

Prevalencia y distribución espacial de brucelosis, leucosis bovina, diarrea viral bovina y rinotraqueítis infecciosa bovina a partir del análisis ELISA de estanques prediales en lecherías de la IX Región, Chile[#]

Prevalence and space distribution of brucellosis, bovine leukaemia, bovine viral diarrhoea and infectious bovine rhinotracheitis by using bulk milk ELISA test in dairy herds of the IX Region, Chile

R Felmer^{a*}, J Zúñiga^a, A López^b, H Miranda^b

^aLaboratorio de Biotecnología Animal, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile.

^bFacultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile.

SUMMARY

Chile is internationally recognized for its good zoo-sanitarian situation as the country has been able to reach and maintain a status of officially free from the main diseases of the OIE List, including foot and mouth disease and classical swine fever. However, several infectious diseases are known to remain among herds, which produce a major effect in production due to losses by abortion, decrease of fertility and what it is more important, some of them represent barriers for export and constitute a risk of zoonosis for the population. In this work, a monitoring system based on the analysis of bulk milk antibodies by means of ELISA test, was implemented to study the epidemiology and distribution of 4 of the main bovine diseases that currently affect the IX Region of Chile (brucellosis, bovine leukaemia, IBR and BVD). The system allowed the surveillance of 279 dairies, which represented 43% of the dairies registered in IX the Region, and included 19,635 milking cows (14%). With this system, a high prevalence for leukaemia (59%), IBR (76%) and BVD (96%) could be established, whereas it was confirmed that brucellosis is restricted to a few dairies (5%). The surveillance system coupled to the satellite geographic information analysis, allowed to establish the space distribution of these diseases in the different communes of the Region, demonstrating to be an excellent and low cost support tool for the monitoring of the diseases in the herd, which guarantees the possibility of establishing this platform in the Region and its feasibility to project it at national level.

Palabras clave: ELISA, estanque predial, enfermedades, SIG.

Key words: ELISA, bulk milk, diseases, GIS.

INTRODUCCIÓN

Chile es reconocido internacionalmente por poseer una buena situación sanitaria, pues el país ha podido alcanzar y mantener el estado de oficialmente libre de las principales enfermedades de la lista de la OIE (Organización Internacional de Epizootias), incluyendo la fiebre aftosa y la peste porcina clásica¹. Sin embargo, aún coexisten en nuestros rebaños bovinos una serie de enfermedades, las cuales tienen un directo impacto en la producción, por cuanto disminuyen la fertilidad, producen pérdidas por aborto, alargan el lapso interparto y fundamentalmente constituyen barreras sanitarias para la exportación. Si bien la prevalencia e impacto económico de algunas de estas enfermedades no están claras, existen estudios e informes que evidencian prevalencias altas en diversas

regiones y sectores del país, como en el caso de la diarrea viral bovina (DVB), rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y leucosis (Hochstein-Mintzel y col 1986, Reinhardt y col 1990, Celedón y col 1996, Zúñiga y col 2004). La falta de datos claros sobre la prevalencia de una enfermedad repercute negativamente, ya que no se puede cuantificar apropiadamente el impacto que ésta tiene en los sistemas productivos y menos tomar decisiones para su control y eventual erradicación. Las características de los análisis de diagnóstico actualmente empleados requieren de muestras individuales de suero de cada animal, lo cual impide una vigilancia adecuada de toda la masa bovina susceptible de contagios. Del mismo modo, una vez que se produce la erradicación de una enfermedad en los predios se debe monitorear la salud del rebaño constantemente, a fin de detectar nuevos brotes para poder controlarlos a tiempo (Lindberg y Alenius 1999). Diversos estudios en Europa han demostrado la factibilidad de diagnosticar algunas de las principales enfermedades del ganado bovino a partir de las inmunoglobulinas presentes en la leche, permitiendo de esta forma controlar el rebaño lechero mediante el método de ELISA aplicado a la detección de anticuerpos presentes

Aceptado: 30.07.2008.

[#] Proyecto FIA BID-PI-C-2001-1-P-035.

* Casilla 58-D, Temuco, Chile; rfelmer@inia.cl

¹ <http://www.sag.gob.cl>

en la leche del estanco predial (Kerkhofs y col 1990, Paton y col 1998, Wellenberg y col 1998, Lindberg y Alenius 1999, Nylin y col 2000, Pritchard y col 2002). Este sistema ELISA ha mostrado poseer una mayor sensibilidad y especificidad que los métodos tradicionales de diagnóstico, permitiendo además su automatización para realizar la vigilancia de los rebaños a un costo mucho menor (Nielsen y col 1996, Vanzini y col 2001). Más aún, algunos de los métodos desarrollados ya han sido reconocidos como métodos oficiales en EE.UU., Canadá y otros países de Europa y son recomendados actualmente por la OIE² para su incorporación en programas de control y prevención de enfermedades (Simard y col 2000). De esta forma, en este trabajo se implementó un sistema de vigilancia predial basado en el análisis ELISA para estudiar la epidemiología de cuatro de las principales enfermedades bovinas de la IX Región (brucelosis, leucosis DVB e IBR). Esta plataforma de vigilancia, acoplada a un sistema de información geográfica satelital (SIG), permitió además realizar un análisis espacial de la prevalencia de estas enfermedades en los predios y establecer su distribución en las diferentes comunas de la Región.

MATERIAL Y MÉTODOS

REGISTRO DE LECHERÍAS Y FRECUENCIA DE MUESTREOS

Se registraron y muestrearon 279 lecherías de la IX Región que contaban con estanco de enfriamiento de leche. De los predios registrados se pudieron obtener datos poblacionales de 245 lecherías mediante una encuesta realizada en terreno con el dueño o encargado de los predios. Estos datos representaron el 37,4% de las lecherías de la Región y el 46,8% de aquellas presentes en las 17 comunas del estudio, incluyendo un universo de 19.635 vacas equivalente al 14% de las vacas lecheras de la IX Región (INE 2003). De acuerdo al segmento poblacional de animales, el 60% de las lecherías tenían menos de 50 animales, mientras que el 40% restante estaba constituido por lecherías en el rango de 51-100 animales (13,5%), 101-150 animales (11,4%) y más de 151 animales (15,1%) (cuadro 1). En conjunto, las lecherías en el rango sobre 150 animales representaron más de la mitad (52%) del total de animales de la muestra (cuadro 1). La comuna de Freire concentró la mayoría de los predios con más de 100 animales y comunas como Pitrufrquén y Vilcún concentraron preferentemente a pequeños productores. El número de lecherías muestreadas en cada una de las tres oportunidades correspondió a 187 para el primer muestreo, 216 para el segundo y 246 para el tercero, representando el 67, 77 y 88% del total, respectivamente. Asimismo, 6, 11 y 41 muestras se recibieron exclusivamente en el primero, segundo o tercer muestreo y sólo 158 se recibieron en las

tres ocasiones, correspondiendo estas muestras al grupo de lecherías de seguimiento para efectos de este estudio.

