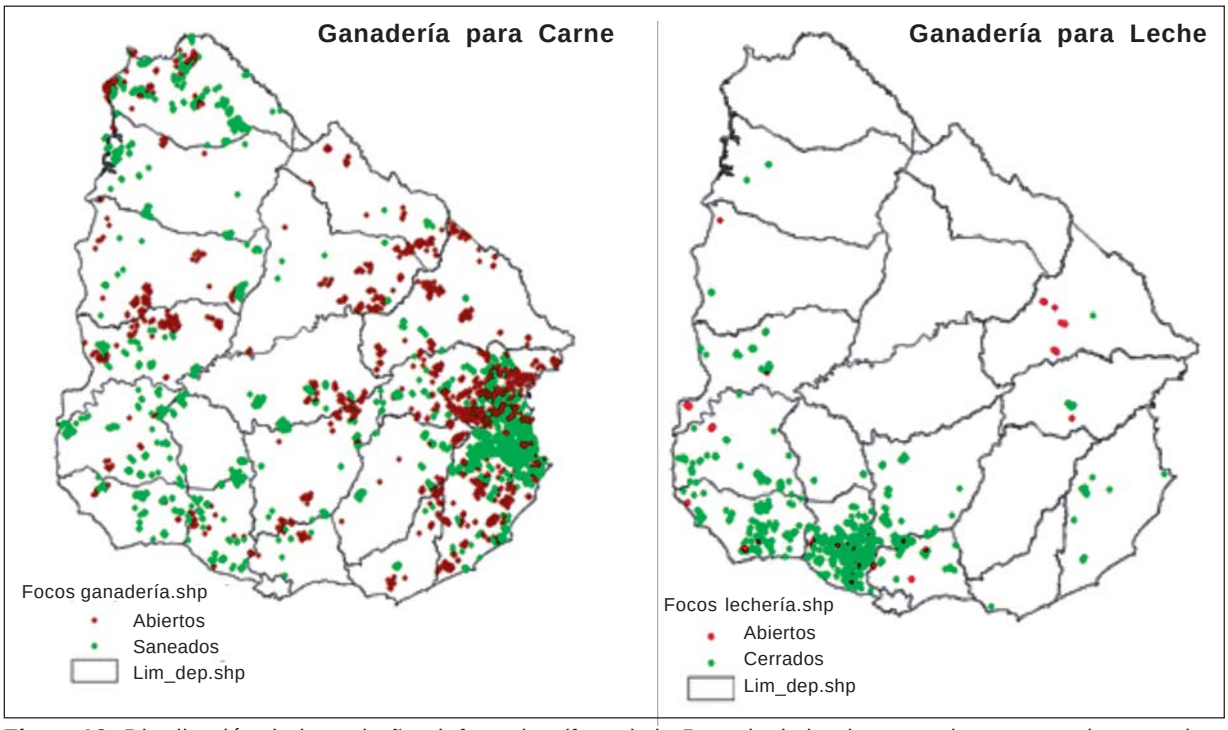

Figura10. Distribución de los rebaños infectados (focos) de Brucelosis bovina actuales y saneados para los giros de ganadería para carne y lechería.

Se ajustará un modelo estocástico de transición SIC (susceptible-infectado-cuarentenados) [38], Figura 11. La suma del número de rebaños en cada uno de estos estados es igual a la población.

El modulo 2 del modelo conceptual se refiere a las principales intervenciones que se pueden aplicar para el control y erradicación de la enfermedad. En este modulo nos centramos sobre los aspectos de vigilancia epidemiológica, dado que aspectos como vacunación han sido liberados al uso voluntario con niveles muy bajos de implementación y el saneamiento está regulado de forma similar a los programas de control y erradicación tradicionales. De esta forma la variable que ofrece más opciones y tienen un mayor impacto sobre costos y detección de rebaños enfermos es la vigilancia y su cobertura lo cual es esquematizado en la Figura 12.

La denuncia de abortos es de carácter obligatorio en el Uruguay, pero no es realizada asiduamente por los productores. En la literatura es reconocida esta forma de vigilancia como muy efectiva para la detección temprana de la enfermedad [20, 37]. Dado el manejo y el mayor control ejercido en la ganadería para leche sobre el rebaño, es más probable que el aborto sea detectado en estos y poco probable de hacerlo en la ganadería para carne extensiva donde hay un bajo nivel de control individual. Los datos históricos permiten simular esta situación.

Los muestreos de campo son realizados para establecer la evolución de la prevalencia de la enfermedad y los cam-

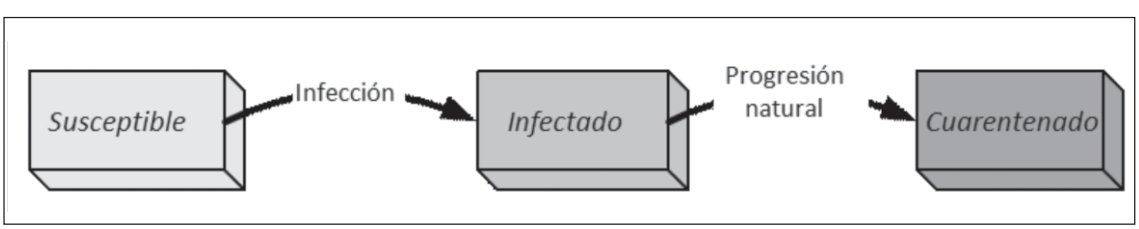

Figura 11. Modelo sencillo de transición de estado de la *Brucelosis bovina* entre rebaños. **SIC** (Susceptible, Infectado y Cuarentenado).

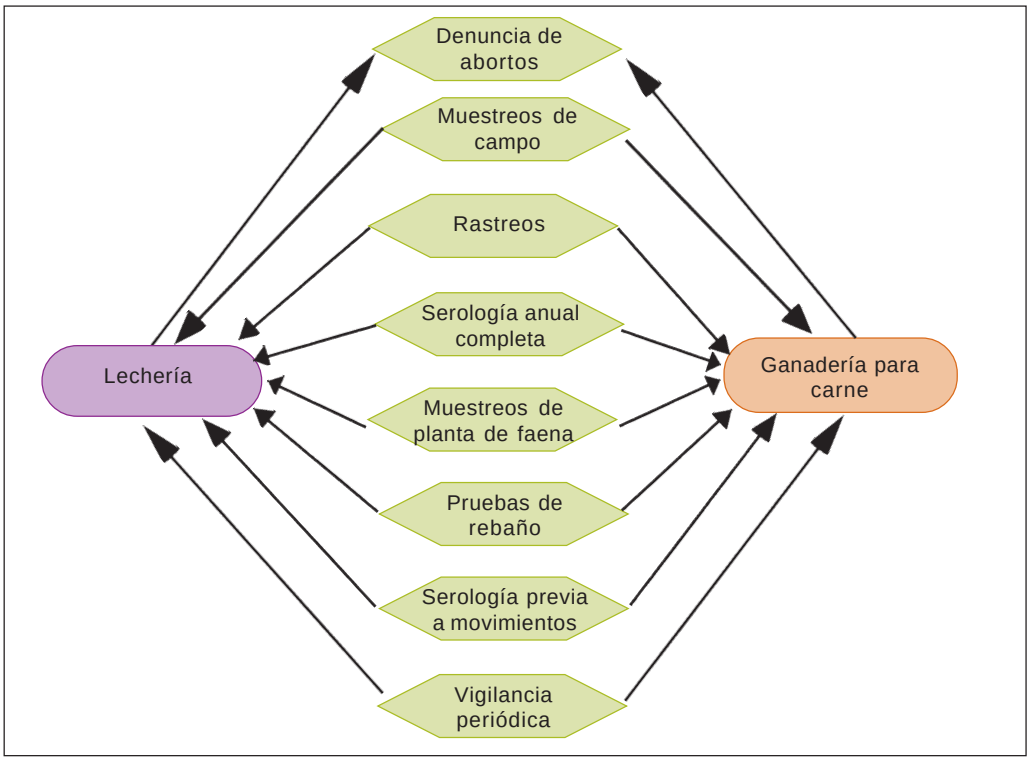

Figura 12. Métodos de Vigilancia Epidemiológica que se aplican (líneas oscuras) o pueden aplicar (líneas más claras) a la brucelosis bovina según los giros de producción de ganadería (carne o leche).

bios en las tendencias en estas. Su objetivo no es precisamente la vigilancia y detección de la enfermedad, pero cuando esta es detectada se aplican las normativas vigentes. Esta situación lleva a que, para algunos, estos esfuerzos sean considerados como una forma más de vigilancia. Como el modelo de muestreo aplicado está definido se puede simular sin inconvenientes.

Los rastreos que implican la investigación de los linderos de los rebaños infectados-detectados, así como los movimientos de entrada y salida de animales susceptibles por lo menos de los producidos en el último año, son una herramienta fundamental en todo programa de control de la brucelosis. La modelación de los movimientos con destino a otros rebaños y la distribución del número de rebaños linderos permiten simular los «rastreos».

La serología anual completa es aplicada desde hace varios años a los rebaños lecheros y en algunos momentos se propone como una opción para los ganaderos para algunas áreas geográficas. Se trata de un sistema de vigilancia con una alta efectividad, pero con un muy alto costo y con problemas logísticos importantes que deben ser analizados cuando se considera su aplicación.

Los muestreos en plantas de faena (MPF) son una estrategia aplicada en numerosos países que han erradicado la enfermedad durante el proceso de erradicación y como sistema de vigilancia luego que esta ha sido lograda [37]. En Uruguay se aplicó en forma limitada y actualmente se está incrementando en forma sustancial. Un insumo trascendente para esto es la caracterización de los movimientos con destino a faena de las categorías susceptibles de los rebaños, lo cual se ha realizado con la base de datos de movimientos del año 2009.

Las pruebas de rebaño se vienen aplicando en los lecheros a través de la prueba de anillo en leche (PAL), que no ha funcionado correctamente en el Uruguay. En los capítulos precedentes se reporta información de cómo mejorar la detección de las pruebas sobre leche tanque, a través de los cambios de prueba a utilizar. Este método es generalmente considerado muy eficiente en rela-

ción al costo involucrado.Pruebas de rebaño para ganadería para carne, solo sería posible a través de la utilización de muestras compuestas (*pooles*) de sueros, lo cual podría ser una opción aplicable a través de los MPF o en otras situaciones.

La serología previa a movimiento ha sido aplicada en la mayoría de los países que han logrado erradicar la enfermedad [8]. Se trata de una medida preventiva que evitaría el ingreso de la enfermedad en la mayoría de los rebaños y que en la medida que el productor la entienda, la exigiría en forma independiente de su obligación legal. En el Uruguay es cuestionada por algunos sectores y se aplica en forma parcial según diferentes áreas del territorio.

La Vigilancia Periódica de los rebaños que podría ser realizada en forma sistemática a través de muestreos anuales, es una opción alternativa y/o complementaria, que si bien no tiene antecedentes internacionales podría teóricamente ofrecer una opción de costo limitado para disminuir el riesgo y aumentar la detección de rebaño infectados-no-detectados.

Estos sistemas de vigilancia podrán ser modelados con distintos niveles de cobertura y utilizando diferentes herramientas de diagnóstico de laboratorio, considerando sus costos y modelando también su comportamiento.

MODELO DE SIMULACIÓN

Como se expreso en la figura IV.3 el modelo de transición de estados es relativamente sencillo. A los estados de transición propuestos para los rebaños SIC (Susceptible, Infectado y Cuarentenado) debemos agregar el estado de «No Susceptible» (Vacunado) que se puede considerar como fuera del modelo de simulación al asumir que no transita de un estado al otro en el período. Dicho de otra forma los rebaños vacunados no juegan ningún papel en el modelo, ya que asumimos resistencia a la infección y no son fuente de la misma, lo que equivale a su remoción del sistema.

El número de individuos (rebaños) en cada estado y en cada período depende del número de individuos en cada estado en el período anterior y de las probabilidades de transición.

En un modelo de transición de estado determinista: las probabilidades de cada transición nunca cambian. En el modelo planteado las probabilidades de transición cambiaran con el tiempo en forma estocástica para representar eventos aleatorios o variación natural.

Como se observó en la Figura 9 los rebaños infectados se categorizan en «Detectados» y «No detectados». Los rebaños detectados Cuarentenados (Interdictados) y en proceso de Saneamiento. Los rebaños no detectados están en función de la introducción reciente del agente en «incubación o latencia» (sin evidencias serológicas) y de la falta de sensibilidad del sistema vigilancia por: baja prevalencia, pruebas diagnósticas imperfectas y/o falta de cobertura en la vigilancia.

Como se observó en la Figura 10 la distribución geográfica de la enfermedad no parece aleatoria, sino como en la mayoría de las enfermedades infectocontagiosas se observan conglomerados geográficos que determinan que el riesgo no sea homogéneo en todo el territorio. Esto se ve reforzado en un sistema extensivo de producción basado en pasturas, ya que el tipo de suelo estará determinando la potencialidad para diferentes sistemas productivos, así como la densidad de animales, lo cual afectará directamente la tasa de contacto entre los mismos y los manejos aplicados. Basado en estos aspectos se decidió que la unidad geográfica de trabajo para el modelo es la Sección Policial.

Para la caracterización geográfica de las secciones policiales para la brucelosis bovina se pensó que podría hacerse en función de tres parámetros ya sea en forma independiente o combinada, siendo estos: prevalencia en la población de bovinos, porcentaje de animales expuestos y prevalencia de los rebaños bovinos. El primer parámetro fue descartado, ya que los datos disponibles no eran de buena calidad.

