

PROGRAMA NACIONAL DE MONITOREO CONTINUO O VIGILANCIA ACTIVA DE LA BRUCELOSIS



Trinidad Beni-Bolivia 2016

CONTENIDO

I.- INTRODUCCION	1
II.- JUSTIFICACION	1
III.- OBJETIVO	1
IV .- TIPOS DE MONITOREOS	1
4.1. Monitoreo o Vigilancia Activa de predios lecheros, en centros de acopio y plantas lácteas	1
4.1.1. Selección de centros de acopio y plantas lácteas e identificación de predios productores	2
4.1.2. Recolección, identificación y envío de muestras de leche	2
4.1.3. Pruebas en la leche	2
• I-ELISA en leche	2
• Prueba de anillo en leche	3
4.1.4. Investigación de hatos con resultados positivos	3
4.2. Monitoreo o Vigilancia Activa en plantas de Faena, Mataderos y Frigoríficos	3
4.2.1. Selección de plantas frigoríficas o mataderos	3
4.2.2. Recolección, identificación y envío de muestras de sangre	3
4.2.3. Pruebas de laboratorio	5
4.2.4. Investigación de hatos con resultados positivos	5
4.3. Monitoreo o Vigilancia Activa en Centros de Remates y Ferias de Ganaderas	5
4.3.1. Selección de Centros de Remates y Ferias de ganado	6
4.3.2. Recolección, identificación y envío de muestras de sangre	6
4.3.3. Pruebas de laboratorio	6
4.3.4. Investigación de hatos con resultados positivos	7
V.- CRONOGRAMA	7
VI.- PRESUPUESTO Y FUENTE DE FINANCIAMIENTO	7

I. INTRODUCCION

La vigilancia epidemiológica para brucelosis está fundamentada en la recolección, análisis, evaluación e interpretación del comportamiento de la enfermedad y su función principal es informar permanentemente respecto de la dinámica de ésta en una población con el fin de contribuir con los planes de control y erradicación. Mundialmente, esos planes se basan en la vacunación de las hembras y en la eliminación de animales infectados. Pero, se ha demostrado que es imprescindible apoyarlas con un sistema de información que sea activo y permanente dado que la sola implementación de esas medidas, no permite alcanzar los objetivos propuestos en los programas.

El objetivo principal del Plan de Monitoreo Continuo es ubicar predios infectados, depurarlos y mantener la supervisión sobre los limpios. Es por ello que la selección adecuada de las metodologías diagnósticas sea de gran valor. Esa valoración está estrechamente relacionada a la validez (sensibilidad y especificidad), seguridad (valores de predicción) y razón de desigualdad de las pruebas a utilizar según la fase del problema existente ya que a medida que la prevalencia de la brucelosis bovina disminuye, la erradicación dependerá marcadamente de la capacidad de los métodos de detección, requiriéndose distinguir eficientemente y a nivel poblacional, aquellos predios con infección, por baja que ésta sea; de otra forma, los progresos se interrumpen y las pérdidas se incrementan exponencialmente. Se requiere además que esas pruebas sean sencillas, de bajo costo y de fácil interpretación.

II. JUSTIFICACION

Las enfermedades infecciosas impactan negativamente en la productividad pecuaria del país. Entre estas enfermedades, destaca la Brucelosis la cual ocasiona graves pérdidas por fallas reproductivas, así como por las restricciones en el comercio aplicadas tanto a los animales infectados como a los productos de éstos. Esta enfermedad es considerada la zoonosis bacteriana más importante.

III. OBJETIVO

El objetivo principal del Plan de Monitoreo Continuo es ubicar rebaños infectados, depurarlos y mantener la supervisión sobre los limpios. El objetivo de este documento es de establecer los procedimientos a seguir en este programa.

IV. TIPOS DE MONITOREO

4.1. Monitoreo o Vigilancia de predios lecheros, en centros de acopio y plantas lácteas.

La primera acción masiva de vigilancia es realizar la prueba de anillo en leche, o Elisa en leche, a todos los predios productores de leche que entregan su producto a plantas lecheras o a centros de acopio.