UBICACIÓN GEOGRÁFICA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS PREDIOS

La ubicación geográfica de cada uno de los predios que participó en este estudio se obtuvo aprovechando los recorridos habituales de los camiones recolectores de las empresas lecheras de SOPROLE (Freire), SURLAT (Pitrufrquén) y PARMALAT (Victoria), las que participaron desinteresadamente de este estudio. Una vez en el predio, se ubicó el lugar donde se almacenaba el estanco predial, punto en el cual se tomó la lectura de su ubicación geográfica mediante un receptor GPS (Garmin Etrex). Esta lectura fue utilizada posteriormente para la generación de representaciones geográficas, empleando para este fin el programa Arcview GIS Versión 3.3, 2003 (Esri Inc.) y bases de datos de la región. En total se determinó la localización geográfica de 235 lecherías (84%) de las 279 efectivamente muestreadas. A partir de este conjunto de datos se pudo determinar que la mayoría de las lecherías muestreadas se localizaron en el valle central y preferentemente en las comunas de la provincia de Cautín. Esta distribución estuvo naturalmente condicionada por el área de cobertura de las plantas lecheras que colaboraron con este estudio, lo que excluyó del muestreo áreas lecheras importantes como Renaico, Villarrica y Loncoche, que entregan mayoritariamente su leche a la planta lechera de Loncoche (que declinó participar de este estudio) o de áreas que entregan la producción a plantas queseras como ciertas comunas de la costa. Los predios muestreados estuvieron distribuidos en 17 de las 26 comunas, incluyendo a Cunco, Curacautín, Ercilla, Freire, Galvarino, Gorbea, Lautaro, Loncoche, Padre Las Casas, Perquenco, Pitrufrquén, Temuco, Traiguén, Victoria, Imperial y Vilcún (cuadro 2). De esta forma, las 279 lecherías representaron el 43% de las lecherías de la Región y el 53% del universo de lecherías existentes a nivel de las 17 comunas muestreadas (cuadro 2). El número de lecherías muestreadas en cada comuna varió entre 1 (Ercilla e Imperial) y 57 (Vilcún), estando la mayoría concentradas en las comunas de Vilcún,

Cuadro 1. Distribución de vacas lecheras por segmento poblacional en una muestra de lecherías de la IX Región (n = 245).

Distribution of milking cows in a sample of dairies of the IX Region (n = 245).

Segmento poblacional	Nº de lecherías	%	Nº de vacas por segmento poblacional	%
< 50	147	60,0	3.537	18,0
51 a 100	33	13,5	2.401	12,2
101 a150	28	11,4	3.488	17,8
> 151	37	15,1	10.209	52,0
Total	245	100	19.635	100

² http://www.oie.int/eng/en_index.htm

Cuadro 2. Distribución de las lecherías muestreadas en las diferentes comunas de la IX Región.
Distribution of dairies sampled in different communes of the IX Region.

Comuna	Universe lecherías IX Región	Total de lecherías muestreadas	Participación por comuna (%)	Lecherías grupo seguimiento	Participación por comuna (%)
Angol	9	8	89	0	0
Collipulli	2	0	0	0	0
Cunco	18	18	100	10	56
Curacautín	10	6	60	6	60
Ercilla	7	1	14	1	14
Freire	84	56	67	29	35
Galvarino	2	2	100	2	100
Gorbea	40	35	88	6	15
Imperial	1	1	100	0	100
Lautaro	21	10	48	6	29
Loncoche	91	17	19	6	7
Los Sauces	1	0	0	0	0
Padre Las Casas	11	8	73	7	64
Perquenco	3	3	100	3	100
Pitrufuquén	137	40	29	24	18
Pucón	1	0	0	0	0
Puerto Saavedra	3	0	0	0	0
Purén	9	0	0	0	0
Renaico	80	0	0	0	0
Temuco	7	4	57	2	29
Teodoro Schmidt	15	0	0	0	0
Toltén	7	0	0	0	0
Traiguén	10	2	20	2	20
Victoria	11	11	100	7	64
Vilcún	61	57	93	47	77
Villarrica	14	0	0	0	0
Total	655	279		158	

Freire, Gorbea y Pitrufuquén y la proporción del universo comunal varió entre 14% (Ercilla) y 100% (Cunco, Galvarino, Imperial, Perquenco y Victoria) (cuadro 2).

TOMA DE MUESTRAS DE LECHE Y PROCESAMIENTO

Las muestras de leche de los estanques prediales fueron recolectadas en frascos plásticos conteniendo dicromato de potasio (0,1% p/v) como preservante y remitidas directamente al laboratorio de Biotecnología Animal de INIA-Carillanca, distante 20 km de la ciudad de Temuco. A su llegada al laboratorio, se procedió inmediatamente al descremado de las muestras mediante su centrifugación por 10 minutos a 3.500 r.p.m., dejando la fracción clarificada almacenada a -20 °C para su posterior análisis mediante ELISA.

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

La detección de anticuerpos a *Brucella abortus*, VLEB, VDVB y VHB-1, en las muestras de leche, se realizó

mediante la técnica de enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA-i) empleando un kit comercial (Svanovir® SVANOVA, Suecia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las lecturas espectrofotométricas se realizaron en un lector ELISA (Labsystems, Multiskan EX) a 450 nm para VLEB, VDVB y VHB-1 y a 650 nm para *Brucella abortus*. Para cada prueba, los valores de absorbancia de las muestras fueron estandarizados contra un control positivo y su clasificación como positivas o negativas se estimó de acuerdo al valor de cut-off sugerido por el fabricante.