En función del segundo parámetro propuesto se tomaron como base los rebaños para cada sección policial (SP) que eran focos activos a diciembre del 2008 o fueron identificados como infecta-

dos entre enero 2009 y abril 2010. De estos rebaños se asumió que toda su población susceptible había sido expuesta y se calculó su porcentaje para cada sección policial con respecto a la declaración jurada de DICOSE 2009. En la Figura 13 se observa la distribución de las categorías de las seccionales según el porcentaje de sus animales susceptibles involucrados.

Para el tercer parámetro propuesto también se tomaron como base los rebaños que eran focos activos a diciembre del 2008 o fueron identificados como infectados entre enero 2009 y abril 2010. En función de ese número de focos y la población de rebaños de cada sección policial, con respecto a la declaración jurada de DICOSE 2009, se calculó la prevalencia de rebaños con brucelosis bovina. En la Figura 14 se observa la distribución de las categorías de las seccionales, según la prevalencia de rebaños para la brucelosis bovina.

Se puede observar cierto paralelismo entre la categorización de ambos mapas, pero se optó por la categorización en función de la prevalencia de rebaños afectados porque se trata de un modelo de difusión entre rebaños y es la situación donde no se debió hacer supuestos muy fuertes.

El único supuesto es que no existan sesgos importantes en la detección entre las diferentes seccionales policiales. Obviamente este supuesto se debe de realizar para los dos sistemas de categorización. Además, la calidad de los datos con los cuales se elaboró está información son los que ofrecen mayor seguridad; ya que se puede asumir que el nivel de omisión debe ser mínimo en el registro de los focos detectados y la población de rebaños surge de la declaración jurada de DICOSE. En conclusión, la categorización geográfica de la Figura14 es la utilizada en el modelo.

Esta categorización diferencia cinco tipos de seccionales policiales en función de su prevalencia de rebaños a la *Brucelosis bovina* yendo desde el no registro de la enfermedad hasta más del 4% de los rebaños afectados en el período analizado.

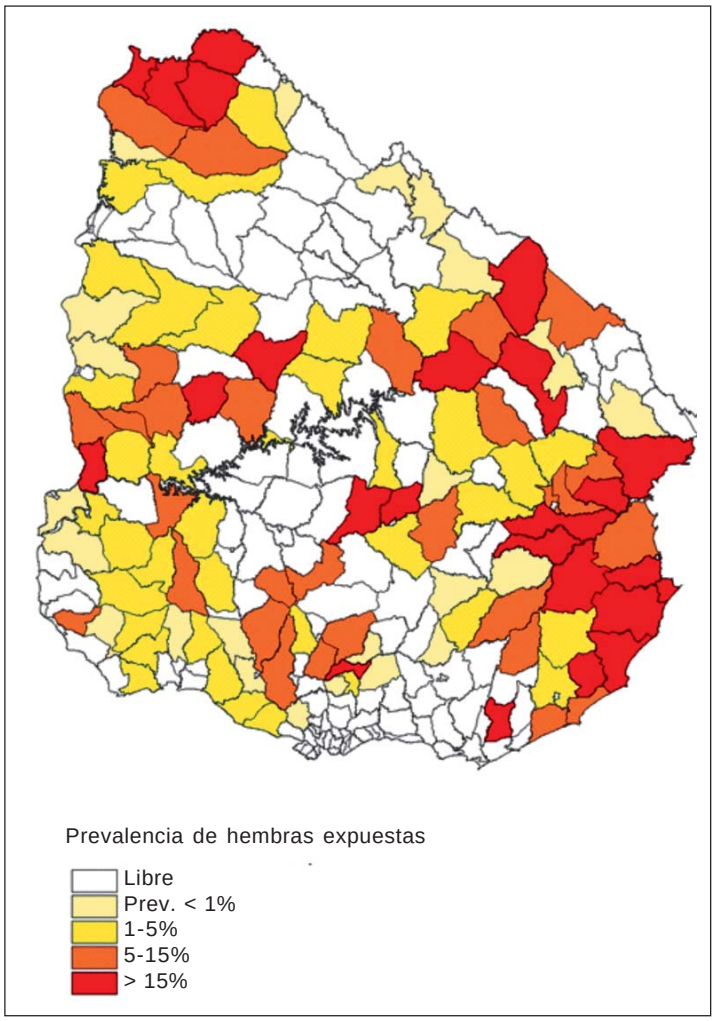

Figura 13. Caracterización de las Seccionales Policiales departamentales en función del porcentaje de bovinos susceptibles a la Brucelosis bovina expuestos en las mismas.

En el cuadro 12 podemos observar la distribución de los rebaños, focos de la enfermedad y población susceptible en función de la categorización geográfica de la enfermedad. De este cuadro se observa que el 42% de los rebaños del país están en áreas sin registros de la enfermedad, así como el 36% de la población susceptible. Por otro lado si nos fijamos en las áreas con mayores prevalencias 2% o más de los rebaños afectados estas áreas concentran el 67% de los focos y solo el 16% de los rebaños y el 24% de la población susceptible.

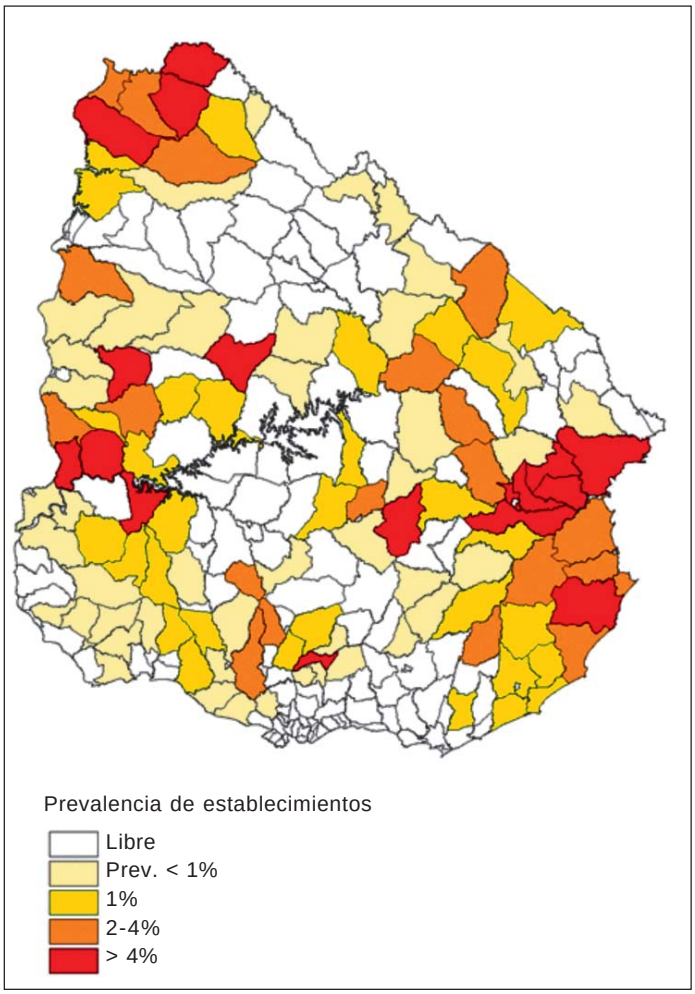

Figura 14. Caracterización de las Seccionales Policiales departamentales en función del porcentaje de rebaños afectados por la *Brucelosis bovina* en el período enero 2009 – abril 2010.

Cuadro 12. Distribución de los rebaños bovinos, rebaños afectados (focos) y población bovina susceptible según los niveles de prevalencia de los rebaños en el Uruguay

Regiones	Rebaños	Focos	Pobl. Susc.
Sin registro	18.989	0	2.255.469
< 1%	12.150	65	1.418.005
1 - 2%	6.565	97	1.111.657
2 - 4%	4.496	133	885.012
> 4%	2.608	196	599.798
Total	**44.808**	**491**	**6.269.941**

Además del factor regional y del giro productivo (carne, leche), ya mencionados como componentes poblacionales relevantes, consideramos un tercero que es el del tamaño de los rebaños. El tamaño de los rebaños está generalmente asociado al tipo de producción, manejo y riesgo para *Brucelosis bovina*. En función de esos aspectos se establecieron siete categorías de rebaños en función de la población susceptible (hembras y machos enteros bovinos de 1 año de edad o mayores).

En el Cuadro 13 observamos cómo se distribuyen los rebaños para cada giro productivo en función de la población susceptible que ellos tienen. Se destaca de ese cuadro que hay 2.473 rebaños bovinos (5,5%) sin población susceptible, obviamente se trata de establecimientos exclusivamente engordadores de novillos o campos recría de terneras.

Al observar la distribución para cada giro en función de las frecuencias relativas de las diferentes categorías de tamaño se manifiesta un comportamiento diferente para cada uno de ellos, Figura 15. La distribución de los establecimientos lecheros es más simétrica y en cierta medida más homogénea. Por otro lado el giro de rebaños para carne tiene un alto porcentaje de rebaños con poblaciones chicas, destacándose que el 41% están en la categoría de 1 a 30 animales susceptibles.

Si bien resulta obvio que el manejo está muy influenciado por el tipo de producción y el tamaño poblacional, probablemente no lo sea tanto para el riesgo de la brucelosis bovina aunque este reportado en la literatura. Es fácil de imaginar que rebaños más grandes ofrecen mayores posibilidades de mantener el agente en la población una vez que este se instala. Un ejemplo claro de cómo se incrementa el riesgo para cada giro de producción se observa en la Figura 16 donde se gráfica el número de focos cada mil rebaños en función de la población susceptible de los mismos en el Uruguay.

Cuadro 13. Distribución de los rebaños bovinos por giro de producción según el tamaño poblacional de las categorías susceptibles a la brucelosis bovina en el Uruguay

Población	Ganadería	Lechería	Total
0	2.464	9	2.473
1 -30	16.818	778	17.596
31- 65	6.345	919	7.264
66 -100	3.345	573	3.918
101 -200	4.922	742	5.664
200 -500	4.533	452	4.985
Más de 500	2.747	161	2.908
Total	**41.174**	**3.634**	**44.808**

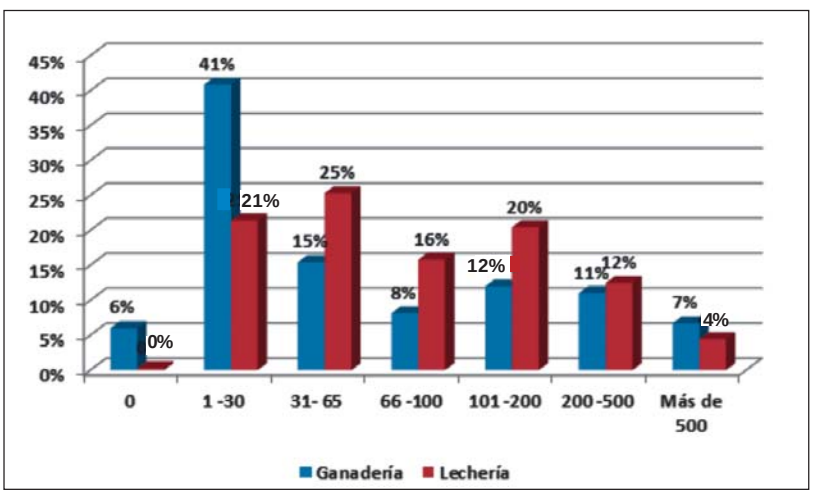

Figura 15. Distribución de la población de rebaños por tamaño poblacional (n° de bovinos susceptibles) para cada giro productivo.

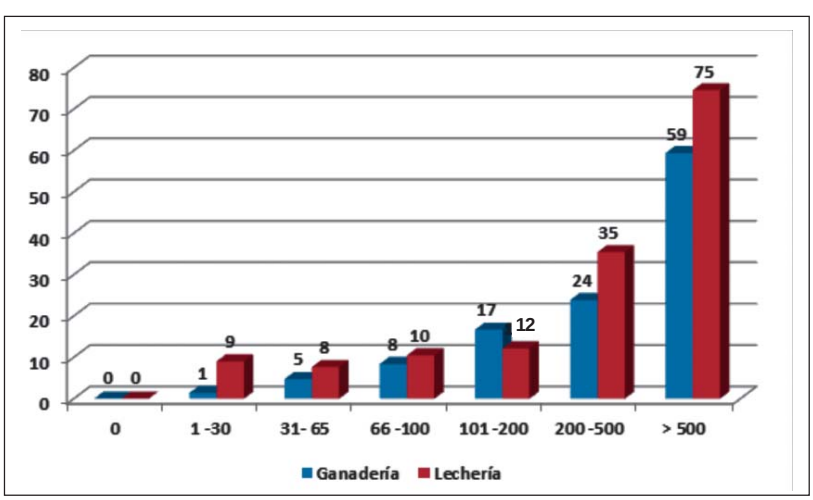

Figura 16. Número de focos de Brucelosis bovina cada mil rebaños, para cada giro productivo, en función del tamaño de la población susceptible de los mismo.

En conclusión las unidades de entrada al modelo implican una caracterización geográfica de las seccionales policiales en cinco regiones en función de la prevalencia de los rebaños a la brucelosis bovina y dentro de estos están categorizadas en dos giros productivos (carne y leche) y dentro de los mismos en siete categorías en función del tamaño del rebaño. Estos anidamientos nos dan 70 unidades teóricas de entrada al modelo.

Como resumen de la información manejada en la Figura 17 se observa la distribución de los rebaños, población susceptible y focos de la enfermedad lo cual marca diferencias sustanciales entre las regiones determinadas evidenciando la importancia de esta categorización.

TRANSMISIÓN ENTRE REBAÑOS

Como se esquematizó en la Figura 9, la transmisión entre rebaños se prevé a través del movimiento de animales portadores o por contigüidad de los rebaños infectados y susceptibles.

