

Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la brucelosis bovina en hatos lecheros de Tijuana, Baja California

Seroprevalence and risk factors associated to bovine brucellosis of dairy herds at Tijuana, Baja California

José Francisco Moreno Rosales^a, Tomás Benjamín Rentería Evangelista^a, Roberto Searcy Bernal^b, Martín Francisco Montaña Gómez^a

RESUMEN

El objetivo fue determinar la seroprevalencia e identificar los factores de riesgo asociados a la brucelosis bovina en hatos lecheros ubicados en el municipio de Tijuana, Baja California. Se realizó de septiembre de 1999 a septiembre del 2000, con una población en estudio de 19,000 bovinos lecheros mayores de seis meses de edad. Para determinar la seroprevalencia se utilizaron las pruebas de tarjeta y fluorescencia polarizada. Se diseñó un cuestionario epidemiológico con el propósito de identificar los factores de riesgo asociados con la enfermedad. La seroprevalencia determinada por fluorescencia polarizada fue del 6.4 %. Las variables que presentaron asociación en el análisis univariable con la seropositividad a la brucelosis fueron: no remoción de desechos de abortos y partos, 2.40 razones de momios (RM), presencia de perros (RM = 2.65), ordeña de reactores antes o junto con animales sanos (RM= 6.74), no eliminación de reactores (RM= 6.19). En el análisis multivariado por regresión logística se observó que la variable ordeña fue significativa (RM ajustado = 4.65) y la edad, tomando como punto de corte dos años, fungió como variable de confusión (RM ajustado = 4.94). La prevalencia global de la brucelosis encontrada se puede considerar como moderada. La zonas productoras con la más alta prevalencia fueron la Gloria y el Murua. El estudio deja en claro cuales fueron los factores de riesgo que se asociaron con la enfermedad, lo cual posibilita un éxito mayor en la aplicación de un programa de control y erradicación.

PALABRAS CLAVE: Brucelosis, Bovinos, Factores de riesgo.

ABSTRACT

With the purpose of determining the prevalence of bovine brucellosis, as well as identifying some factors associated to this disease, a cross sectional study was carried out in dairy farms at Tijuana, Baja California, from September 1999 to September 2000. A total of 19,000 dairy cows aged 6 months or over, were studied. The tests used to detect this disease were the Card test and Fluorescence Polarization Assay (FPA). An epidemiological survey was applied in order to identify risk factors for brucellosis. Prevalence according to FPA was 6.4 %. When an univariate analysis was performed, the variables that showed a significant association with the disease were: not removing the remains of abortions and/or births (2.40 odds ratios (OR), presence of dogs in the facilities (OR= 2.65), milking positive reactors before or together with negative animals (OR= 6.74) and not getting rid of positive reactors (OR= 6.19). On the other hand, when a multivariate method was used (logistic regression), the only significant variables in the model were milking (adjusted OR= 4.65) and age, using a cutoff point of two years (OR adj. = 4.94). The global prevalence of brucellosis can be considered as moderate. The areas which showed higher prevalence were Gloria and Murua. Evidently, identification of risk factors associated to the presence of this disease, could be a very useful tool in a brucellosis control and eradication program.

KEY WORDS: Brucellosis, Bovine, Risk factors.

Recibido el 30 de octubre de 2001 y aceptado para su publicación el 7 de marzo de 2002.

a Laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis. Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Universidad Autónoma de Baja California. Ave. Álvaro Obregón y Julián Carrillo. Colonia Nueva, 21100 Mexicali Baja California. jfmro@yahoo.com.mx. Correspondencia y solicitud de separatas al primer autor.