ANÁLISIS KRUSKALL-WALLIS

La relación entre la presencia de las enfermedades y el número de vacas en ordeña por predio se estableció empleando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con el programa SPSS versión 11.5 para Windows (SPSS Inc., Chicago II, USA), considerando como significativo el resultado si $P < 0,05$.

ANÁLISIS DE DENSIDAD DE NÚCLEO (KERNEL)

El análisis de núcleo se realizó empleando las coordenadas obtenidas mediante la lectura GPS y el programa JMP (SAS Institute, 2003), considerándose para cada análisis la reactividad de las enfermedades y su relación espacial en los predios.

RESULTADOS

ANÁLISIS DE ANTICUERPOS A *BRUCELLA ABORTUS*, VLEB, VDVB Y VHB-1 EN MUESTRAS DE LECHE DEL ESTANQUE PREDIAL

Se detectaron anticuerpos a *Brucella abortus* en 6, 5 y 5%, respectivamente, de los estanques prediales muestreados en cada oportunidad (figura 1), mientras que para leucosis, se detectaron anticuerpos en 63, 57 y 57%, respectivamente (figura 1). Una mayor proporción de anticuerpos se detectó para VDVB, con 98, 96 y 93%, respectivamente (figura 1). Esta situación fue similar a la observada para VHB-1, con 78, 76 y 72%, respectivamente (figura 1). Los valores obtenidos para estas cuatro enfermedades fueron similares en las 158 lecherías del grupo de seguimiento (cuadro 3). La distribución geográfica de las lecherías positivas a brucelosis permitió establecer su localización principalmente en las comunas de Freire y Vilcún (figura 2)

y en su gran mayoría correspondieron a predios de más de 100 vacas por lechería (dato no mostrado). En el caso de leucosis, se observó una distribución más uniforme, estando presente la enfermedad en todas las comunas analizadas, con la excepción de aquellas con una baja representación de predios (Temuco, Ercilla y Perquenco). En el caso de DVB e IBR, debido a que el número de lecherías libres de anticuerpos fue muy baja (figura 1), se realizó un análisis en base al título de anticuerpos, lo cual permite clasificar a aquellas lecherías donde existe mayor probabilidad de estar cursando infección activa (Niskanen y col 1991, 1993). La figura 3 muestra la variación de las proporciones relativas de los estanques en cada clase obtenida durante el primer muestreo realizado a las 158 lecherías de seguimiento. La mayor proporción de predios con una alta probabilidad de infección activa en ambas enfermedades se encontró en las comunas de Vilcún, Freire y Pitrufrquén, consistente con la mayor representación de predios en estas comunas. Aun cuando la mayoría de las lecherías positivas se mantuvo relativamente constante durante los muestreos sucesivos, la fracción de lecherías en clase 3 tendió a disminuir durante el período de observación (cuadro 3).

El análisis de brucelosis, leucosis y diarrea viral bovina, mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, permitió establecer que no existe una relación entre el número de vacas en ordeña y la presencia de estas enfermedades en la muestra analizada. Sin embargo, en el caso

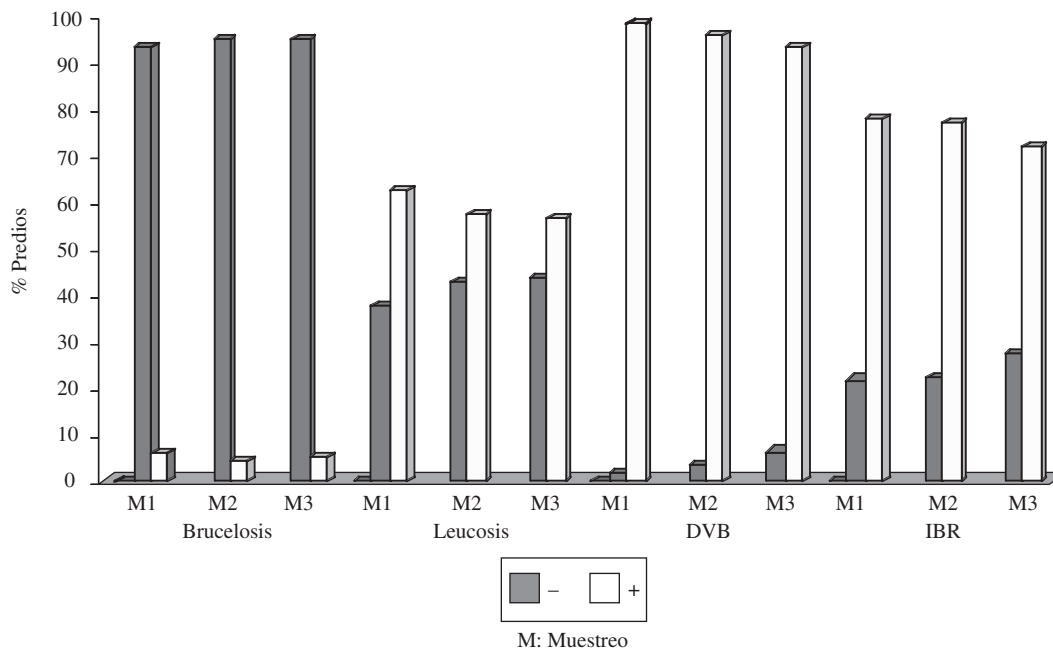


Figura 1. Prevalencia de las cuatro enfermedades evaluadas en una muestra de lecherías de la IX Región en cada uno de los tres muestreos realizados.

M: Muestreo, M1: 187 lecherías, M2: 216 lecherías, M3: 246 lecherías.

Prevalence of the 4 diseases evaluated in a sample of dairies of the IX Region in each one of three samplings carried out. M: Sampling, M1: 187 dairies, M2: 216 dairies, M3: 246 dairies.