Transmisión por movimiento de portadores

Nos referiremos en primera instancia a la transmisión de la brucelosis bovina a través del movimiento de un reemplazo infectado que ingresa a un establecimiento limpio (susceptible).

El primer supuesto importante en este tipo de transmisión es que los rebaños infectados detectados (focos) de la enfermedad están cuarentenados (interdictados) y por lo tanto no participan de esta transmisión (son excluidos de la consideración en esta transmisión).

Como base para modelar esta transmisión de la brucelosis utilizaremos la función doble binomial desarrollada por Beal y reportada por Amosson y Dietrich [1].

Los parámetros de la función son: ***p***, ***s***, ***q***, ***m*** y ***n*** definiéndose de la siguiente forma:

p = proporción de vacas en rebaños infectados con relación al total de vacas de la población. Podríamos decir que es la proporción de vacas expuestas pasibles de ser movidas, ya que no han sido detectadas la enfermedad en el rebaño. En este caso asumimos que todas las vacas de un rebaño infectado son expuestas y pasibles de ser movidas con destino a otro rebaño.

q = 1 – ***p*** = complemento de ***p*** o proporción de vacas en rebaños no infectados con relación al total de vacas de la población. Es la proporción de vacas no expuestas y susceptibles.

n = número de orígenes (fuentes) diferentes de los reemplazos que se ingresan.

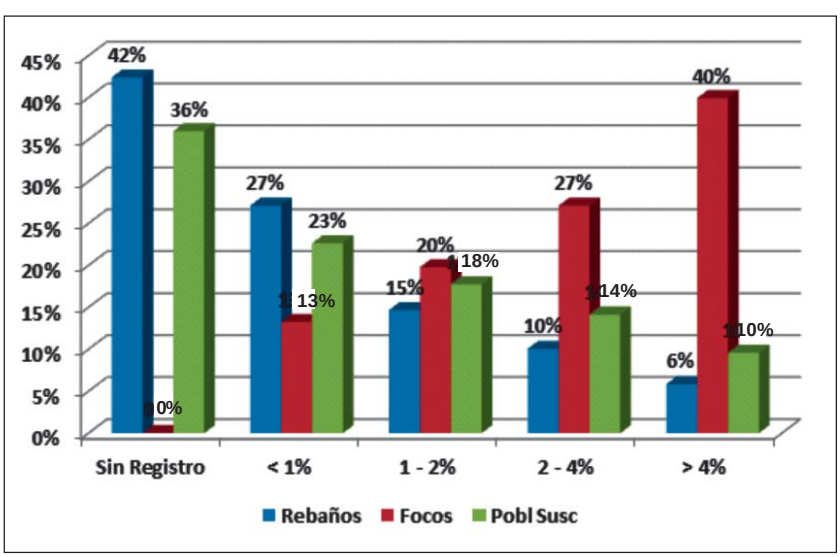

Figura 17. Distribución de los porcentajes de rebaños, focos y población bovina susceptible para cada una de las categorías regionales definidas.

m = número medio de reemplazos ingresados por origen de los mismos. Es el cociente del número de reemplazos ingresados en el año sobre ***n*** (el número de orígenes diferentes de estos reemplazos).

s = complemento de la prevalencia en rbaños infectados (1 – prevalencia). Dicho de otra forma ***s*** es la prevalencia de las vacas no infectadas en rebaños infectados no detectados.

La función doble binomial definida por Beal [(1)] que estima la probabilidad de transmisión de la brucelosis a través de los movimientos de portadores para cada región, giro y tamaño poblacional es:

$$1-\left[\left(q+ps^{m}\right)^{n}\right]$$

En nuestro modelo los parámetros de la función de transmisión en realidad no son conocidos y por lo tanto se utilizan estimadores que variaran estocásticamente en función de los valores de las distribuciones que mejor los representen, para cada una de las interacciones del modelo.

Los parámetros ***p***, ***s*** y ***q*** dependen del número de vacas y rebaños infectados no detectados en la región, por lo tanto cambiaran de año en año según que la población no detectada se expanda o contraiga.

La distribución que estima los parámetros ***m*** y ***n*** se establecerá para el año inicial del modelo por región, giro y grupo de tamaño de rebaño y se ajustará en los diferentes años de simulación según los ajustes poblaciones que vaya teniendo el modelo.

Cada región tiene cierta posibilidad de comprar en su propia región o en c/u de las otras regiones, estas probabilidades suman 1 y se mantienen constantes dentro de cada interacción del modelo. La probabilidad de transmisión a una región dada desde otra será el producto de la probabilidad de transmisión (doble binomial) por la probabilidad de adquirir reemplazos en esa región.

El número de rebaños nuevos infectados por región, giro y tamaño de rebaño es igual a la probabilidad de comprar uno o más reemplazos infectados para esa región, giro y tamaño de rebaño por el número de rebaños susceptibles en ese grupo.

N_1 = N° de rebaños nuevos infectados

PP_{hij} = Probabilidad de comprar uno o más animales infectados (portadores) para la región ***i***, giro ***h*** y tamaño de rebaño ***j***,

N_{hij} = N° de rebaños susceptibles (limpios) en la región, giro y tamaño de rebaño de destino

h = 1, 2 giro productivo

i = 1, 2, 3, 4 y 5 regiones

j = 1, 2, ..., 6 y 7 tamaño de rebaños

LL = origen del reemplazo adquirido en una región, giro y tamaño de rebaño dado.

p_r = probabilidad de compra de un reemplazo en una región, giro y tamaño de rebaño dado.

A los efectos de estimar la prevalencia de la brucelosis bovina en el Uruguay la Dirección General de los Servicios Veterinarios realizó un muestreo nacional en el período agosto-diciembre del 2009. La selección de la muestra fue proporcional a la población de los establecimientos (PPS) e implicó la visita y toma de muestra de 587 rebaños en todo el país y la obtención de muestras serológicas de 27.641.

La prevalencia aparente estimada en hembras bovinas fue 0,25% con un error estándares 0,0885% siendo 0,080 – 0,415 el intervalo de confianza del 95%.

La estimación de punto de la prevalencia aparente de los rebaños fue de 1,62% con un error estándar de 0,757%. En el Cuadro 14 se muestran los resultados de una pos-estimación por giro productivo de la prevalencia de rebaño y el límite superior del intervalo del 95%.

Dado el conocimiento que se tiene del número de focos detectados (cuarentenados), la diferencia entre los mismos y las estimaciones del muestreo nacional

$$PP_{hij}=\sum_{LL=1}^{5}\left[\left(p_r\right)_{hiLL}\times\left(1-\left((q+PS^{m})^{n}\right)_{hij}\right]\right.$$

Cuadro 14. Estimación de la prevalencia de rebaños y del número de rebaños afectados por brucelosis bovina y la posestimación por giro productivo (leche, carne).

Giro	Prevalencia		Nº de Rebaños	
	Estimación	Límite superior	Estimación	Límite superior
Leche	2,24%	6,66%	74	222
Carne	1,42%	3,11%	536	1.172
Rebaños	1,62%	3,11%	667	1.271

aportan los elementos necesarios para estimar el número de rebaños infectados no detectados.

En la Figura 18 podemos observar que el número de movimientos entre rebaños de categorías susceptibles crece claramente en función del tamaño de los mismos, por lo cual caracterizar esta relación aporta un elemento fundamental para estimar los riesgos en cada categoría propuesta.

En el Cuadro 15 podemos observar que no solo el número de movimientos sino que el número de vacas aumenta sustancialmente cuando aumenta el número de rebaños. Obviamente la variable número de movimientos y número de animales movidos están altamente co-

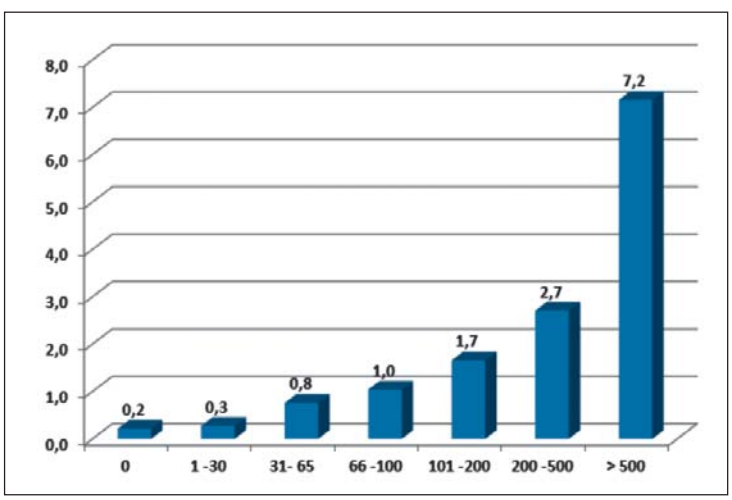

Figura 18. Número de movimientos anuales por rebaño en función del tamaño de rebaño expresado en número de cabezas susceptibles.

Cuadro 15. Número de rebaños, número de movimientos y número de vacas movilizadas de rebaño a rebaño, según tamaño de los rebaños en número de vacas por rebaño

Población	Rebaños	N° mov.	N° vacas
0	2.473	514	8.301
1 -30	17.596	4.730	50.855
31- 65	7.264	5.473	64.055
66 -100	3.918	4.064	55.783
101 -200	5.664	9.364	155.118
200 -500	4.985	13.479	283.307
> 500	2.908	20.801	612.559
Total	**44.808**	**58.425**	**1.229.978**

rrelacionadas y a su vez están asociadas con el tamaño de los rebaños ya que a una misma tasa de reemplazo rebaños más grandes requerirán más animales en números absolutos.

Si bien el número de movimientos y de animales movidos de una región a otra son un factor de riesgo fundamental para la transmisión de la brucelosis bovina, la caracterización del riesgo de las regiones origen de los reemplazos estará asociada al riesgo de la transmisión de la enfermedad. En la figura IV.11 se observa que en todas las regiones los movimientos más importantes son dentro de la propia región, pero también son importantes los movimientos recibidos de otras regiones con un riesgo epidemiológico diferente.

Transmisión por contigüidad (linderos)

La otra posibilidad de transmisión de la infección hacia un rebaño susceptible (limpio), que se esquematizó en la Figura I19, es a través del contacto con un rebaño vecino infectado.

Asumimos que un rebaño cuarentenado (interdicto) tiene menos probabilidad de difusión que uno no detectado, porque seguramente se han tomado medidas precautorias para tratar de evitar la transmisión de la brucelosis entre linderos.

Otros factores que pueden incidir en la potencialidad de transmisión son: el número de años de infección, el tamaño total del rebaño y el número de linderos susceptibles.

En la Figura 20 se observa la distribución de los tiempos de saneamiento necesario para los focos que se sanearon a abril del año 2010, observándose que en casos excepcionales se requirió hasta siete años para sanear algún foco aunque la mayoría requirió tres años o menos. También se observa en la Figura 21 que en los focos activos de la enfermedad se mantienen vigentes algunos focos de larga data.

$$Inf_{hij} = T_{hij} \times Pd_{hij} \times Lind_{hij}$$

Inf$_{hij}$ = nuevos rebaños infectados por región, pasan a engrosar la categoría de infectados no detectados

T$_{hij}$ = total de rebaños infectados por región, giro y tamaño, ajustados por número de años infectados y estatus (detectado o no).

Pd$_{hij}$ = probabilidad de transmisión por contigüidad a un lindero ajustado por región, giro y tamaño.

Lind$_{hij}$ = número de rebaños linderos susceptibles por rebaño infectado.

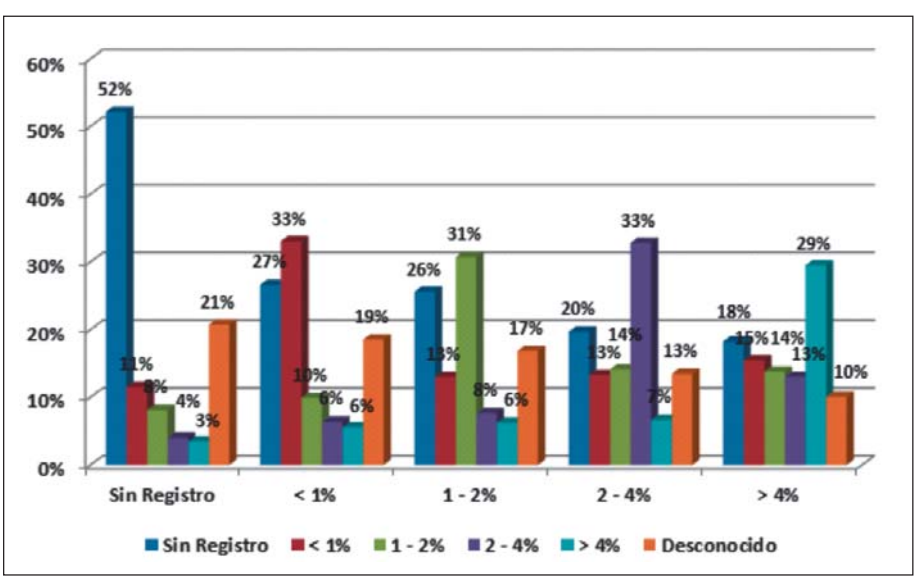

Figura 19. Porcentaje de animales susceptibles movilizados de rebaño a rebaño por región de origen según región de destino.