La meta es que todos los predios productores de leche se encuentren sometidas a la vigilancia y se realicen al menos cuatro pruebas anuales. Si los resultados son positivos se debe realizar una investigación para determinar si los animales del predio están infectados, la cual puede incluir la

repetición de la prueba en leche o la realización de una prueba diagnóstica por serología a todos los animales adultos de los predios que no estén produciendo leche (es decir, vacas secas y toros) involucrados.

4.1.1. Selección de centros de acopio y plantas lácteas e identificación de predios productores.

Todos los centros de acopio y plantas procesadoras de leche serán tomadas en cuenta para el plan de monitoreo continuo, la lista de predios y productores será sacada de la base de datos GRAN PAITITI del módulo RUNEP del SENASAG.

4.1.2. Recolección, identificación y envío de muestras de leche

En el campo: tan pronto se han ordenado todas las vacas del predio, revolver bien el contenido del tanque para que la dispersión de la nata sea homogénea y colecte 50 ml de leche, porque el exceso o bien la falta de grasa dificulta la interpretación de la prueba. En un frasco, que contiene 5 ml de formol al 1 %, colocar 50 ml de leche. Para tomar la leche se utiliza un cucharón metálico, el cual se ha de enjuagar cuidadosamente en agua después de utilizarlo. Las muestras bien identificadas como, por ejemplo, nombre del dueño del predio, dirección del predio, número de animales en producción que echaron la leche al tanque día y hora de la ordeña. Las muestras se transportarán refrigeradas en una nevera portátil con suficiente hielo hasta llegar al laboratorio evitando que se agiten vigorosamente.

Las muestras de leche deben tomarse después de limpiar y secar el pezón, evitando el uso de antisépticos. Debe desecharse el primer chorro de leche y llenar un tubo con el chorro o chorros siguientes. Para algunas pruebas, puede tomarse la muestra de leche de un tanque de almacenamiento. La leche para pruebas serológicas no se debe congelar, calentar o agitar de forma enérgica. Puede añadirse conservante a las muestras de leche recogidas para pruebas serológicas si se va a tardar en enviarlas al laboratorio. Si es preciso, se puede congelar la leche destinada a análisis bacteriológico.

4.1.3. Pruebas en la leche

Un medio eficaz de examinar a las vacas lecheras es recurrir a la leche de los tanques de recogida. De estos tanques se puede obtener leche de forma más barata y frecuente que las muestras de sangre, y habitualmente están disponibles en las centrales lecheras. Cuando se obtiene un resultado positivo, todas las vacas que aportan leche deben comprobarse individualmente analizando sus muestras de sangre. La prueba I-ELISA en leche es sensible y específica, y resulta particularmente útil para llevarla a cabo en grandes poblaciones de animales. La prueba de anillo en leche (MRT) es una alternativa adecuada cuando no se dispone de ELISA.

• I-ELISA en leche

A efectos de una armonización internacional, los laboratorios nacionales de referencia deben utilizar los tres Sueros Estándar de la OIE para ELISA con el fin de comprobar o calibrar el método particular de la prueba en cuestión. El I-ELISA debe estandarizarse de modo que el estándar positivo fuerte positivo de la OIE para ELISA diluido a 1/125 en suero negativo y diluido después a 1/10 en leche negativa se comporte repetidamente como positivo. Las muestras de leche completa se comprueban

generalmente con diluciones mucho más bajas que el suero, es decir, de 1/2 a 1/10 en tampón de dilución, y el resto de la prueba es similar a lo descrito para suero. La prueba C-ELISA no debe utilizarse con leche completa, pero puede usarse con muestras de suero.

• Prueba de anillo en leche

En los animales lactantes, la prueba de anillo en leche o MRT (sigla inglesa para 'milk ring test') puede utilizarse para el monitoreo de la brucelosis en rebaños. En poblaciones grandes (>100 vacas lactantes) la MRT puede ajustarse para compensar el factor de dilución de las muestras de leche entera. Las pruebas se ajustan de acuerdo al tamaño del rebaño:

- <150 animales - usar 1 ml de leche.
- 150–450 animales - usar 2 ml de leche.
- 451–700 animales - usar 3 ml de leche.