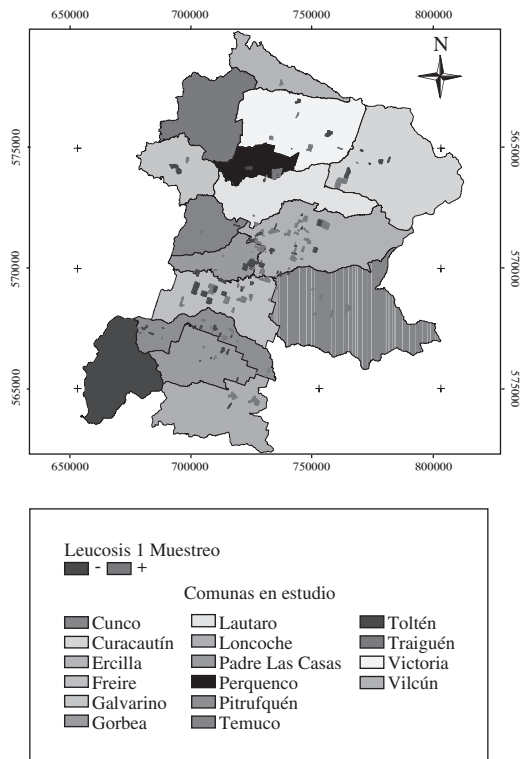
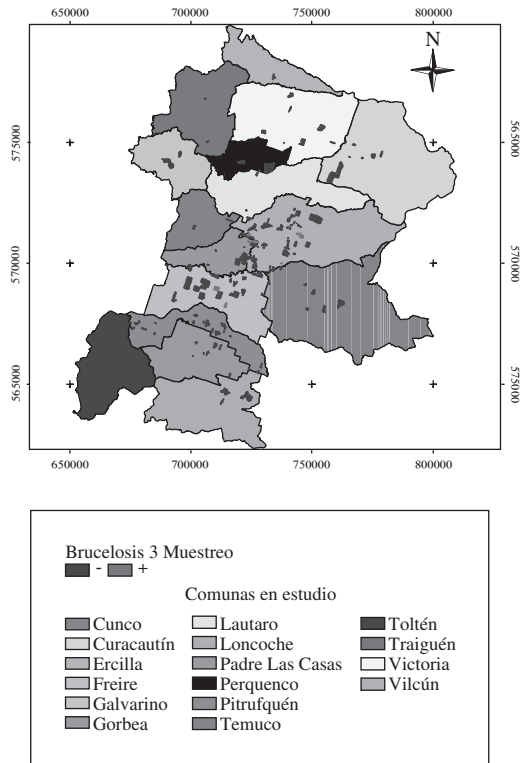


Figura 2. Localización geográfica de predios positivos a brucelosis y leucosis en una muestra de 158 lecherías de la IX Región.

Geographic location of herds positive to brucellosis and leucosis in a sample of 158 dairies of the IX Region.

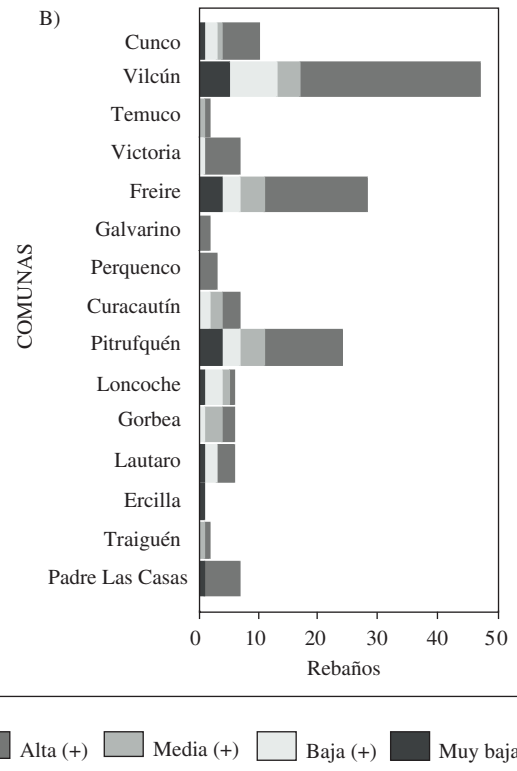
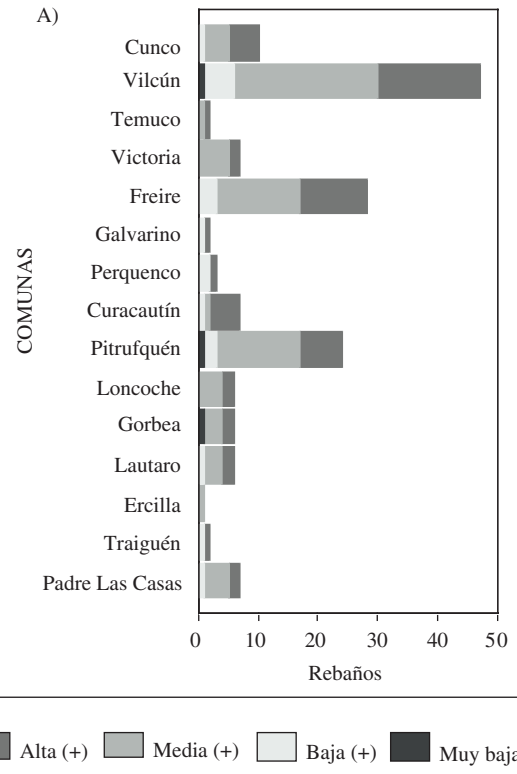


Figura 3. Clasificación de las lecherías de acuerdo al nivel de anticuerpos en la leche del estanque predial y su asociación con la probabilidad de ocurrencia de infección activa. Panel A: DVB, Panel B: IBR.

Classification of dairies according to the level of antibodies in bulk milk samples and its association with the probability of occurrence of active infection. Panel A: BVD, Panel B: IBR.

Cuadro 3. Prevalencia de brucelosis, leucosis, DVB e IBR observada en una muestra de lecherías de la IX Región, en base al análisis ELISA aplicado a la leche del estanque predial.

Prevalence of brucellosis, leukaemia, BVD and IBR observed in a sample of dairies of the IX Region, on the basis of bulk milk ELISA test.

	Total por muestreo			Grupo de seguimiento		
	Jun-03	Dic-03	Sep-04	Jun-03	Dic-03	Sep-04
Lecherías analizadas	187	216	246	158		
Fecha muestreo	Jun-03	Dic-03	Sep-04	Jun-03	Dic-03	Sep-04
positivas a brucelosis	6%	5%	5%	6%	4%	4%
positivas a leucosis	63%	57%	57%	62%	61%	60%
positivas a DVB	98%	96%	93%	98%	97%	95%
Clase 3 DVB	39%	44%	25%	37%	44%	19%
positivas a IBR	78%	77%	72%	77%	80%	77%
Clase 3 IBR	62%	55%	41%	61%	56%	43%

Cuadro 4. Prueba de Kruskal-Wallis para establecer la relación entre el número de vacas en ordeña y la presencia de las cuatro enfermedades en la muestra de 158 lecherías.