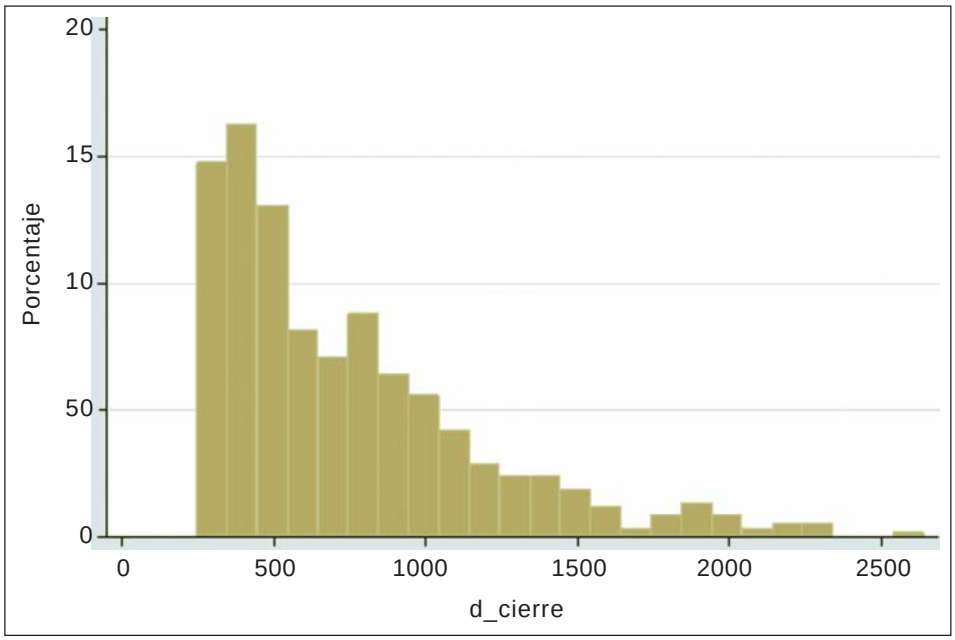

Figura 20. Días necesario para el saneamiento de los focos de Brucelosis bovina saneados a abril 2010.

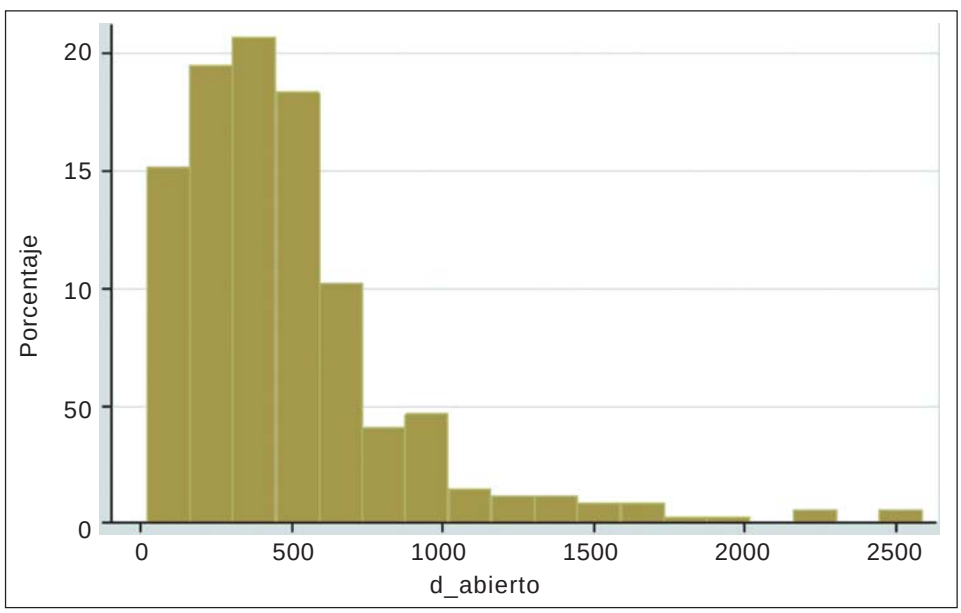

Figura 21. Días en saneamiento de los focos de Brucelosis bovina activos en abril 2010.

Las estimaciones de las variables que determinan los nuevos rebaños infectados por contigüidad variaran estocásticamente en cada uno de las interacciones de acuerdo a las funciones de probabilidad adecuada para cada uno de ellos.

Programas de Vigilancia

Los programas de vigilancia están esquematizados en la Figura 22. La base de datos de rebaños infectados detectados tiene algunas variables incompletas, en especial la causa o forma de detección de los focos donde no está registrada la misma para el 51% de los mismos. No obstante este sesgo potencial se pueden observar las principales causas de detección de aquellos que tienen está variable registrada.

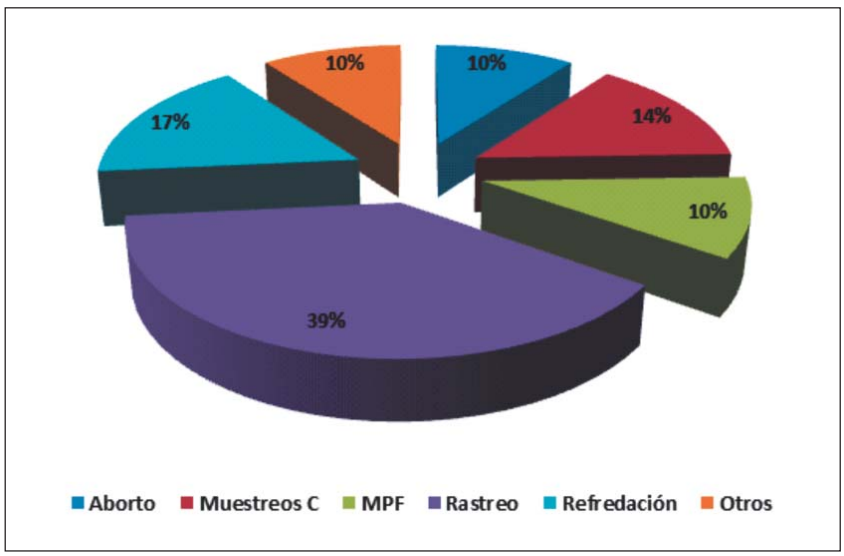

Figura 22. Distribución histórica de las formas de detección de rebaños infectados.

Otro sesgo importante que estos datos tienen, además de la omisión de registro, es que en el período considerado (2002-2010) los sistemas de vigilancia no fueron constantes y se registraron varios cambios importantes en la estrategia y cobertura. Por lo expuesto no es posible evaluar los sistemas de vigilancia sin considerar los aspectos mencionados.

En general la probabilidad de detección de un rebaño infectado para cada uno de ellos estará determinada por la cobertura anual del programa (***Ca***$_{hij}$), la sensibilidad de rebaño de la prueba o estrategia diagnóstica utilizada (***HSe***$_{hij}$), como se selecciona la muestra, el tamaño de la muestra (***n***) y el número de repeticiones anuales (***R***) con que la misma es aplicada por rebaño.

La cobertura anual del programa es la proporción de los rebaños de la población que son vigilados (investigados a través de una muestra) en cada año para cada región, giro productivo y tamaño de población.

P$_{ap}$ = prevalencia aparente. Proporción de individuos que resultan positivos a una prueba diagnóstica. Dependerá de la prevalencia real (***P***) y de la sensibilidad (***Se***) y especificidad (***Sp***) individual de la prueba o estrategia diagnóstica utilizada.

$$P_{ap} = P \times Se + (1 - P) \times (1 - Sp)$$

HSe = sensibilidad de la prueba de rebaño utilizada dependerá de la sensibilidad (***Se***) y especificidad (***Sp***) individual de la prueba de diagnóstico utilizada, la prevalencia intra-rebaño de la enfermedad (***P***) investigada, del tamaño de la muestra analizada (***n***) y del criterio utilizado para considerar como positivo el rebaño (en general se considera positivo cuando 1 o más individuos tiene un resultado positivo en la prueba) [23].

Para el caso en que se considera positivo un rebaño si al menos alguno de los individuos muestreados son positivos y que la fracción de muestreo es baja, la sensibilidad de rebaño es estimada a través de:

$$HSe = 1 - (1 - P_{ap})^n$$

HSp = especificidad de la prueba de rebaño utilizada dependerá de la especificidad (***Sp***) individual de la prueba de diagnóstico utilizada, del tamaño de la muestra analizada (***n***) y del criterio utilizado para considerar como positivo el rebaño (número de individuos positivos necesarios para declarar positivo a un rebaño) [23].

Para el caso en que se considera positivo un rebaño si al menos alguno de los individuos muestreados son positivos y que la fracción de muestreo es baja la especificidad de rebaño es estimada a través de:

$$HSp = Sp^n$$

El número de rebaños infectados detectados para cada región giro y tamaño poblacional será función de la probabilidad de detección del sistema de vigilancia $P_{Det}(+)$ empleado por el número de rebaños infectados no detectados en esa región, giro y tamaño poblacional en ese año considerado.

$$P_{Det}(+)_{hij} = \sum_{r=1}^{R} C_{a_{hij}} \times HSe_{hij} \times P_{reb_{hij}}$$

El número de rebaños falsos positivos resultantes FP_{hij} para cada región giro y tamaño poblacional será función de la cobertura del sistema, de la especificidad de la prueba de rebaño empleada y de la proporción de rebaños susceptibles en la población en esa región, giro y tamaño poblacional en ese año considerado.

El número de rebaños detectados anualmente determinará quiénes serán los nuevos cuarentenados (interdictados) en la población de rebaños y que iniciarán el proceso de saneamiento.

La Figura 23 que describe el número de focos de brucelosis (rebaños infectados) por giro productivo detectados por año muestra una tendencia creciente en la ganadería para carne, mientras que en la ganadería para producción de leche luego del pico que significo el año 2005 viene cayendo en forma sostenida. Este gráfico podría inducirnos a pensar que la gravedad de esta enfermedad es mucho mayor en la ganadería de carne, pero esto ignora que este sistema es mucho más importante en número absolutos que la lechería.

En la Figura 24 se pone en perspectiva la situación de los focos de brucelosis en cada giro productivo al referenciar el número de estos cada mil rebaños de la población. Este gráfico pone en evidencia que la presencia de la brucelosis en la lechería ha sido mucho más importante que en la ganadería para carne y que las medidas que se han tomado han sido efectivas.

Por otro lado la ganadería para carne, si bien no ha sido tan afectada, muestra en los últimos años un crecimiento en el número de focos; lo cual puede ser atribuido a un avance en la enfermedad o que se aumentó la detección por un incremento en la vigilancia.

En la Figura 25 se expresa cual ha sido la cobertura de vigilancia serológica cada mil hembras. Esta muestra que en el giro lechero se han invertido mucho más recursos, lo cual explica su avance y que en la ganadería para carne si bien ha invertido mucho menos está mostrando que en los últimos años un incremento importante. Este incremento en la vigilancia serológica en ganado para carne explica al menos en parte los avances en la detección de los rebaños infectados.

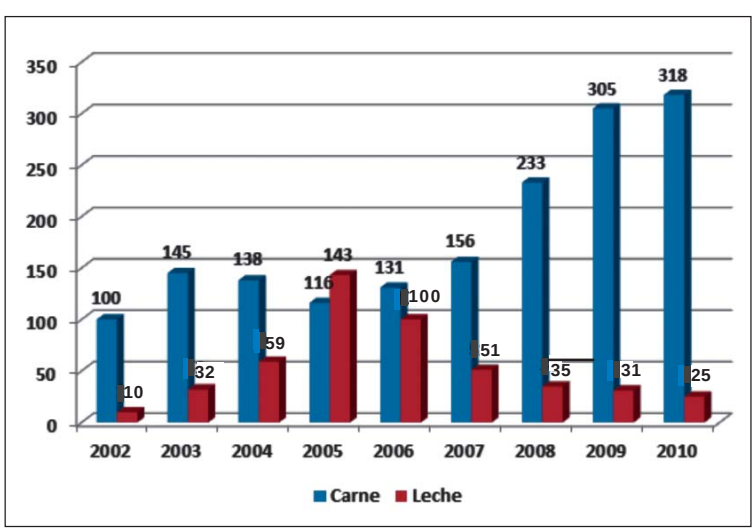

Figura 23. Número de rebaños infectados detectados por año según giro productivo. Enero 2002 a abril 2010.

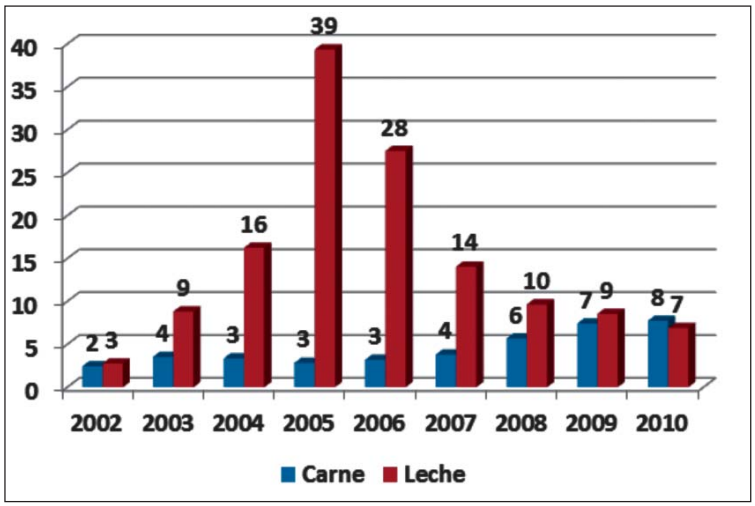

Figura 24. Número de rebaños infectados detectados cada mil rebaños por año según giro productivo. Enero 2002 a abril 2010.