b Departamento de Estadística. Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Universidad Autónoma de Baja California.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis está catalogada como una de las zoonosis más importantes por sus implicaciones económicas y de salud pública⁽¹⁾. En América Latina según estimaciones oficiales, las pérdidas económicas ascienden a más de 600 millones de dólares sólo en ganado bovino⁽²⁾. En México, la brucelosis bovina es uno de los principales problemas zoonosarios que aquejan a la ganadería, el cual no ha sido posible cuantificar plenamente ya que no existen datos confiables de su prevalencia en el ganado bovino⁽³⁾. La brucelosis está ampliamente distribuida, siendo el suroeste la zona de mayor incidencia seguida del centro y en menor proporción la zona norte del país⁽⁴⁾. En la cuenca lechera del municipio de Tijuana Baja California existen 54 establos lecheros, los cuales cuentan con alrededor de 19,000 bovinos. En el año de 1998, el programa para el control de la brucelosis bovina se reducía solamente a la aplicación de la vacuna elaborada con la cepa 19 de *Brucella abortus*, la cual tenía deficiencias en su calendario de aplicación. Por otra parte las pruebas serológicas utilizadas para la detección de la brucelosis en el ganado se reducían a tarjeta y rivanol, sin que mediara una prueba confirmatoria. Un estudio de seroprevalencia (no publicado), elaborado por el Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias en los inicios de 1998, indicó que la prevalencia de anticuerpos contra brucela era alrededor del 8.0 %. Por todo lo anterior, el objetivo del estudio fue determinar la seroprevalencia e identificar los factores de riesgo asociados a la brucelosis bovina en hatos lecheros de Tijuana, Baja California.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio transversal donde la población en estudio estuvo constituida por 19,000 bovinos lecheros de la raza Holstein mayores de 6 meses de edad. El tamaño de la muestra se determinó utilizando la fórmula descrita por Daniel⁽⁵⁾, considerando un valor de prevalencia de referencia del 3.0 % con una precisión del 1.1 y un nivel de confianza del 95 %; al tamaño de la muestra original se le agregó un 2.3 % dando un total de 902 bovinos a muestrear. Se utilizó un muestreo

INTRODUCTION

Brucellosis is listed as one of the most important zoonosis, due to its effect on the economy and on public health⁽¹⁾. In Latin America, in accordance with official estimates, economic losses owing to this disease amount for more than 600 million dollars per year, for bovines only. In Mexico, bovine brucellosis is one of the main livestock related health problems, whose incidence cannot be fully measured because of a lack of reliable data regarding its prevalence⁽³⁾. Brucellosis is broadly distributed across the whole country, but the southeast is the most affected region, followed by the center and to a lesser extent by the north⁽⁴⁾. In the Tijuana, Baja California milk basin, there are 54 dairy farms comprising some 19,000 animals. In 1998, the program for brucellosis control consisted only of vaccination with *Brucella abortus* strain 19, which not in all cases was applied at the adequate age. On the other hand, serological tests used for brucellosis detection in cattle were only Card and Rivanol, and no confirmation assays were used. A seroprevalence study (unpublished) drawn up by the Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias at the beginning of 1998, showed that prevalence of brucella antibodies was approximately 8.0 %. Based on this, the objective of the present study was to determine seroprevalence and to identify risk factors associated to bovine brucellosis in dairy herds in Tijuana, Baja California.

MATERIALS AND METHODS

A cross sectional study on a 19,000 dairy cattle population of the Holstein breed of over six months of age was carried out. The sample size was determined through Daniel's formula⁽⁵⁾, taking into account a 3.0 % prevalence reference value, 1.1 precision and a 95 % confidence level. A 2.3 % was added to the original model so a total of 902 animals were sampled. A simple random sampling with proportional distribution to the herd size was used. An epidemiological survey was applied to each of the 54 participating dairy farms to identify risk factors associated to brucellosis. This survey allowed to identify the following risk factors: Presence of other animal species in the farm. Origin

aleatorio simple con distribución proporcional al tamaño del hato. Se aplicó un cuestionario epidemiológico a cada uno de los 54 establos participantes, con el propósito de identificar los factores de riesgo asociados a la enfermedad. En el cuestionario se determinaron los siguientes factores de riesgo: a) La presencia de otras especies animales dentro de la explotación; b) El origen de sus reemplazos, si fueron propios (locales) o procedían de otros establos (externos); c) El manejo de los animales infectados en la ordeña: si la ordeña de estos animales se realiza al final, al inicio o juntos; d) Si los animales detectados como positivos se eliminan o se separan del resto del hato; e) La edad del animal; f) El manejo de los desechos de abortos y partos: si son o no removidos.