Kruskal-Wallis test, to establish the relationship between the number of milking cows and the presence of the four diseases in a sample of 158 dairies.

	B1	B2	B3	LEB1	LEB2	LEB3	DVB1	DVB2	DVB3	IBR1	IBR2	IBR3
χ^2	0,468	5,842	2,138	0,816	0,623	0,328	3,980	4,818	2,379	11,921	14,008	7,566
GI	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
P	0,791	0,054	0,343	0,665	0,732	0,849	0,137	0,090	0,304	0,003	0,001	0,023

Variable de agrupación analizada: vacas en ordeña por predio (0-100) (101-200) (201≥300).

de rinotraqueítis infecciosa bovina, en los tres muestreos realizados, se obtuvo una relación altamente significativa ($P \leq 0,05$), confirmando en este caso que hay una relación entre el número de animales en ordeña y la presencia de esta enfermedad en los predios (cuadro 4).

El análisis de la distribución espacial y su relación con las enfermedades, mediante la prueba no paramétrica de Kernel, permitió establecer los puntos de mayor concentración o densidad que determinan por tanto los lugares de mayor riesgo entre las comunas. De esta forma, para el caso de brucelosis (figura 4) las curvas de densidad confirman que las comunas de Vilcún y Freire concentran la mayor cantidad de predios positivos. De acuerdo a este análisis, la comuna que presenta el mayor riesgo de contagio corresponde a la comuna de Vilcún (coordenadas 720.000, 5.710.000), la cual presenta una mayor densidad y cercanía de predios negativos a los focos de infección. En el caso de leucosis, en los puntos de mayor densidad se encuentra el mayor porcentaje de predios positivos (coordenadas 720.000, 5.710.000 y 740.000, 5.710.000). Esta área de mayor densidad confirma el hecho de que la muestra tiene un gran componente debido al efecto de la comuna, que en el caso de Vilcún corresponde a la comuna con mayor participación de predios. Este análisis permitió además identificar zonas de una alta densidad de rebaños negativos para leucosis, tales como los que se encuentran en la comuna de Pitrufquén. Por otra parte,

hay sectores en que a pesar de que las densidades son bajas todos los rebaños se presentan positivos frente al análisis de ELISA, como es el caso de la comuna de Cunco (figura 4).

DISCUSIÓN

En este estudio se registraron y muestrearon 279 lecherías distribuidas en 17 comunas de la IX Región, lo que equivale al 43% de las lecherías oficialmente reconocidas en la Región (cuadro 2). El análisis de anticuerpos realizado en los tres muestreos efectuados entre junio de 2004 y septiembre de 2005 indica que la situación para las cuatro enfermedades estudiadas es muy diversa. Mientras brucelosis se encuentra bajo control y restringida a unas pocas comunas, con una prevalencia predial de la muestra que no supera el 5%, leucosis, DVB e IBR se encuentran presentes en la mayoría de las comunas estudiadas con una prevalencia promedio de la muestra de 59, 96 y 76%, respectivamente (figura 1). La baja prevalencia de brucelosis se explica por el programa de control y erradicación implementado por el SAG que permitió disminuir la prevalencia descrita en el año 1982 de un 20,4% a nivel de rebaños y un 7% en los animales a alrededor de un 3% del censo de bovinos (Amthauer 1993, SAG 2005). Actualmente, la vigilancia de esta enfermedad se basa, entre otras acciones, en el análisis trimestral de

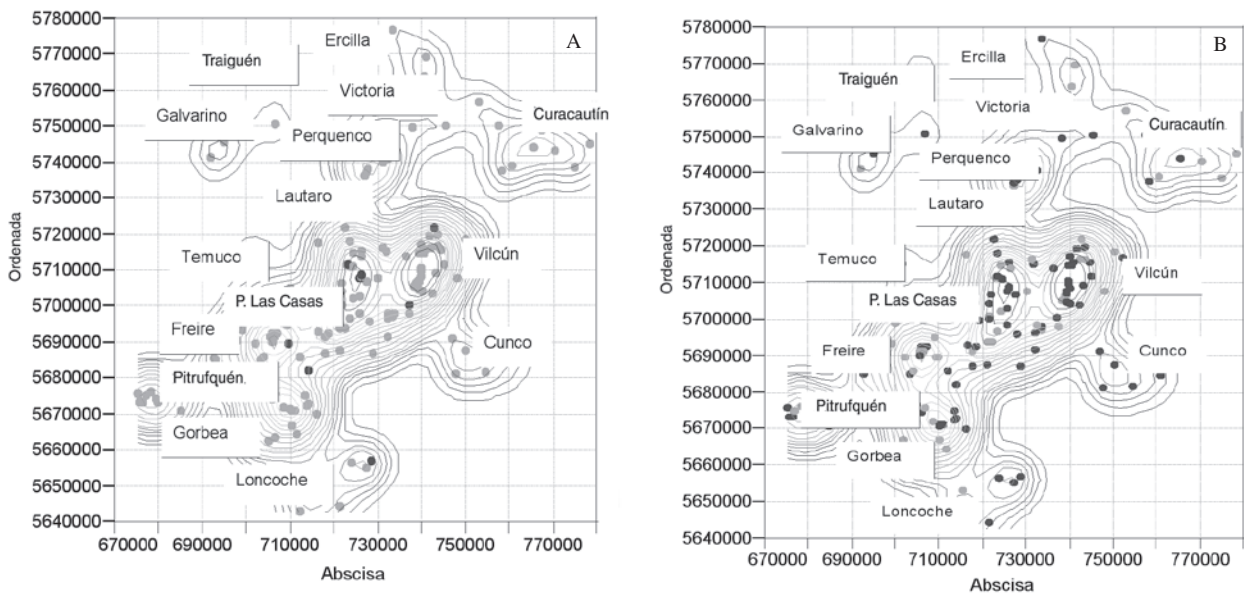


Figura 4. Análisis de densidad no paramétrica Kernel ajustada a ordenada por abscisa para brucelosis (Panel A) y leucosis (Panel B) indicando la presencia de anticuerpos a la enfermedad en los predios (puntos negros).