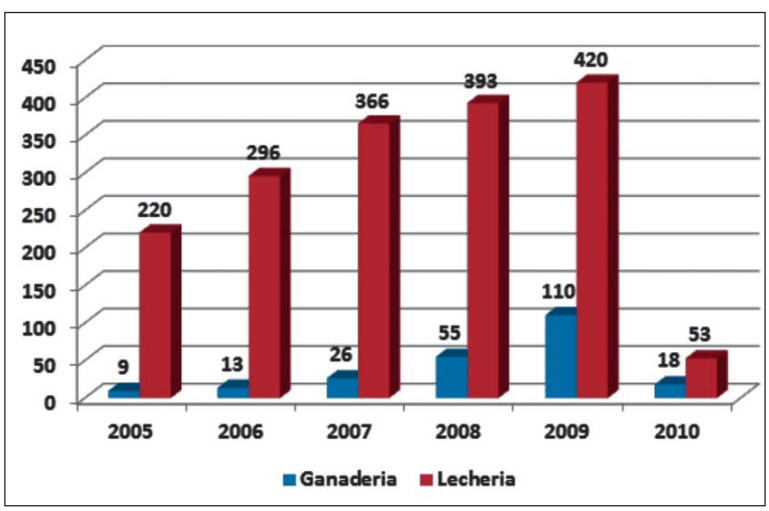

Figura 25. Evolución de la vigilancia a través del número de serologías registradas cada mil hembras bovinas por año según giro productivo. Enero 2005 a abril 2010.

Supuestos

Resumiendo los supuestos que el modelo entre-rebaños asume se deben mencionar los siguientes:

- Unidad de tiempo anual.
- Unidad de estudio rebaño.
- Establecimientos infectados-detectados no mueven, bajo ninguna circunstancias, animales de riesgo con destino a un establecimiento susceptible. No transmiten por Movimientos.
- Todos los rebaños infectados pueden transmitir la enfermedad por contigüidad (linderos).
- Los rebaños vacunados son totalmente resistentes a la enfermedad.
- Los rebaños infectados saneados vuelven a la categoría infectados.
- Los rebaños susceptibles que reciben un portador se infectan.
- Unidad geográfica de trabajo para el modelo es la Sección Policial.

Salidas del Modelo

Las principales salidas que el modelo proporcionará por región, giro y tamaño poblacional para las estrategias de vigilancia seleccionadas son:

- Número de rebaños infectados.
- Número de rebaños detectados y cuarentenados.
- Número de rebaños falsos positivos.
- Incidencia anual de la enfermedad en rebaños.
- Incidencia anual de la enfermedad en bovinos.
- Número de bovinos a ser sacrificados.
- Número de análisis de laboratorio necesarios por técnica de diagnóstico utilizada.
- Necesidades de producción o importación de reactivos de diagnóstico.
- Estimación de pérdidas físicas (leche y carne) asociadas con cada programa.
- Costo de la indemnización por el sacrificio de reactores.
- Costo de la vigilancia epidemiológica.
- Costo global del programa seleccionado.

Estas salidas podrán ser por año o para un determinado número de años.

José Piaggio[*], Andrés D. Gil[*]

[*]Dirección General de los Servicios Ganaderos - MGAP

V. Modelo de difusión de la Brucelosis bovina intra rebaños

TIPO DE PRODUCCIÓN "*LECHERA*"

Para modelar la difusión de la Brucelosis dentro de un Rebaño Lechero se desarrolló un modelo estocástico basado en cada individuo, que en conjunto conforman la población del establecimiento [stochastic individual-based model (IBM)]. De esta manera los eventos ocurren en un animal dado (infección, aborto, refugo, etc.), siendo posible evaluar el rebaño por medio de la sumatoria de eventos individuales en cualquier período o en un conjunto de períodos.

Para los modelos IBM debe definirse una población de partida, que será la misma cada vez que comience la primera iteración de cada simulación. Es posible variar esta población para generar diferentes escenarios, cómo podría ser establecimientos chicos, o establecimientos grandes. En el modelo desarrollado se consideró un rebaño lechero de 120 vacas en ordeñe (DICOSE 2008, mediana=103 bovinos para giro lechero).

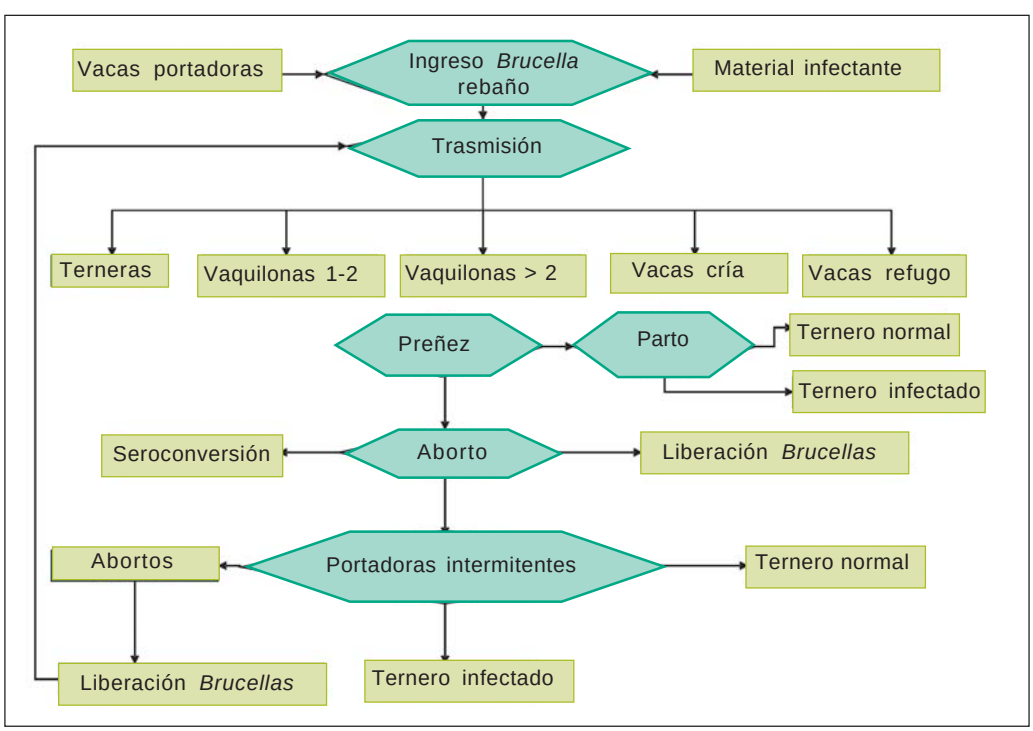

Figura 26. Composición del rebaño y ciclo de la brucelosis bovina dentro del mismo.

En la población inicial, se incluye un animal infectado, de manera de simular la evolución de la infección dentro del rebaño durante el transcurso de los diferentes períodos (en todas las iteraciones se parte de la misma situación inicial). En diferentes simulaciones se puede variar la categoría del animal infectado para evaluar el comportamiento del modelo en estos diferentes escenarios.

Al ser un modelo estocástico, para cada variable de salida se obtendrá una distribución de resultados. Esta distribución estará constituida por el resultado de esa variable en cada iteración.

El modelo planteado es un modelo de transición de estados para tiempo discreto. La unidad de tiempo que compone un período es un mes, y el número de períodos que forman una iteración es de 180 meses (15 años).

MODELO CONCEPTUAL

Estados:

- Susceptible (hembras a partir de los 18 meses, con excepción de transmisión vertical).
- Infectado (incluye latencia).
- Inmune (por vacunación).

PARÁMETROS DEL MODELO

Vaquillonas: Pubertad: 18 meses.

Comienzo de la 1ra gestación 24 meses de edad.

1er parto 33 meses de edad.

Gestación: 9 meses.

Parto - Concepción: 3 meses.

Duración de la lactancia: 10 meses.

Período seco: 2 meses.

N° de Lactancias: 5.

Causas de Refugo: 90 meses de edad, acumulación de 2 abortos y otras causas (estado de la ubre y mastitis, problemas podales, baja producción etc.).

Tamaño del rebaño: 120 vacas (mediana DICOSE 2008, 103 bovinos para giro lechero).

Parición continúa.

Sexo de la cría: terneras 50%.

Venta de vaquillonas (28 meses) se ajusta para mantener nº de vacas en ordeñe (VO).

La demografía del establecimiento se afectará por los abortos (Br.Bovina y otras causas), la mortalidad desde el parto al final de la recría y el refugo de animales.

Probabilidad de aborto por otras causas: 0,025 (2,5%)

Los sobrantes de los reemplazos se venderán como vaquillonas preñadas (a

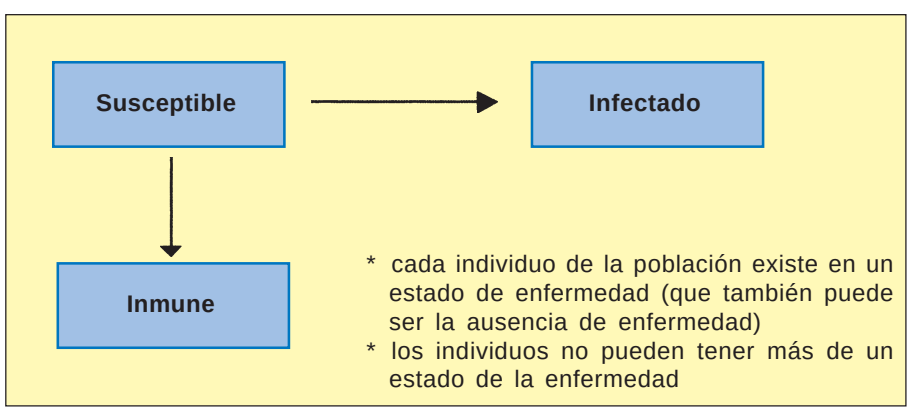

Figura 27. Modelo de transición de estados.

los 28 meses de edad). Si entre las vaquillonas vendidas hubiera alguna infectada, será registrada en los outputs del modelo (salida de animales infectados), para ser considerado por el modelo de difusión entre rebaños.

Los terneros machos no serán considerados para la transmisión (saldrán del modelo), no quedando como reproductores en el establecimiento, pudiendo ser considerados dentro de la evaluación económica.

Susceptibilidad

Debido a que está asociada fuertemente a la madurez sexual, los animales inmaduros (vaquillonas menores de 18 meses) no se consideran susceptibles en el modelo para la transmisión horizontal de la enfermedad, mientras que los animales maduros son altamente susceptibles a la enfermedad. En la probabilidad de infección se consideran la eliminación de material infectivo (membranas, fetos) al medio, la sobrevida del agente en el tiempo y la probabilidad de exposición, siendo la susceptibilidad de los animales maduros sexualmente (no vacunados) del 100%.

Mortalidad (parto, cría, recría y adultos)

La mortalidad desde el parto hasta la finalización de la recría será considerada en su globalidad con un valor del 4% (muerte de animales por toda causa). En el modelo se considera en forma probabilística asignando a cada animal una probabilidad=0.04 de morir al momento del parto.

La dinámica poblacional sin infección define el Perfil Productivo del Sistema, y es considerado el Control para analizar las diferencias con los predios cuando existe infección. Para ello se corre el modelo de simulación para obtener estimaciones de algunas variables como la venta de vaquillonas, período interparto y producción de terneros.

MODELO CON INFECCIÓN

Cada animal infectado transcurrirá en los siguientes períodos, registrándose las variables de interés como si aborta o tiene un parto normal, la presencia de anticuerpos en suero y leche, si es vendido o refugado.

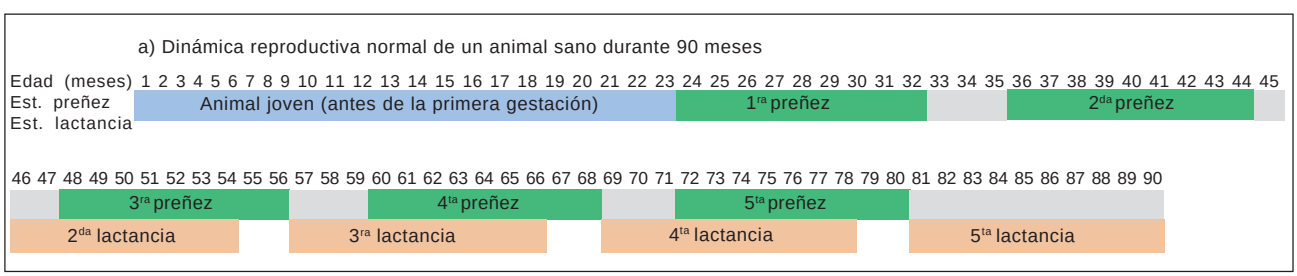

Figura 28. Esquema de la dinámica poblacional de individuos normales.

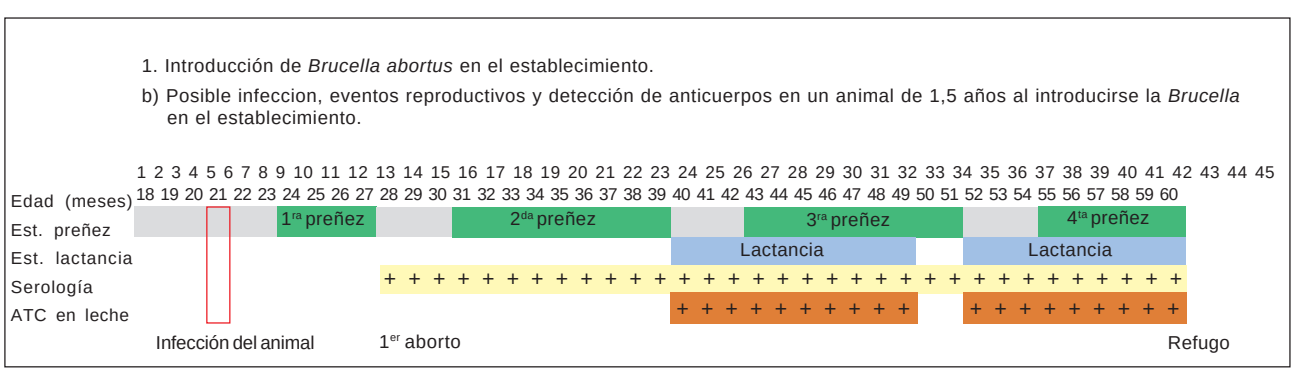

Figura 29. Esquema de la dinámica poblacional de individuos infectados.