Pueden presentarse reacciones positivas falsas en animales vacunados hasta 4 meses antes de la prueba, en muestras de leche anormal (como el calostro) o en casos de mamitis. Por tanto, no se recomienda la utilización de esta prueba en granjas muy pequeñas, donde estos problemas presentan un mayor impacto en los resultados de la prueba.

4.1.4. Investigación de hatos con resultados positivos

Una vez que se han obtenidos los resultados del Laboratorio y se ha identificado a los hatos de origen de estos animales positivos, se hará el seguimiento (Rastreabilidad) a través de la Guía de Movimiento Animal (GMA) y a estos se los considera como sospechosos y se deberá realizar lo siguiente:

- a) un monitorio individual a todos los animales adultos para determinar la incidencia del hato;
- b) se aplicará la vacunación de acuerdo al Manual Operativo de Vacunación contra la Brucelosis;
- c) se elaborará el Plan Individual de Hato Infectado (PIHI).

4.2. Monitoreo o Vigilancia en plantas de Faena, Mataderos y Frigoríficos

Para el monitoreo o vigilancia de la brucelosis en plantas de faena, mataderos y frigoríficos son adecuadas para el análisis las pruebas tamiz con antígeno tamponado de Brucella, es decir, la prueba con rosa de bengala (RBT) y la prueba de aglutinación tamponada en placa (BPAT), así como ELISA y FPA. Las muestras con reacciones positivas deben analizarse utilizando una estrategia confirmativa adecuada.

El muestreo de brucelosis será a todo animal adulto (mayor de 24 meses) susceptible que ingresa a Mataderos sin un diagnóstico previo para la enfermedad.

La vigilancia en mataderos es un complemento en el diagnóstico de los animales que son comercializados y que no pasan previamente por ferias de ganado, sino que van directamente de un predio a los mataderos autorizados.

4.2.1. Selección de plantas frigoríficas o mataderos

Los mataderos o plantas frigoríficas, serán seleccionados para realizar el Monitoreo o vigilancia, de acuerdo a la ubicación y a al tipo de animales que recibe para la faena, se tratara de cubrir aquellos

mataderos donde llegan la mayor cantidad de animales hembras adultas de descarte y de las diferentes regiones para tener muestras representativas y poder identificar a la mayor cantidad de animales infectados o sospechosos.

4.2.2. Recolección, identificación y envío de muestras de sangre

Antes de tomar las muestras, debe tenerse en cuenta el fin para el que se solicitan. Dicho fin determinará el tipo y número de muestras necesarias para obtener resultados válidos. Cuando las muestras se tomen de animales vivos, se procurará evitar heridas o sufrimiento al animal o cualquier peligro para el operador y sus ayudantes.

Puede ser necesario el uso de sujeción mecánica, de anestésicos o de tranquilizantes. Siempre que se maneje material biológico de animales vivos o muertos, debe tenerse en cuenta el riesgo de contraer una enfermedad zoonótica y, por lo tanto, deben tomarse precauciones para evitar la infección humana.

Las muestras de sangre pueden tomarse para análisis hematológico, para cultivos y/o para el examen directo de bacterias, virus o protozoos, en cuyo caso es normal el uso de anticoagulantes, como el etiléndiamino tetraacético (EDTA) o la heparina. También se pueden tomar para pruebas serológicas, en cuyo caso se necesita una muestra coagulada. El plasma sanguíneo también se usa para algunos procedimientos. Las muestras de sangre se toman mediante venepuntura, de la forma más limpia posible. En la mayoría de los grandes mamíferos, se utiliza la vena yugular o una vena caudal, pero también se pueden utilizar venas braquiales y mamarias. En los cerdos también se utilizan venas de la vena Cava. En las aves, generalmente se utiliza una vena del ala (vena braquial).

Para las muestras de suero, la sangre debe dejarse a temperatura ambiente, pero protegida del calor o frío excesivos, durante 1 2 horas, hasta que el coágulo empiece a retraerse. Entonces, se recoge el coágulo con una varilla estéril, girándola, y se colocan los frascos en el frigorífico a 4°C.