Nonparametric density estimation (Kernel), fit to ordered by abscissa for brucellosis (Panel A) and leukaemia (Panel B) indicating the presence of antibodies to the disease in the herds (black points).

muestras de leche del estanque predial mediante la Prueba del Anillo en leche (Ring test)(SAG 2004). Si bien esta prueba permite un monitoreo a bajo costo del estatus de anticuerpos en una lechería determinada, la clasificación de esta prueba es subjetiva y el nivel de anticuerpos no se puede cuantificar, impidiendo de esta forma un adecuado seguimiento entre los distintos muestreos, situación que es crítica para detectar a tiempo a aquellas lecherías que están en las primeras etapas del proceso de infección (Vanzini y col 2001). En este estudio, el análisis mediante ELISA permitió detectar anticuerpos en 12, 10 y 12 lecherías en cada muestreo, representando una prevalencia de 6, 5 y 5%, respectivamente, del total de muestras recibidas en cada oportunidad, lo que confirma la baja presencia de esta enfermedad en la Región y su tendencia gradual a la erradicación. Esta favorable situación se confirma al examinar la evolución de la inmunidad de esta enfermedad en un grupo de 158 lecherías de seguimiento, cuyas muestras pudieron ser recibidas y analizadas en las tres oportunidades. En este grupo, el porcentaje de lecherías positivas en cada uno de los muestreos realizados correspondió a 6, 4 y 4%, respectivamente (cuadro 3), observándose una disminución sostenida de la detección de anticuerpos en aquellos predios donde efectivamente se implementaron medidas de control en los rebaños. Esta situación quedó mejor evidenciada en un estudio de caso realizado a una lechería que pasó de una reacción altamente positiva en el estanque predial a negativa. En esta oportunidad, el cambio de reacción en el estanque predial se pudo asociar a la remoción de tres animales positivos detectados luego de analizar serológicamente a todos los animales del rebaño,

empleando esta misma prueba ELISA (Zúñiga y col 2004). Geográficamente, las lecherías positivas a brucelosis se localizaron principalmente en las comunas de Freire y Vilcún (figura 2) que en su mayoría correspondieron a predios de más de 100 vacas por lechería. Estas lecherías representaron los puntos de mayor riesgo, al encontrarse en zonas de alta densidad y colindantes a predios negativos (figura 4). En efecto, en algunos predios fue posible asociar la infección con la compra de animales infectados desde predios vecinos previamente infectados (datos recabados directamente con el encargado de la lechería), lo que resalta la importancia de la implementación en los predios de medidas de bioseguridad para evitar el contagio.

La situación de leucosis en Chile es muy diversa, dependiendo de la zona del país evaluada. Los primeros estudios disponibles se enfocaron a determinar la prevalencia intrapredial de la enfermedad, permitiendo confirmar distintas prevalencias desde la III a la X Región y con zonas endémicas como la VIII (Reinhardt y col 1988, Naranjo 1989, Islas y col 1990). Estudios posteriores realizados por el SAG, en el marco del Proyecto de Vigilancia Pecuaria, permitieron establecer prevalencias prediales de 87% para la Región Metropolitana, 38% para la IX Región y 21% para la X Región (González 1996). En nuestro caso y a diferencia de los registros anteriores, se estableció una prevalencia predial más elevada para la IX Región, detectándose anticuerpos en 117, 124 y 139 lecherías, lo que correspondió a una prevalencia de la muestra equivalente a 63, 57 y 57%, respectivamente (cuadro 3). La disminución de la prevalencia entre el primer y segundo muestreo (6%) obedeció más bien a

la inclusión de un mayor número de lecherías negativas en el segundo muestreo que a una tendencia neta a la disminución de la prevalencia, como ocurrió en el caso de brucelosis, situación que se confirma con el grupo de lecherías de seguimiento, donde se registró una caída de la prevalencia de sólo un 1% (cuadro 3). En este mismo grupo, la incidencia de la enfermedad entre el primer y segundo muestreo correspondió a un 3,8%, proceso que pudo estar relacionado a la infección reciente de estos predios, mediante la introducción de animales infectados que aumentaron levemente la reacción del estanque. También se pudo constatar que algunas lecherías positivas durante el primer muestreo (3) aparecieron negativas durante el segundo y tercer muestreo, coincidiendo en estos casos que estos predios se encontraban en saneamiento. La distribución espacial de leucosis fue relativamente uniforme en las comunas analizadas (figura 2) y no se encontró una relación de esta enfermedad con el número de animales en los rebaños (cuadro 4). La mayor prevalencia de leucosis descrita en este estudio (61%) respecto a los antecedentes disponibles para la IX Región (38%) se puede explicar por el tamaño y distribución de la muestra analizada ya que en este estudio quedaron excluidas importantes comunas lecheras de la IX Región tales como Renaico, Loncoche y la mayoría de los predios de Pitrufrquén, los cuales representan cerca del 45% de las lecherías de la Región (cuadro 2). Sin embargo, los recientes antecedentes sobre la mayor sensibilidad de la prueba de ELISA, respecto al método oficial empleado para el diagnóstico de leucosis (AGID), podrían también explicar la mayor prevalencia observada para esta enfermedad (Trono y col 2001, Felmer y col 2006).

La DVB se encuentra ampliamente distribuida en Chile, con estudios de seroprevalencia de 69,2 y 77,8% para la IX y X Región, respectivamente (Reinhardt y col 1990), y 59,7 y 86% en la Región Metropolitana para el ganado de leche y carne, respectivamente (Celedón y col 1996, Palacios 1996). En este estudio se determinó una alta prevalencia de esta enfermedad en la Región (96%), coincidiendo con los estudios anteriores. Aun cuando en la muestra hubo escasas lecherías libres de anticuerpos a VDVB, lo importante en esta enfermedad es conocer la fracción de predios en los que está ocurriendo infección activa. De acuerdo a esto, los países nórdicos dividen los predios en cuatro categorías o clases según la magnitud del valor ELISA registrado para los anticuerpos a VDVB y VHB-1 (clase 0, $OD \leq 0,05$, Clase 1 $OD 0,051 - 0,250$, Clase 2 $OD 0,251-0,550$, clase 3 $OD \geq 0,551$). En base a las características de la transmisión de estas enfermedades, se ha determinado que mientras más alto sea el valor ELISA (predios clase 3), mayor es la probabilidad que esté ocurriendo una infección activa o un cuadro agudo de la enfermedad, como asimismo mayor es la probabilidad de encontrar animales persistentemente infectados (PI) para el caso de DVB (Niskanen y col 1991, 1993). A pesar de que en promedio el 96% de las lecherías presentó anticuerpos