Para detectar anticuerpos contra brucela en las muestras se utilizó la prueba de tarjeta según lo descrito en el manual INDRE/SAGAR⁽⁶⁾. Para la realización de la técnica de fluorescencia polarizada se utilizó la descrita por Nielsen *et al.*⁽⁷⁾.

Se realizó análisis univariado por medio de la prueba de Ji cuadrada y se construyeron intervalos de confianza al 95 % de las Razones de Momios (RM) para analizar el efecto aislado de cada una de las variables y su magnitud de asociación con el problema, utilizando el programa Epi info ver 6.04⁽⁸⁾. Además, se utilizó el programa estadístico BMDP⁽⁹⁾, por medio del cual se realizó un análisis multivariado de regresión logística para determinar las razones de momios ajustadas para los principales factores de riesgo.

RESULTADOS

Con la prueba de tarjeta resultaron 70 animales seropositivos, que corresponde a una prevalencia global del 7.7 %; a estas mismas muestras se les sometió a la prueba de fluorescencia polarizada obteniéndose una prevalencia global del 6.4 % (Cuadro 1). Del total de hatos muestreados en el estudio, el 41.5 % presentaron al menos un animal positivo a brucelosis.

El Cuadro 2 muestra los resultados de los factores de riesgo asociados a la presentación de la enfer-

of replacements (if bred in the same farm or in another farm). Management of reactors during milking: at the beginning, the end or together with the other dairy cows. If reactors were isolated or eliminated from the herd. Age. Management of birth and abortion remains.

For antibody detection the card test was used in accordance with the instructions laid in the INDRE/SAGAR manual⁽⁶⁾. The FPA (Fluorescence Prevalence Assay) was applied in accordance with Nielsen *et al.*⁽⁷⁾.

A univariate analysis was applied through the Chi squared test and 95 % confidence intervals of the Odds Ratios (OR) to analyze the effect of each variable and its association magnitude, by means of the Epi info v 6.04 program⁽⁸⁾. Besides that, BMDP statistical program was used for a multivariable logistical regression to determine probability rates adjusted for the main risk factors.

RESULTS

In accordance with the Card test, 70 animals showed positive, equivalent to a 7.7 % global prevalence. These samples were also tested through FPA, and a 6.4 % global prevalence was obtained (Table 1). Of the herds studied, 41.5 % showed at least one animal positive to brucellosis.

Table 2 shows the results related to risk factors associated to the presence of this disease, in which diverse variables such as milking sequence,

Cuadro 1. Prevalencias obtenidas de acuerdo a las pruebas serológicas realizadas en el estudio

Table 1. Prevalence obtained by means of the serological tests

Test	P/n	Prevalence (%)	Interval (95 %)
Card	70/902	7.7	6.13 – 9.75
PF	58/902	6.4	4.95 – 8.28

P/n= Positive cases related to total random samples

PF= Polarized fluorescence

Cuadro 2. Prueba de asociación y razón de momios no ajustados y ajustados con intervalo de confianza del 95 %

Table 2. Association test and non adjusted and adjusted 95 % confidence intervals of the odds ratios

	Chi ² de Yates	P	Non adjusted OR	CI	Adjusted OR	CI
Milking:						
Mixed	48.75	(0.000)	6.74	(3.61-12.53)	4.65	(1.60-13.52)
Segregated			1		1	
Age						
≤ 2 years	1.69	(0.193)	3.03	(0.67-1.74)	4.94	(1.34-8.12)
≥ 2 years			1		1	
Presence of dogs:						
Yes	10.46	(0.001)	2.65	(1.43-4.96)	1.69	(0.86-3.32)
No			1		1	
Seropositive:						
Non eliminated	36.29	(0.000)	6.19	(3.12-12.20)	2.08	(0.51-8.45)
Eliminated			1		1	
Abortion remains:						
Not removed	9.34	(0.002)	2.40	(1.34-4.29)	0.606	(0.25-1.45)
Removed			1		1	
Replacement source:						
Local	1.98	(0.158)	1.53	(0.86-2.71)	1.53	(0.87-0.69)
Foreign			1		1	

OR= odds ratios; CI= Confidence intervals.

medad, donde las variables fuente (compra de los reemplazos), presencia de perros, ordeña (de reactores antes o juntos con sanos), manejo (si son eliminados los desechos de partos o abortos), seropositivos (no eliminación de reactores del ható), resultaron significativas en el análisis univariable ($P < 0.05$). Asimismo, se observó que los factores de riesgo edad y fuente de animales no fueron significativos ($P > 0.05$).