Es fundamental que se identifiquen perfectamente las muestras individuales mediante métodos adecuados. Los instrumentos de marcado deben poder resistir las condiciones de uso; por ejemplo, la humedad o la congelación (utilícese un marcador de escritura indeleble). El lápiz tiene tendencia a borrarse en los contenedores, y las etiquetas, pegadas al plástico, se desprenden cuando se almacenan a -70°C. La información y el historial del caso siempre deberían acompañar a las muestras al laboratorio y deberían colocarse en un sobre de plástico, por fuera del embalaje de transporte. Tal como se resume en la sección siguiente sobre el transporte de muestras, esa información debe incluirse también dentro del embalaje de transporte.

Se sugiere que se sigan los siguientes puntos. Es aconsejable contactar con el laboratorio receptor para determinar si tiene un formulario de envío que quisiera que le remitieran con las muestras o si necesita cualquier otra información.

- i) Nombre y dirección del propietario/titular y ubicación geográfica (latitud y longitud, si se dispone de ambas) donde ocurrió la enfermedad, con los números de teléfono y fax.
- ii) Nombre, dirección postal, correo electrónico, números de teléfono y fax del remitente.
- iii) Enfermedades de cuya existencia se sospecha y pruebas solicitadas.
- iv) Fecha de toma de las muestras y del envío.
- v) Lista de las muestras remitidas y medios de transporte utilizados.

vi) Debería incluirse un historial completo para el laboratorio, que contemplara los siguientes elementos:

- a) Una lista y una descripción de los animales examinados y de los hallazgos del examen post mórtem.
- b) El tiempo que han permanecido en la granja los animales enfermos; si son recién llegados y de dónde procedían.
- c) La fecha de los primeros casos y de los posteriores, o de los animales muertos, con los números de referencia de los envíos anteriores.
- d) Una descripción de la extensión de la infección en la manada o la bandada.
- e) El número de animales muertos y de los que presenten signos clínicos, y edad, sexo y raza.
- f) Los signos clínicos y su duración, incluidos la temperatura de los animales enfermos, el estado de la boca, ojos y patas, y los datos de producción de leche y huevos.
- g) Tipo y normas para la cría, incluidos el tipo de alimento disponible, y posible contacto con venenos o plantas venenosas.
- h) Historial de viajes al extranjero por parte del propietario o de introducción de animales de otros países o regiones.
- i) Cualquier medicación administrada a los animales y cuándo se les administró.
- j) Cualquier vacuna administrada y cuándo se administró.
- k) Otras observaciones sobre la enfermedad, el manejo de los animales y otras condiciones presentes de la enfermedad.

Las muestras bien identificadas serán enviadas ya sea al laboratorio oficial y/o acreditado. . .

4.2.3. Pruebas de laboratorio

Las muestras recibidas en el laboratorio oficial y/o acreditado serán analizadas con una prueba tamiz aglutinación rápida en placa, las reaccionantes positivas serán enviadas a laboratorios oficiales para un diagnóstico confirmatorio con la prueba de Elisa Competitiva, Fijación de Complemento o Fluorescencia Polarizada (FPA)

- **Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos (ADN)**

La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) desarrollada recientemente supone un método adicional de detección e identificación de especies de *Brucella* (11, 14, 16, 69). Pese al alto grado de homología del ADN dentro del género *Brucella*, se han desarrollado varios métodos que permiten, hasta cierto punto, la diferenciación entre especies y algunos de sus biovariedades, como la PCR, el análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) y la hibridación tipo Southern (para una revisión, ver las referencias 11 y 53). Se ha desarrollado también una electroforesis en campo pulsante que permite la diferenciación entre varias especies de *Brucella* (40, 51). Mediante el empleo de la PCR puede biotipificarse *Brucella* y pueden diferenciarse las cepas vacunales, pero la PCR solo ha tenido una validación limitada para el diagnóstico primario.

4.2.4. Investigación de hatos con resultados positivos

Una vez que se han obtenidos los resultados de Laboratorios y se ha identificado a los hatos de origen de estos animales positivos, se hará el seguimiento (Rastreabilidad) a través de la Guía de Movimiento Animal (GMA) y a estos se los considera como hatos sospechosos e infectados y se deberá realizar lo siguiente:

- a) Un monitorio individual a todos los animales adultos para determinar la incidencia del hato
- b) Se aplicará la vacunación de acuerdo al Manual Operativo de Vacunación contra la Brucelosis
- c) Se elabora el Plan Individual de Hato Infectado (PIHI).