contra el virus DVB en los tres muestreos efectuados, sólo 73, 95 y 61 lecherías se clasificaron en clase 3 (39, 44 y 25% del total de cada muestreo) y son sospechosas por tanto de presentar infección activa. Las proporciones de lecherías en clase 3 en el grupo de seguimiento correspondieron a 37, 44 y 19%, respectivamente (cuadro 3). Estas observaciones sugieren un mayor dinamismo de este virus comparado con brucelosis y leucosis, consistente con la biología de este patógeno. Aun cuando no hay datos nacionales comparables, se estima que la proporción de lecherías en clase 3 es alta. Esta situación reflejaría la existencia de una presión de infección alta para esta enfermedad, favorecida por la inexistencia de medidas de control y deficiencias en la aplicación de medidas de bioseguridad por parte de los productores (Lindberg y Alenius 1999). No obstante, datos equivalentes obtenidos en un estudio realizado recientemente en Perú permitieron establecer que la proporción de lecherías en clase 3 era superior al reportado en nuestro caso (Stahl y col 2002). Las comunas con la mayor proporción de lecherías en clase 3 correspondieron a Curacautín (80%) y Ercilla (100%), mientras que la mayor cantidad de lecherías en clase 3 de esta muestra estuvieron concentradas en Vilcún, Freire y Pitrufrquén, que corresponden a las comunas con mayor representación (figura 3). Sin embargo, no se pudo establecer una relación entre el número de animales en las lecherías y el riesgo de infección en los rebaños analizados (cuadro 4).

Los estudios disponibles acerca de la prevalencia de IBR en el país indican una alta prevalencia en el sur con valores prediales de 95% (Hochstein-Mintzel y col 1986) y de 86% en la zona central (Celedón y col 1996). En este estudio se pudo establecer un 76% de prevalencia de la infección por VHB-1 en las lecherías muestreadas de la IX Región, confirmando, al igual que DVB, que ambas enfermedades se encuentran altamente distribuidas. Sin embargo, en este caso una fracción mayor de lecherías fue clasificada en clase 3, las que tendieron a disminuir en los sucesivos muestreos de 62 a 41%, respectivamente (cuadro 3). Las comunas que concentraron la mayor cantidad de lecherías en esta clase fueron Vilcún, Freire y Pitrufrquén, al igual que la situación observada para DVB (figura 3), siendo Freire la comuna que presentó la proporción más alta de lecherías en esta clase, lo que es consistente con el hecho de que en esta comuna predominan los rebaños grandes. Esta situación fue confirmada mediante el análisis de Kruskal-Wallis que arrojó una relación altamente significativa entre el número de animales en ordeña y la presencia de esta enfermedad en la muestra. Esta prueba permitió confirmar que IBR se presenta con mayor probabilidad en los rebaños con un número más alto de animales por predio, donde existiría una mayor tendencia al stress debido a las condiciones de manejo y confinamiento, una de las principales causas que gatillan la aparición a esta enfermedad (Tikoo y col 1995).

La técnica de ELISA aplicada en este estudio permitió detectar de manera semicuantitativa la presencia de inmu-

noglobulinas específicas presentes en la leche del estanque predial, producidas en respuesta a los patógenos causantes de las principales enfermedades analizadas en la Región. La aplicación de este sistema permitió la vigilancia y monitoreo predial de estas enfermedades a un costo relativamente bajo, contando con la ventaja de un diagnóstico precoz y de alerta temprana ante la introducción de algún patógeno en los predios. A diferencia de lo que ocurre con los métodos de diagnóstico actualmente en uso, esta plataforma ofrece la posibilidad de sistematizar y escalar el sistema de monitoreo de acuerdo a las necesidades, permitiendo además realizar el análisis de muestras individuales de animales para detectar y eventualmente eliminar a aquellos que efectivamente se encuentren positivos para una determinada enfermedad. Además, junto a la integración a sistemas de información geográfica satelital, este sistema demostró la factibilidad de estudiar la epidemiología y distribución de una enfermedad en las distintas comunas de la Región, información que es de gran relevancia en el proceso de control y erradicación de una enfermedad en un área particular.

El sistema de monitoreo y vigilancia predial basado en el análisis de ELISA de muestras de leche del estanque predial permitió establecer por primera vez en la Región, que leucosis, IBR y DVB se encuentran ampliamente distribuidas en las lecherías, mientras que brucelosis se encuentra restringida a unas pocas lecherías. El acoplamiento de esta plataforma a un sistema de información geográfica satelital (SIG) permitió realizar un análisis espacial de la prevalencia de estas enfermedades en las diferentes comunas de la Región, constituyéndose en una herramienta de apoyo para la vigilancia de estas enfermedades en las lecherías y para estudios epidemiológicos.

RESUMEN

Chile es reconocido internacionalmente por poseer una buena situación sanitaria pues el país ha podido alcanzar y mantener el estado de oficialmente libre de las principales enfermedades de la lista de la OIE. Sin embargo, aún coexisten en nuestros rebaños bovinos una serie de enfermedades, las cuales tienen un directo impacto en la producción, por cuanto disminuyen la fertilidad, producen pérdidas por aborto, alargan el lapso interparto y fundamentalmente constituyen barreras sanitarias para la exportación, ya que constituyen un riesgo de zoonosis para la población. En este trabajo se implementó un sistema de vigilancia predial basado en el análisis ELISA de muestras de leche del estanque, para estudiar la epidemiología y distribución espacial de cuatro de las principales enfermedades bovinas que afectan a la IX Región de Chile (brucelosis, leucosis bovina, DVB e IBR). Este sistema permitió monitorear el estado de estas enfermedades en 279 lecherías, cobertura que representó al 43% de las lecherías registradas en la IX Región, abarcando 19.635 vacas lecheras (14%). Con este sistema se pudo establecer por primera vez en la Región una alta prevalencia en la muestra para leucosis (59%), IBR (76%) y DVB (96%), mientras que se confirmó que brucelosis se encuentra restringida a unas pocas lecherías (5%). Este sistema de monitoreo predial acoplado al análisis espacial (SIG) permitió establecer la distribución de estas enfermedades en las distintas comunas de la Región, demostrando ser una valiosa herramienta de apoyo y de bajo costo para la vigilancia epidemiológica de enfermedades en el rebaño lechero, lo que avala la posibilidad de establecer dicha plataforma como sistema de vigilancia predial en la Región y su factibilidad de proyectarla a nivel nacional.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la asesoría brindada por el profesor Stefan Alenius de la Universidad de Ciencias Agrícolas (SLU) de Suecia y el apoyo técnico brindado en los muestreos por Horacio Floody de INIA-Carillanca. Además, agradecen la colaboración anónima y desinteresada de los productores de la IX Región que facilitaron el muestreo de sus rebaños.