PROBABILIDAD DE ABORTO

El aborto por *brucelosis bovina* (*BrB*) puede ocurrir desde el período siguiente al de infección (no en el período en el cual se infecta el animal), y dependerá del momento de la infección:

A) Animales vacíos (no gestados) al momento de la infección, o con infección durante la gestación temprana (1er a 6to mes de gestación), abortarán [P(aborto)=1] durante la gestación actual (para los gestantes) o en la próxima gestación (animales vacíos al momento de la infección).

Para asignar una probabilidad en cada período, de forma que en esa gestación la probabilidad de abortar sea P(aborto)=1, se asignan valores crecientes de probabilidad de abortar (los valores de p_acum en el Cuadro 16) de manera que para el 9º mes, si aun no se ha producido el aborto, la probabilidad será=1.

En el Cuadro 17 se observa el momento de infección y las probabilidades de aborto (p_acum) para cada mes de gestación.

a. Infectados durante 7º u 8º mes de gestación. Si la infección ocurre durante 7º mes de gestación, las probabilidades de abortar en el 8º mes (0.25) o 9º mes (0.45) determinan, en conjunto, que un animal infectado durante el 7º mes presente una probabilidad de abortar P(aborto)=0.587.

b. Para animales infectados durante el 8º mes de gestación la probabilidad de aborto será únicamente en el 9º mes de gestación (p=0.45).

B) Si la infección ocurre durante el 9º mes de gestación, no se producirá aborto. Pero la probabilidad de mortinato será de 0.10. También existirá seroconversión luego del parto.

C) Probabilidad de que un animal infectado aborte en gestaciones siguientes será P(ab)=0.3. La asignación de la probabilidad de abortar durante un mes en particular se determina mediante el solver del Excel de forma que la probabilidad global sea = 0.30. Esta probabilidad surge del Cuadro 18 y de la Figura 30.

Cuadro 16. Probabilidad de aborto en animales vacíos

Gestación temprana (meses 1,2,3, y 4)	p	p acum.
5to	0,05	0,05
6to	0,1	0,15
7mo	0,4	0,55
8vo	0,4	0,95
9no	0,05	1
5° mes gestación	p	p acum.
5to	0	0
6to	0,05	0,05
7mo	0,3	0,35
8vo	0,45	0,8
9no	0,2	1
6° mes gestación	p	p acum.
5to	0	0
6to	0	0
7mo	0,1	0,1
8vo	0,45	0,55
9no	0,45	1

Cuadro 17. Probabilidad de aborto para animales infectados en el mes 7 y 8 gestación

7° mes gestación	p	p acum.	
5to	0	0	
6to	0	0	
7mo	0	0	
8vo	0,25	0,25	
9no	0,45	0,7	0,5875
			P (abortar) = 1- [(1-0,25)*(1-0,45)]
8° mes gestación	p	p acum.	
5to	0	0	
6to	0	0	
7mo	0	0	
8vo	0	0	
9no	0,45	0,45	

Cuadro 18. Probabilidad de aborto en gestaciones siguientes

Mes gestación	Frecuencian	P (aborto)
1		0
2		0
3		0
4		0
5to	0,05	0,01679767
6to	0,1	0,03359534
7mo	0,4	0,13438135
8vo	0,4	0,13438135
9no	0,05	0,01679767
	1	
	P (aborto)	0,30000003

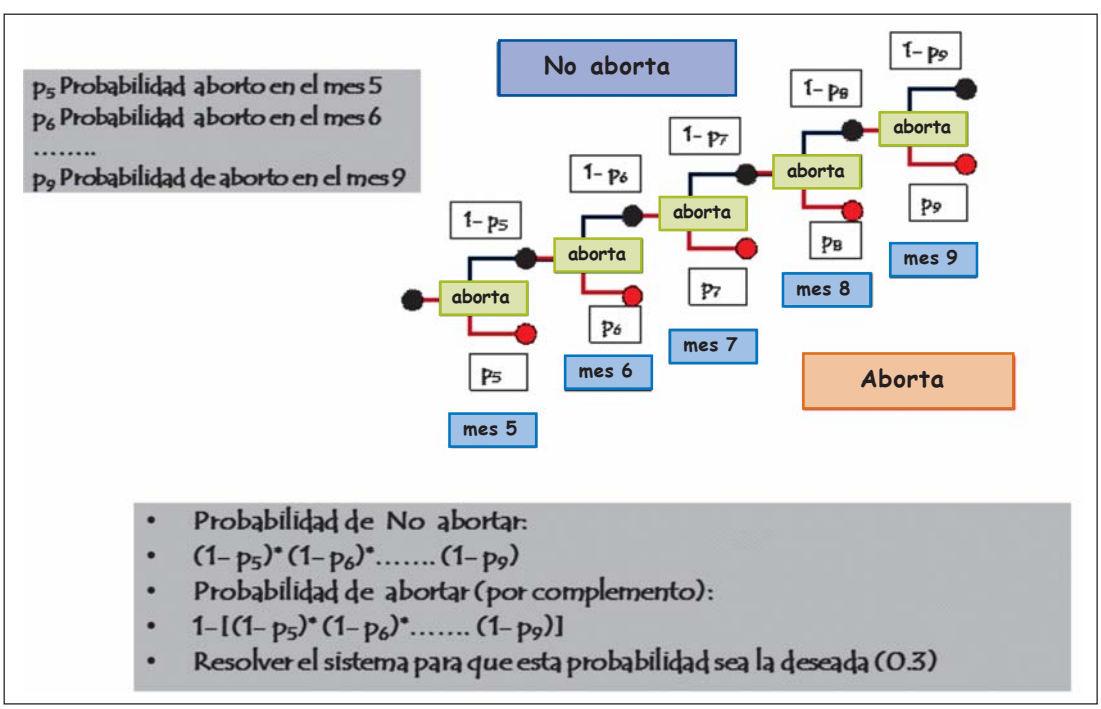

Figura 30. Aborto: árbol de probabilidades de aborto en gestaciones siguientes (probabilidad de aborto cada mes).

D) También se consideran abortos por otras causas (2,5%). La metodología para asignar un valor en cada mes de gestación es la misma que para el punto anterior, construyendo un árbol de probabilidades y calculando mediante el solver del Excel las probabilidades de forma que, para cada animal, la probabilidad global de abortar durante la gestación sea 0.025 (Cuadro 19).

REFUGO POR OTRAS CAUSAS

Se utilizó la misma metodología, asignando un valor de probabilidad de refugo en cada lactancia, construyendo un árbol de probabilidades y calculando mediante el solver del Excel las probabilidades de forma que, para cada animal, la probabilidad global de abortar durante todas sus lactancias sea 0.02 (Cuadro20).

Cuadro 19. Abortos por otras causas

Mes gestación	Frecuencia	P (aborto)	Frec. relativa
1	0,1	0,00091849	0,03389831
2	0,2	0,00183698	0,03389831
3	0,2	0,00183698	0,06779661
4	0,3	0,00275547	0,10169492
5	0,75	0,00688866	0,25423729
6	0,6	0,00551093	0,20238983
7	0,5	0,00459244	0,16949153
8	0,3	0,00275547	0,10169492
9	0,1	0,00091849	0,03389831
	2,95		1

P (aborto) 0,025

Cuadro 20. Probabilidad de refugo

Lactancia	Frecuencia	P (refugo)	Frec. relativa
1	5	0,00201294	0,07692308
2	10	0,00402587	0,15384615
3	10	0,00402587	0,15384615
4	20	0,00805175	0,30769231
5	20	0,00805175	0,30769231
	65		1

P (refugo otras) 0,01999997

TRANSMISIÓN

La propagación de la infección entre las unidades (animales susceptibles a *BrB* del establecimiento) puede producirse en forma horizontal o vertical.

Probabilidad de infección horizontal

Se producirá infección horizontal cuando se libera material infectivo en el medio ambiente y existe contacto con animales susceptibles. Los modelos de transmisión de la Br. Bovina consideran únicamente los eventos de mayor importancia y significación, como ser la liberación de bacterias cuando se produce un aborto o parto de un animal infectado (se liberan 10^{14} bacteria/gr) dejando de lado las posibles contaminaciones que produce al medio un animal infectado, por secreciones o excreciones, por considerarlas de escaza importancia en la transmisión. Igualmente para la susceptibilidad, si bien existen variaciones individuales, se considerará que un animal adulto (luego de la pubertad) será 100% susceptible.

La probabilidad de infección será máxima en el período en que ocurre el aborto o parto, para luego disminuir progresivamente. Será determinada por la probabilidad de contacto (o exposición) con material infectivo y de características del agente como la viabilidad, que varía con el tiempo y es afectada por las condiciones ambientales (temperatura y humedad).

De acuerdo a la literatura, considerando nuestras condiciones de producción, el modelo considera un tiempo máximo de 6 meses para que un material infectivo, luego de aborto o parto pueda producir infección de un animal susceptible. Respecto a estos últimos, no se considerarán animales susceptibles a la transmisión horizontal los animales menores de 18 meses.

La probabilidad de infectarse que tiene un animal, será el producto de la probabilidad de tener contacto con material infectivo (Cuadros 21 y 22) por la probabilidad de infección dado que ha sido expuesto.

Cuadro 21. Tiempo de supervivencia de la *brucella* según tipo de materiales contaminado

Material	Tiempo de supervivencia
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15 – 40 días
Leche a temperatura ambiente	2 – 4 días
Fluidos y secreciones en verano	10 – 30 minutos
Lanas de depósitos	110 días
Agua a 37 °C y pH 7,5	Menos de 1 día
Agua a 8 °C y pH 6,5	Más de 57 días
Fetos mantenidos a la sombra	6 – 8 meses
Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Manteca a 8 °C	1 – 2 meses
Cuero manchado con excrementos de vaca	21 días
Paja	29 días
Grasa de ordeñe	9 días
Heces bovinas naturales	1 – 100 días
Tierra húmeda a temperatura ambiente	66 días
Tierra desecada a temperatura ambiente	4 días

Fuente: Acta Bioquim Clin Latinom 2005; 39(2): 203-16.

Cuadro 22. Tiempo de supervivencia de la *brucella* según medio contaminado

Medio	Temperatura/ambiente	Viabilidad
Luz solar	<31 °C	4,5 horas
Agua	-4 °C	114 días
Agua	Ambiente	77 días
Suelo	Ambiente seco	<4 días
Suelo	Húmedo	66 días
Estiércol	Verano (Rusia)	1 día
Estiércol líquido	Verano (Rusia)	108 días
Estiércol	Invierno (Rusia)	53 días
Estiércol líquido	Invierno (Rusia)	174 días

Fuente: adaptado de Nicoletti (1980).

La probabilidad de infectarse que tiene, un animal susceptible si es expuesto (contacto con material contaminado) Prob(inf) $\mathbf{p}_m$, estará asociada a la infecciosidad del material contaminado y su variación en el tiempo (dependiendo de la viabilidad del agente), por lo que se le asigna un valor mensual, por un lapso de 6 meses.

El valor de $\mathbf{p}_m$ durante el período del aborto o parto es igual a 1, para luego decaer pronunciadamente. En este punto fue considerando el largo de cada período (un mes) y nuestras condiciones pastoriles de producción (Cuadro 23).

La probabilidad de contacto con el material contaminado $\mathbf{p}_c$ (fetos, membranas ...) será máxima en el período en que ocurre el aborto o parto de un animal infectado (0.10 para animales del tambo), dado el comportamiento de los bovinos (acercarse a olfatear y lamer el feto,

Cuadro 23. Probabilidad mensual de infección

Mes Exp.	P (inf)$_{pm}$	P (cont)$_{pc}$	pm*pc
1	1	0,1	0,10000
2	0,2	0,01	0,00200
3	0,1	0,01	0,00100
4	0,05	0,01	0,00050
5	0,01	0,01	0,00010
6	0,001	0,01	0,00001

placentas, etc.). Luego esta probabilidad pasará a ser constante en los períodos posteriores, considerando que tanto un feto cómo las membranas permanecen sólo en el período del aborto o parto, en el medio, debido a la existencia de zorros, perros, aves rapaces etc. A partir del 2do mes, por lo tanto, la probabilidad de contacto será únicamente con los microorganismos presentes en la pastura y bosta (no por contacto con fetos ni membranas), la cual será constante por el resto de los períodos. Otros modelos suponen que dado un aborto o parto, se infectará un número dado de animales, ej. 2, incluso puede modelarse mediante una distribución Poisson.

El número de animales que puedan ser infectados variará con el número de animales presentes en el lugar que se produce la descarga de microorganismos. En el presente modelo se partió del supuesto de que todos los animales presentes en ese potrero tienen igual probabilidad, y constante, de tener un contacto con el material infectivo, independiente del número de animales. Para los animales secos, la probabilidad de contacto empleada para el período del aborto o parto fue de 0.20, dado que coincidirán en ese potrero un número muy inferior de animales.

La probabilidad de infección horizontal se consideró diferente por categoría de manejo (debido a que se manejan en grupos para pastoreo, ordeñe etc.), considerando la exposición de los animales que cohabitan en el **potrero**.

Las Terneras, en principio, no se considerarán susceptibles. Las vaquillonas serán consideradas como una categoría hasta el 7mo mes de gestación, en el 8vo y 9no se supone que están en conjunto con las vacas secas, que forman otro grupo de animales que están juntos. Finalmente, todas las vacas en lactación son consideradas como un grupo (desde el punto de vista del contacto). En resumen, se consideran cuatro compartimentos de animales, y el riesgo de exposición se calcula en cada uno de ellos.