4.3. Monitoreo o Vigilancia Activa en Centros de Remates y Ferias de Ganaderas.

Antes de cualquier acto de comercialización, los bovinos aptos para la reproducción deben contar con un diagnóstico de Brucelosis bovina. Esta medida tiene por objeto ubicar los rebaños donde existe la enfermedad y además impedir que los animales infectados al ser vendidos ingresen a otros rebaños y diseminen la enfermedad.

El diagnóstico puede efectuarse en el predio de origen, y los animales saldrán acompañados de un resultado de laboratorio que tendrá una vigencia máxima de 60 días, pueden provenir de un predio certificado libre y en ese caso saldrán con un certificado que demuestre esa condición, o el diagnóstico se puede realizar directamente en el centro de remates o en las ferias al momento de ingreso de los animales.

Para este efecto todas los centros de remates y ferias ganaderas, deben disponer de una sala que cumpla con un mínimo de condiciones para la realización de las pruebas de diagnóstico de Rosa de Bengala o Aglutinación rápida en placa y contar con los servicios de un equipo de muestreo y diagnóstico acreditado que se haga cargo del procedimiento de individualización de los animales, su muestreo, diagnóstico y entrega de resultado, antes del remate, si los resultados son positivos, el animal solamente podrá moverse con destino a mataderos registrados y aprobados por el SENASAG. Si los resultados son negativos, estos animales deberán ser muestreados en el predio de destino y tener resultados negativos antes de ser enrolados con los demás animales del predio.

Posteriormente todas las muestras (es decir, positivas y negativas) deben ser enviadas a laboratorios oficiales donde se pueden repetir las pruebas para confirmar los resultados, de Elisa o fijación de complemento. El costo del diagnóstico es financiado por los dueños de los animales, si los resultados en laboratorios oficiales son positivos, se debe realizar una investigación para determinar si los animales del predio de origen están infectados, la cual puede incluir la prueba diagnóstica por serología a todos los animales adultos de los predios involucrados.

4.3.1. Selección de Centros de Remates y Ferias de ganado

4.3.2. Recolección, identificación y envío de muestras de sangre

Lo mismo que para las muestras tomadas en mataderos o friforíficos

4.3.3. Pruebas de laboratorio

Las muestras recibidas en el laboratorio oficial y/o acreditado serán analizadas con una prueba tamiz aglutinación rápida en placa (BPAT), las reaccionantes positivas serán enviadas a laboratorios oficiales para un diagnóstico confirmatorio con la prueba de Elisa Competitiva, Fijación de Complemento o Fluorescencia Polarizada (FPA)

Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos

La PCR desarrollada recientemente supone un método adicional de detección e identificación de especies de Brucella (11, 14, 16, 69). Pese al alto grado de homología del ADN dentro del género Brucella, se han desarrollado varios métodos que permiten, hasta cierto punto, la diferenciación entre especies y algunos de sus biovariedades, como la PCR, el análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) y la hibridación tipo Southern (para una revisión, ver las referencias 11 y 53). Se ha desarrollado también una electroforesis en campo pulsante que permite la diferenciación entre varias especies de Brucella (40, 51). Mediante el empleo de la PCR puede biotipificarse Brucella y pueden diferenciarse las cepas vacunales, pero la PCR solo ha tenido una validación limitada para el diagnóstico primario.

4.3.4. Investigación de hatos con resultados positivos

Una vez que se han obtenidos los resultados de Laboratorios y se ha identificado a los hatos de origen de los animales positivos, se hará el seguimiento (Rastreabilidad) a través de la Guía de Movimiento Animal (GMA) y a estos se los considera como hatos sospechosos e infectados y se deberá realizar lo siguiente:

- a) Un monitorio individual a todos los animales adultos para determinar la incidencia del hato;
- b) Se aplicará la vacunación de acuerdo al Manual Operativo de Vacunación contra la Brucelosis;
- c) Se elaborará el Plan Individual de Hato Infectado (PIHI).

V. CRONOGRAMA

VI. PRESUPUESTO Y FUENTE DE FINANCIAMIENTO