En el modelo de regresión logística la variable ordeña fue significativa, RM ajustado de 4.65, la cual fue menor al del análisis univariable, debido al efecto del factor edad, que cumple con los criterios de variable de confusión sobre ésta. El factor edad aunque en el análisis univariable no fue estadísticamente significativo, en el multivariable por regresión logística este factor presentó una RM ajustada de 4.94 ($P < 0.05$).

El Cuadro 3 muestra la distribución de la brucelosis

management of birth and abortion remains, non-elimination of reactors and presence of dogs were significant ($P < 0.05$) while animal's age and replacement source were non significant variables ($P > 0.05$) in accordance with an univariate analysis.

The logistic regression model showed milking sequence as a significant variable (adjusted OR= 4.65, less than in the univariate analysis), owing to the age factor, which complies as a confusion factor. The age factor, although non significant in the univariate analysis, showed a 4.94 OR ($P < 0.05$) in the multivariate logistical regression model.

Table 3 shows how brucellosis is distributed in diverse milk production areas of the Tijuana basin. Prevalence was higher in the Murua and Gloria areas with a 13.4 % and a 19.4 % rate respectively. Tecate, Cañón del Sáinz and Valle Redondo are brucellosis free areas.

en las diferentes zonas productoras de leche de Tijuana. Se encontró que las prevalencias más altas correspondieron a la Gloria y el Murua con el 19.3 y 13,4 % respectivamente. Tecate, Cañón del Sainz y Valle Redondo se encontraron libres de la enfermedad.

DISCUSIÓN

La prevalencia obtenida por la prueba de fluorescencia polarizada de 6.4 %, muestra que ésta es más baja que la observada en otro trabajo⁽¹⁰⁾, que fue de 9.2 %. Las diferencias encontradas en el número de sueros positivos a tarjeta y positivos a fluorescencia polarizada se deben esencialmente a que esta última cuenta con una sensibilidad del 98.5 % y una especificidad del 100 %⁽⁴⁾. Una de las causas de aparición de falsos positivos en la prueba de tarjeta, es debido a títulos altos de residuos vacunales⁽¹¹⁾. Es necesario hacer notar que a la totalidad de los hatos se les había vacunado meses anteriores con la cepa 19 de *Brucella abortus*. Los factores de riesgo asociados estadísticamente significativos con la enfermedad determinados en el análisis univariable, concuerdan con los mencionados por Salman y Meyer⁽¹²⁾.

El resultado que sobre los factores de riesgo se obtuvieron en el análisis multivariado difiere del anterior, debido al efecto que todas las variables tienen dentro del modelo sobre los coeficientes que forman la base de la relación de momios ajustados. De esta manera, abordando el problema en forma integral, únicamente ordeña y edad, entran al modelo. Es importante mencionar que los animales menores de 2 años mostraron una prevalencia mayor de brucelosis, pudiéndose deber este problema a la utilización de calostro proveniente de madres infectadas⁽¹¹⁾, o a una infección congénita que ocurre en becerros nacidos de madres infectadas⁽¹³⁾.

Aún cuando el tamaño de muestra fue calculado con el fin de determinar la prevalencia de brucelosis, una vez que se contó con las proporciones de animales afectados para los grupos expuesto y no expuesto a los factores de riesgo considerados, se pudo recalcular el tamaño de muestra mediante la fórmula sugerida por Fleiss⁽¹⁴⁾, resultando adecuado

DISCUSSION

The 6.4 % prevalence rate obtained in this study was lower than the 9.2 % found in another survey⁽¹⁰⁾. Differences found between results of the FPA and Card tests are due to differences in sensitivity and specificity, which is 98.5 % and 100 % for FPA⁽⁴⁾. One reason for the surfacing of false positive reactors in the Card test is due to high titles of vaccine residue⁽¹¹⁾. It is necessary to point out that all the herds were vaccinated in previous months with *Brucella abortus* strain 19. Significant risk factors determined through univariate analysis concur with those already mentioned by Salman and Meyer⁽¹²⁾.