La probabilidad de infección (en un período y compartimento dado) $\mathbf{p_t}$ estará dada por la probabilidad de tener contacto con el material contaminado $\mathbf{p_c}$ (fetos, membranas ...) multiplicada por la probabilidad de infectarse $\mathbf{p_m}$, de acuerdo a los abortos o partos de animales infectados ocurridos hasta 6 meses antes del período actual en dicho compartimento (potreros usados por esa categoría de animales): $\mathbf{p_t = p_m \times p_c}$

También se incorpora la posibilidad de ocurrencia de más de uno de estos eventos de contaminación en el mismo período y compartimento, y su posibilidad de ocurrencia en diversos períodos a lo largo del tiempo (6 meses previos). Cuando exista más de un aborto o parto en un período, se calcula la probabilidad de infección debida a esos eventos como **P(inf)**=1-P(no infección)= 1-q^n donde ***n*** es el número de abortos (y/o partos) ocurridos en un mismo período, y q=1-(probabilidad de infección de un animal susceptible en ese período $\mathbf{q=1-p_t}$). Los supuestos para aplicar la Distribución Binomial, en este caso, son que la probabilidad de contacto de todos los animales con el material contaminado es constante y la misma para cada uno de los ***n*** eventos contaminantes.

Finalmente, para considerar la posible infección debida a abortos ocurridos en diferentes períodos (previos) en cada compartimento, se determinará la probabilidad de acuerdo a un árbol de probabilidades, en el cual se considerarán las

probabilidades de ocurrencia para los 6 períodos anteriores. En cada nodo existe una **P(inf)**, de acuerdo al cálculo anterior, por lo cual considerando los 6 períodos la Probabilidad final de infección **P(final)** estará dada por 1- la probabilidad que no se infecte (de acuerdo al árbol de probabilidades).

Cambio de categoría de riesgo por manejo (potrero): Este cambio, implica un cambio del lugar en que se encuentra el animal. Por ejemplo, un animal luego del parto pasará a estar con los animales que están lactando; entonces el riesgo de infección horizontal (exposición) relacionado a períodos anteriores será el vinculado a abortos (previos) de vacas que abortaron mientras se encontraban en lactación. En forma equivalente, para una vaca que es secada, y por tanto cambia de potrero y compañeras, el riesgo de infección horizontal estará vinculado al área de parto y manejo de las vacas secas (abortos o partos previos de animales infectados en ese compartimento) (Figura 31).

Probabilidad de infección vertical

In útero, al parto, o por ingestión de calostro, el modelo asume que el 20% de los terneros nacidos de vacas infectadas serán infectados.

DETECCIÓN

La detección de los animales infectados depende de la aplicación de las medidas de vigilancia y de la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas empleadas (PAL, RB, Rivanol, ELISA, FPA, etc.) y en conjunto, del esquema diagnóstico elegido (pruebas en: serie, paralelo, retest, etc.)

VIGILANCIA

Denuncia Abortos (nº de abortos).

Serología (nº de animales sero+).

Leche Tanque (nº de vacas que eliminan Anticuerpos en leche).

Movimientos (nº animales infectados que salen).

Plantas de Faena (nº de animales infectados que salen a PF).

Cada uno de los componentes del sistema de vigilancia epidemiológica se modela como ser: estrategia o esquema diagnóstico, Se y Sp de las pruebas empleadas, nivel de denuncia de abortos (Ab), muestreos en movimientos, plantas de faena y leche tanque. Esta es la manera de incorporar la variabilidad e incertidumbre, y poder estudiar, mediante el análisis de sensibilidad, la asociación de cada una de estas variables de entrada con los outputs del modelo.

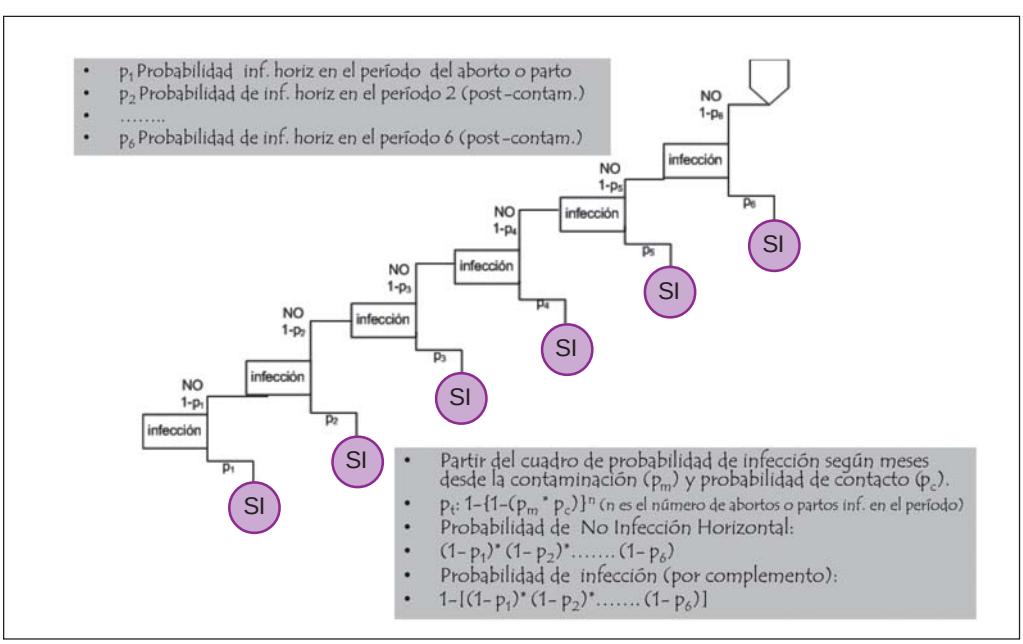

Figura 31. Árbol de probabilidades (Probabilidad de infección horizontal).

A su vez es posible analizar diferentes escenarios, que pueden constituirse mediante el empleo de diferentes medidas de vigilancia, o diferentes técnicas de diagnóstico o esquemas a emplear, o cambiando la intensidad o frecuencia de medidas ya existentes.

ANTICUERPOS

Las terneras infectadas verticalmente no expresarán anticuerpos (ATC) hasta la ocurrencia del aborto. Las vaquillonas infectadas previamente a la primera gestación mostrarán ATC en suero y leche al momento del aborto, mientras las vacas infectadas posteriormente a la primera gestación lo harán en forma inmediata a la infección. La expresión de anticuerpos en suero y leche se considera simultánea (cuando el animal está lactando).

INTERVENCIÓN

Foco ⟶ Saneamiento. Para el saneamiento del foco se aplican las medidas estipuladas por el Programa, con los diferentes sangrados, eliminación de positivos y vacunación.

Se incorpora variabilidad como ser el tiempo que demoran los animales positivos en ser sacrificados.

Vacunación. Si bien el modelo contempla el empleo de la vacunación que figura en el Programa, es posible plantear diferentes alternativas o escenarios, ej. empleando diferentes vacunas como ser la cepa19 o incluso evaluar la vacunación general de todas las hembras, como se realizara hasta la década del 90 en nuestro país.

SALIDAS «OUTPUTS» DEL MODELO

En una iteración (180 meses – 15 años):

- Nº de individuos en cada mes (período) y totales al final de la simulación:
  - * Infectados.
  - * Que expresan Anticuerpos (Suero y leche).
  - * Refugados.
  - * Infectados que salen del establecimiento por ventas o refugo (faena).
  - * Nº de Abortos por *Brucella* y otras causas.
  - * Partos de animales infectados.
  - * Terneras infectadas verticalmente.
  - * Vaquillonas vendidas.
  - * Terneros machos producidos.
  - * Indicadores cómo período inter parto.
- Tiempo transcurrido hasta la detección (meses)
- Actividad de vigilancia por la que se realizó la detección
- Saneamiento:
  - o Prevalencia inicial intrarebaño.
  - o Animales eliminados.
  - o Animales vacunados.
  - o Sangrados realizados.
  - o Tiempo para sanear el establecimiento.

SALIDAS (OUTPUTS) DE LA SIMULACIÓN (5000 ITERACIONES)

En cada iteración se obtiene la evolución de las variables de salida al progresar los períodos, y los totales acumulados para un número de períodos (5, 10 ó 15 años), generando cada valor de la distribución de salidas que obtenemos al correr la simulación del modelo (por ejemplo 5.000 iteraciones).

- **Distribuciones de salida:** para cada variable de salida se obtiene una distribución de valores, lo que permite conocer mínimo y máximo valor asumido, percentiles, valor medio y otras medidas de tendencia central, medidas de variabilidad y demás características de la distribución que tengan interés. Para estas variables se realizan gráficos de frecuencias o densidades como el histograma, o las curvas acumuladas (Figura 32).

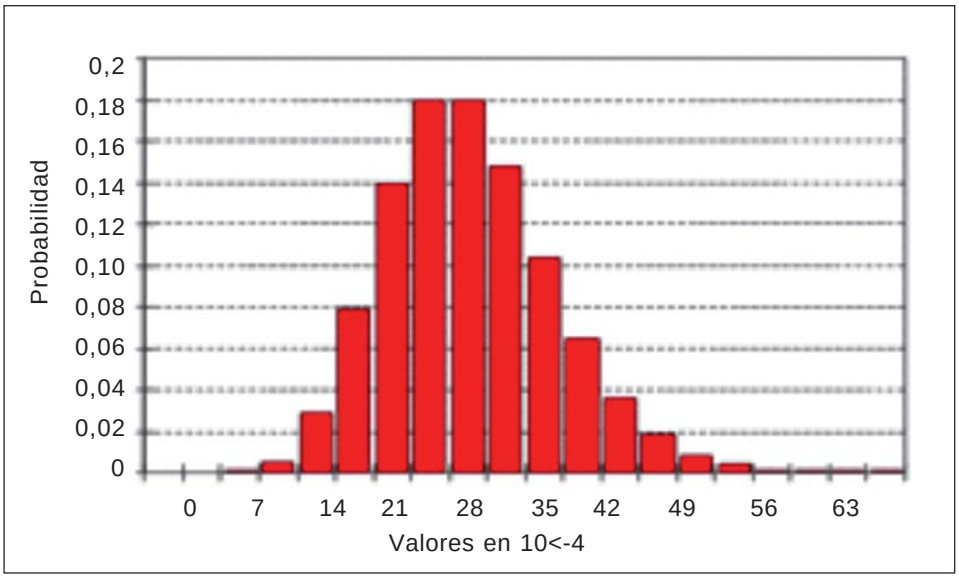

Figura 32. Distribución de frecuencia.

- Entre otras variables, el modelo registra:
  - o Animales Infectados
  - o Abortos por BrB
  - o Refugos por BrB
  - o Terneras (BrB)
  - o Tiempo de detección
- Prevalencia a la detección
  - o Tiempo para el saneamiento
  - o Nº animales eliminados
  - o Nº de serologías realizadas (sangrados)
  - o Nº de animales vacunados
  - o Otras variables (intervalo interparto, vaquillonas y terneros vendidos, etc.).

Esta herramienta permite modelar todas las variables de entrada empleadas en el modelo, agregando variabilidad e incertidumbre, permitiendo también evaluar su asociación con las variables de salida del modelo por medio del análisis de sensibilidad. De esta forma es posible identificar cuáles variables son críticas o más importantes para explicar la variación de las salidas (*outputs*).

A1 ^Time

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
ime	Terneras	Vqll	V. Lact.	V. Secas	V. Masa	Refugos	Nuevos Inf.	Total Infec.	Suscep	Ventas	Salida_Inf	Ab_Br.	Parto_Inf.	ATC_suero	ATC_leche
1	74	46	87	11	98	2	2	2	145	2	0	0	0	1	1
2	76	45	89	12	101	0	0	2	147	4	0	0	0	1	1
3	75	43	89	7	96	7	0	2	159	2	0	0	0	1	1

Figura 33. Ejemplo de 3 períodos en 1 iteración. Cada iteración se completa al finalizar 180 períodos (15 años).

VI. Conclusiones

Uruguay sigue invirtiendo en un programa de control avanzado de Brucelosis Bovina que apunta como objetivo final a la erradicación de la enfermedad del territorio nacional. Las referencias internacionales de programas que han logrado este último objetivo (Estados Unidos de América, Reino Unido, República Checa, Nueva Zelanda, etc.) muestran que el mismo es dificil, insume años de trabajo y tiene costos de inversión elevados.

La base del programa es la detección de focos de la enfermedad y su saneamiento a través de la eliminación sistemática de los animales positivos y la cuarentena hasta que esto es logrado. Para la obtención del exito se requiere la utilización de estrategias de vigilancia que detecten los establecimientos y animales positivos y contar con herramientas de diagnóstico que sean certeras (alta sensibilidad y alta especificidad).

Durante estos años, diversos actores han cuestionando las pruebas diagnósticas utilizadas para hacer un trabajo eficiente y promovieron la investigación y evaluación de todas las alternativas disponibles. Coherente con esta situación la Dirección General de los Servicios Ganaderos (DGSG-MGAP) y la Comisión Nacional Honoraria de Salud Animal (CONAHSA) dieron su apoyo a este proyecto. El mismo evaluó las pruebas de rebaño utilizadas en los establecimientos lecheros y las alternativas actualmente disponibles para sustituirlas, así como el desarrollo de instrumentos de apoyo a las decisones como son los modelos epidemiológicos de la enfermedad.

Se demostró a través de muestras ciegas para diferentes operadores la alta repetitibilidad de las pruebas de ELISA en leche, lo cual junto a su objetividad aportan seguridad y transparencias a la vigilancia de los rebaños lecheros.