REFERENCIAS

- Amthauer E, A Rivera, L Paredes, H Galleguillos, O Muñoz, B Pérez, J Soto. 1993. Saneamiento y certificación de predios libres de brucelosis bovina. Proyecto de saneamiento y certificación de predios libres de brucelosis, tuberculosis y leucosis bovina. Informe final 1988-1992. Ministerio de Agricultura, Servicio Agrícola y Ganadero, Chile, Pp 19-25.
- Celedón MO, C Vargas, A Salinas, A Casanova, L Ibarra, P Berríos. 1996. Prevalencias serológicas para el virus diarrea viral bovina y de la rinotraqueítis infecciosa bovina en predios lecheros de la Región Metropolitana de Chile. *Av Cs Vet* 11, 75-80.
- Felmer R, J Zúñiga, M Recabal. 2006. Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. *Arch Med Vet* 38, 137-141.
- González CG. 1996. Informe final del proyecto de vigilancia pecuaria, período 1989-1996. Servicio Agrícola y Ganadero, Pp 10-13.
- Hochstein-Mintzel V, G Reinhardt, S Riedemann, M Niedda. 1986. Serología de rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) en 21 predios de la Décima Región de Chile. *Arch Med Vet* 18, 53-56.
- INE, Instituto Nacional de Estadísticas. 2003. Población de ganado vacuno por regiones. Santiago, Chile.
- Islas A, C Inchaurtieta, G Muñoz. 1990. Prevalencia de leucosis zoonótica bovina (LEB) en lecherías de las comunas de San Fernando, Chimbarongo y Placilla. *Monograf Med Vet* 12, 64-70.
- Kerkhofs P, Y Botton, P Thiange, P Dekeyser, JN Limet. 1990. Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk. *Vet Microbiol* 24, 73-80.
- Lindberg AL, S Alenius. 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet Microbiol* 64, 197-222.
- Naranjo J. 1989. Sistema de certificación de predios libres de leucosis bovina. Santiago. Servicio Agrícola y Ganadero, Ministerio de Agricultura, Pp 14.
- Nielsen K, P Smith, D Gall, B Pérez, C Cosma, P Mueller, J Trottier, G Cote, L Boag, J Bosse. 1996. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in milk. *Vet Microbiol* 52, 165-73.
- Niskanen R, S Alenius, B Larsson, S Jacobsson. 1991. Determination of level antibodies to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds. *Arch Virol Suppl* 3, 245-251.
- Niskanen R. 1993. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet Rec* 133, 341-344.
- Nylin B, U Stroger, L Ronsholt. 2000. A retrospective evaluation of a Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) antibody ELISA on bulk-tank milk samples for classification of the BHV-1 status of Danish dairy herds. *Prev Vet Med* 47, 91-105.
- Palacios LR. 1996. Prevalencia serológica para el virus de la diarrea viral bovina en ganado de carne en predios de la Región Metropolitana. Memoria de título, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Paton DJ, KH Christiansen, S Alenius, MP Cranwell, GC Pritchard, TW Drew. 1998. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. *Vet Rec* 142, 385-91.

- Pritchard GC, GM Kirkwood, AR Sayers. 2002. Detecting antibodies to infectious bovine rhinotracheitis and BVD virus infections using milk samples from individual cows. *Vet Rec* 150, 182-183.
- Reinhardt G, V Hochstein-Mintzel, S Riedemann, H Leal, M Niedda. 1988. Estudio serológico de leucosis enzoótica bovina en un predio de la provincia de Valdivia y su relación a parámetros productivos y reproductivos. *J Vet Med B* 35, 178-185.
- Reinhardt G, S Riedemann, S Ernst, M Aguilar, R Enriquez, J Gallardo. 1990. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea/ mucosal disease in southern Chile. *Prev Vet Med* 10, 73-78.
- SAG, Servicio Agrícola y Ganadero. 2004. Programa Oficial de Erradicación de Brucelosis Bovina. Manual de procedimientos N° 1. Chile. Informe, Pp 32.
- SAG, Servicio Agrícola y Ganadero. 2005. Situación Sanitaria Animal Chile 2004. Informe, Pp 56.
- SAS Institute. 2003. JMP Statistical Discovery Software. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.
- Simard C, S Richardson, P Dixon, C Belanger, P Maxwell. 2000. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *Can J Vet Res* 64, 101-106.
- Stahl K, H Rivera, I Vagsholm, J Moreno-Lopez. 2002. Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. *Prev Vet Med* 56, 93-202.
- Tikoo SK, M Campos, LA Babiuk. 1995. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Adv Virus Res* 45, 191-223.
- Trono K, D Pérez-Filgueira, S Duffy, M Borca, C. Carrillo. 2001. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol* 26, 235-248.
- Vanzini VR, NP Aguirre, BS Valentini, S Torioni de Echaide, CI Lugaresi, MD Marchesino, K Nielsen. 2001. Comparison of an indirect ELISA with the Brucella milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples. *Vet Microbiol* 82, 55-60.
- Wellenberg GJ, ER Verstraten, MH Mars, JT van Oirschot. 1998. ELISA detection of antibodies to glycoprotein E of bovine herpesvirus 1 in bulk milk samples. *Vet Rec* 142, 219-220.
- Zúñiga J, R Felmer, N Gaete, H Floody. 2004. Vigilancia de enfermedades infecciosas del bovino basada en el análisis serológico sistemático de la leche del estanco predial. *Resúmenes de la XXIX Reunión Anual de SOCHIPA*. Villarrica, Chile, Pp 201-202.