Se comprobó que los kits comerciales de ELISA, así como la prueba de Polarización Fluorescente tuvieron un comportamiento superior (estadísticamente significativos) a la prueba hoy utilizada de anillo en leche (PAL); en la medida que las muestras compuestas (pooles) incluyen más animales. De la comparación entre los tres kits de ELISA evaluados y las pruebas de anillo en leche (PAL) y polarización fluorescente (FPA) claramente quedó demostrado la mayor sensibilidad análitica de los primeros.

La sensibilidad analítica menor de los ELISAs a la más alta dilución (1/1.024) es de 63%, lo cual es un valor comparable al obtenido por el PAL a la dilución (1/32) y con el FPA a la dilución (1/128). Basado en estos resultados las pruebas de ELISA serían las recomendables para la detección en las etapas más tempranas de introducción del agente en un rebaño, evitando la difusión en el mismo con sus consecuencias inmediatas de muchos abortos y varias vacas infectadas antes de la detección.

Dado que la sensibilidad analítica se determina a través de un ensayo de laboratorio, se puede considerar que no es suficiente para establecer una recomendación final. Por esta razón se realizó una evaluación a nivel de terreno para establecer las propiedades de sensibilidad (probabilidad de detectar un rebaño verdaderamente infectado) y especificidad (probabilidad de descartar un rebaño verdaderamente sano) de las técnicas evaluadas.

Los valores de especificidad obtenidos en todas las pruebas (PAL, ELISAs y FPA) sobre las mismas muestras en el peor de los casos fue del 92,6%, lo cual se puede considerar satisfactorio para este tipo pruebas que serán utilizadas en la vigilancia epidemiológica como de «*screening*» (primera clasificación de rebaño sospechoso).

Los valores de sensibilidad corroboran lo que ya había sido demostrado en las pruebas de sensibilidad analítica con una gran variabilidad entre las pruebas utilizadas. En este caso las pruebas de ELISA confirmaron nuevamente su superioridad en sensibilidad con respecto al PAL y FPA y tuvieron un comportamiento similar entre los tres kits comerciales evaluados.

Estos resultados, como los anteriores, permiten concluir que sería una medida estratégica y económicamente rentable el cambio de la vigilancia de los establecimientos lecheros a través de la leche tanque con pruebas de ELISA. De esta forma se tendría una mayor objetividad en las pruebas y se podría reducir sustancialmente los costo de vigilancia en el sector, sin pérdida significativa de la eficacia. Esta recomendación es especialmente significativa para rebaños mayores a 32 vacas en ordeñe, los cuales incluyen a más del 80% de la población de vacas lecheras del país.

Estas recomendaciones han sido transmitidas a las autoridades sanitarias, quienes están estudiando los cambios normativos que viabilicen el uso de estas herramientas.

El uso de modelos de simulación son una herramienta de gran ayuda para la toma de decisiones. Los avances obtenidos con el estudio de este proyecto han mejorado la conceptualización epidemiológica de la difusión entre los rebaños, así como sus consecuencias dentro de los mismos. Permitiendo conocer mejor la epidemiología de la brucelosis bovina en el Uruguay. Estos modelos requieren su perfeccionamiento continuo para reflejar mejor la realidad sanitaria de un país o region por lo cual se considera importante continuar trabajando en los mismos.

Este proyecto ha realizado un aporte en las pruebas de diagnóstico para los rebaños lecheros. Si bien los sistemas lecheros han sido historicamente los más golpeados por esta enfermedad, no hay que olvidar que solo son aproximadamente un 10% de los rebaños del país y que no contamos con pruebas de rebaño para ser utilizadas para la vigilancia y detección en ganado de carne.

Mirando hacia el futuro es esencial evaluar las pruebas de diagnóstico para uso a nivel individual, buscar alternativas económicas para la vigilancia de rebaños de bovinos para carne, así como alternativas al aislamiento bacteriano que no pongan en riesgo la salud de los operadores y su entorno.

Por otro lado es necesario conocer mejor la epidemiología de la brucelosis bovina en el Uruguay, identificar sus factores de riesgo de forma de diseñar los métodos de control más efectivos.

La aplicación de la información ya obtenida y la respuesta a la interrogantes que quedan pendientes son elementos esenciales para la erradicar final de esta enfermedad.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **AMOSSON, S.; DIETRICH, R.; CRAWFORD, R.** 1986. Economic and Epidemilogic of US bovine brucellosis programs. Departmental Technical Report. Abstract CAB. Texas A&M. Vol I-III.
2. **BARRIOLA J.** *Brucelosis bovina* en el Uruguay. Ministerio de Educación y Cultura. Ciclo de Conferencias Técnicas. 71ª Exposición Nacional de Campeonatos de Ganadería. Páginas 9. Montevideo-Uruguay.
3. **BAROZZI, J.** 1993. Informe de la revisión y análisis preliminar de la información básica para el estudio de factibilidad del proyecto: «Erradicación de Brucelosis y Tuberculosis bovina e implementación de un sistema de vigilancia epidemiológica, prevención y evaluación del impacto de enfermedades crónicas y complejos subclínicos en la ganadería uruguaya». Convenio OCT/RC-UR-2/92. MGAP. FONPLATA.
4. **BECK, A.C.** 1977. The use of simulation modelling in the management of brucellosis eradication. Aust Vet J. 53:485-9.
5. **CARPENTER, T.E.; BERRY, S.L.; GLENN, J.S.** 1987. Economics of Brucella ovis control in sheep: epidemiologic simulation model. J Am Vet Med Assoc. 190:977-82.
6. **CEPANZO.** 1982. Pruebas complementarias para el diagnóstico de brucelosis. Nota Técnica N° 25.
7. **CHANS, L.** 2003. Legislación nacional e internacional de relevancia sobre Brucelosis Bovina. Jornada de actualización Técnica. 21/03/2003, La Paloma Rocha. http://www.mgap.gub.uy/DGSG/Capacitación/JornadasBrucelosis/AspectosLegalesDrChans.zip
8. **EBEL, E.D.; WILLIAMS, M.S.; TOMLINSON, S.M.** 2008. Estimating herd prevalence of bovine brucellosis in 46 USA states using slaughter surveillance. Prev. Vet. Med. 85:295-316.
9. **ENGLAND, T.; KELLY, L.; JONES, R.D.; MACMILLAN ,A.; WOOLDRIDGE, M.** 2004. A simulation model of brucellosis spread in British cattle under several testing regimes. Prev Vet Med. 63: 63-73.
10. **GALL, D.; NIELSEN, K.** 2004. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 23:989-1002.
11. **GARÍN, A.** 2003. Estructura y situación de la campaña contra brucelosis bovina en el Uruguay. Jornada de actualización Técnica. 21/03/2003, La Paloma Rocha. http://www.mgap.gub.uy/DGSG/Capacitación/JornadasBrucelosis/CampañaDrGarin.zip
12. **GIL, A.D.; SIENRA, R.; PIAGGIO, J.; GUARINO, H.; ARRILLAGA, C.** 1999. Sistema de Monitoreo de Salud en la Producción Animal. Plan Piloto Lecheria 98. Informe. Faculta de Veterinaria.
13. **GIL, A.; SAMARTINO, L.** 2000. Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. Livestock Policy Discusión Paper Nº 2. Food and Agriculture Organization. Livestock Information and Policy Branch, AGAL-FAO. www.fao.org/ag/AGA/LSPA/papers/policypaper02.pdf
14. **GIL, A.; SAMARTINO, L.; OTTE, J.; BENKIRANE, A.** 2000. Principales zoonosis urbanas y periurbanas en la ganadería latinoamericana. XXI Congreso Mundial de Buiatría. Diciembre del 2000.
15. **GIL A.** 2002. Manejo de los rodeos de cría de bovinos para carne en Uruguay. Seminario técnico Cría y Recría Ovina y Vacuna. INIA Serie actividades de difusión 228. Pág. 71-80.
16. **GIL, A.; SILVA, M.; GARÍN ,A.; CAPONI, O.; CHANS, L.; VITALE, E.** 2003. Estudio transversal de la brucelosis bovina en el Uruguay. ISVEE. 708.
17. **GIL ,A.** 2003. Situación de la brucelosis bovina en la población ganadera del Uruguay. Buiatría.
18. **GONZALEZ-GUZMAN, J.; NAULIN, R.** 1994. Analysis of a model of bovine brucellosis using singular perturbations. Abstract CAB. J Math Biol 33:211-223.
19. **GONZALEZ TOMÉ ,J.; SAMARTINO, L.E.** 1997. Eficacia de la prueba del anillo en leche para el control y erradicación de la brucelosis bovina. Vet. Arg. 137:449-459.

20. JONES, R.D.; KELLY, L.; ENGLAND, T.; MACMILLA,N. A.; WOOLDRIDG, E. M. 2004. A quantitative risk assessment for the importation of brucellosis-infected breeding cattle into Great Britain from selected European countries. Prev Vet Med. 63:51-61.

21. KORN, E.L.; GRAUBARD, B.I. 1999. Analysis of health surveys. John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-13773-1.

22. MAF. 1977. Brucellosis: A Veterinarian's Guide to the literature. Ministry of Agriculture and Fisheries, Government Printer, Wellintogn, New Zealand.

23. MARTIN, S.W.; SHOUKRI, M.M.; THOBURN, M.A. 1992. Estimating the health status of herds based on tests applied to individuals. Prev. Vet. Med. 14:33-44.

24. MCMAHAN, K. 1944. Brucellosis of cattle. Historical document. Agricultural Experiment Station. Kansas State College of Agriculture and Applied Science Manhattan Kansas. Circular 222, 1-16.

25. NICOLETTI, P. 2002. A short history of brucellosis. Veterinary Microbiology 90:5-9.

26. NIELSEN, K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. Veterinary Microbiology 90:447-459.

27. LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 33: 159–174.

28. LOPEZ J.; BEST A.; MORALES C. 1998. Diagnóstico de brucelosis bovina en leche por el Ring Test y ELISA en lecherías de la provincia de Ñuble (VIII Región). *Arch. med. vet.* [online]. 1998, vol.30, n.1 [citado 2010-06-22], pp. 133-138. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X1998000100015&lng=es&nrm=iso. ISSN 0301-732X. doi: 10.4067/S0301-732X1998000100015.

29. PETERSON, M.J.; GRANT, W.E.; DAVIS, D.S. 1991. Simulation of host- parasite interactions within a resource management framework: Impact of brucellosis on bison population dynamics. Ecol. Modeling 54: 299- 320.

30. REPISO, M.V.; OLIVERA, M.; HERRERA, B.; SILVA, M.; GUARINO, H., NÚÑEZ, A.; OSAWA, T.; FERNÁNDEZ, L.; BAÑALES, P.; GIL, A. 2002. Prevalencia de las enfermedades que afectan la reproducción de los bovinos para carne en el Uruguay. Seminario técnico Cría y Recría Ovina y Vacuna. INIA Serie actividades de difusión 228. Pág. 57-70.

31. RIVERA, D.Y.; RUEDA, O.E.; CALDERON, C.P.; MARIÑO, O.C.; GALL, D.; NIELSEN, K. 2003. Evaluación comparativa del método inmunoenzimático indirecto en leche para la detección de bovinos infectados con *Brucella abortus*, en hatos del departamento de Cundinamarca, Colombia. Rev. Sci. Tech. OIE 22(3):1065-1075.

32. ROEPKE, M.H.; STILES, F.C. 1970. Potential efficiency of milk ring test for detection of brucellosis. Am. J. Vet. Res. (31) 12:2145-2149

33. ROEPKE, M.H.; PATERSON, M.H.; DRIVER ,F.C.; CLAUSEN, L.B.; OLSON, L.; WENTWORTH, J.E. 1950. The Brucella abortus Ring Test. Am. J. Vet. Res. 11:199-205.

34. STATACORP. 2009. *Stata Statistical Software: Release 11*. College Station, TX: StataCorp LP.

35. STEMSHORN, B.; FORBES, L.; EAGLESOME, M.; NIELSEN, K.; ROBERTSON, F.; SAMAGH, B. 1985. A comparison of standard serological tests for the diagnosis of bovine brucellosis en Canada. Can J Comp Med 49:395-400.

36. SUAREZ, R.; GIOVANNINI, F.; LOMELLO, V.; BERGAMO, E.; GIRAUDO, J. 2005. Evaluación económica del control de brucelosis bovina en rodeos lecheros de Cordoba. Abstract CAB. Veterinaria Argentina 22:26-43.

37. TAKEHISA, Y.; TOSHIYUKI, T.; NISHIGUCHI, A.; KOBAYASHI, S. 2008. Evaluation of surveillance strategies for bovine brucellosis in Japan using a simulation model. Prev. Vet. Med. 86: 57-74.

38. TECLAW, R.F. 1979. Epidemic modeling. Technical report N°6. Potencial economic impact of foot-and-mouth disease in the US. TP-1597. pages 103-132.

39. TYLER, M.A.; JAMES, A.D.; BAROZZI ,J. 1994. Estudio de factibilidad y propuesta de proyecto: «Erradicación de Brucelosis y Tuberculosis bovina e implementación de un sistema de

vigilancia epidemiológica, prevención y evaluación del impacto de enfermedades crónicas y complejos subclínicos en la ganadería uruguaya». Convenio OCT/RC-UR-2/92. MGAP. FONPLATA.

40. VANZINI,V.R.; AGUIRRE, N.P.; VALENTINI, B.S.; TORIONI, D.E. ; ECHAIDE, S.; LUGARESI, C.I.; MARCHESINO, M.D.; NIELSEN, K. 2001. Comparison of an indirect ELISA with the *Brucella* milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples. Vet. Micr. 82:55-60.