Results on risk factors obtained through the multivariate analysis differ from above mentioned study, because of the effect that all the variables have on their regression coefficients which are the base of the adjusted odds ratios. Thus, when this problem is approached holistically, only milking sequence and age constitute significant variables. It is worth mentioning that animals under two years of age showed a higher brucellosis prevalence, and this may be due to the use of

Cuadro 3. Distribución de las prevalencias de brucelosis de acuerdo a la ubicación de los establos lecheros

Table 3. Brucellosis prevalence distribution in accordance to dairy herd location

Location	No of sampled animals	PF positive	Prevalence (%)
La Gloria	57	11	19.3
Murua	119	16	13.4
El Descanso	50	4	8.0
El Florido	357	20	5.6
El Carrizo	167	6	3.6
Valle de las Palmas	42	1	2.3
Cañón del Sainz	9	0	0.0
Tecate	44	0	0.0
Valle Redondo	57	0	0.0

PF= Polarized fluorescence

para la determinación de todas las variables independientes, con excepción del factor de riesgo fuente de reemplazos, en cuyo caso, el poder de la prueba fue de alrededor del 30 %.

Se observó que en las zonas de la Gloria y el Murua la prevalencia fue muy alta, debido a que el intercambio de animales se da muy fácil sin que medie un certificado que indique la presencia o ausencia de la brucelosis. Por otro lado, debido a la alta prevalencia de la enfermedad no es posible establecer un programa de eliminación por el alto costo económico que esto implicaría para los propietarios. Para que las zonas lecheras con alta prevalencia logren reducir la brucelosis es necesario desarrollar un plan que incluya: muestreos serológicos cada tres meses, vacunación, manejo de reemplazos, manejo de crianza y manejo del hato infectado.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

La prevalencia global de la brucelosis en los hatos lecheros participantes en el estudio se puede considerar como moderada, sin embargo la prevalencia a nivel hato es mayor. Es claro que el conocimiento de los factores de riesgo asociados con la enfermedad nos proporcionará elementos más firmes para la implementación y continuación del programa de control y erradicación que llevan a cabo los productores de leche, y en un futuro la reducción de la prevalencia a niveles que permitan entrar a la fase de erradicación. Por otra parte la presencia de la brucelosis bovina limita la comercialización de la leche y sus derivados, además de provocar pérdidas por baja en la producción de leche, abortos y desecho de animales. La venta de leche y quesos no pasteurizados por parte de los productores constituye uno de los problemas más importantes de salud pública, ya que el 20 % de la producción láctea total se comercializa de esa forma, favoreciendo la transmisión de la brucelosis al humano.

LITERATURA CITADA

1. López-Merino A, Migranas-Ortiz R, Perez-Miravete A, Magos

colostrum coming from infected mothers⁽¹¹⁾, or because of a congenital infection⁽¹³⁾ in calves born from infected mothers.

Even when the sample size was calculated to determine brucellosis prevalence, once information on the percentage of affected animals was obtained, for exposed and non exposed groups to the risk factors under consideration, it was possible to recalculate the sample size, with Fleiss' formula⁽¹⁴⁾, being adequate to determine the association of all independent variables, except for that of the replacement source, in whose case, the test's power was around 30 %.

In the Murua and La Gloria areas, prevalence was very high, because animals can be exchanged easily without any brucellosis free certificate. On the other hand, owing to the high prevalence of this disease it is not possible to enforce an eradication program because of its high cost. If these high prevalence areas are to decrease the incidence of this disease, it ought to be necessary to develop a plan which should include quarterly serological samplings, vaccination, replacement, breeding and calf raising and infected herd management.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Global prevalence of brucellosis in participating milk herds can be considered as moderate, however prevalence at herd level is higher. Knowledge of risk factors associated to this disease should provide us with more elements to implement and develop on a program for brucellosis control and eradication to be carried out by producers. In a future date, this program should be able to reduce the prevalence of this disease to levels which would allow to put into practice an eradication phase. On the other hand, the presence of brucellosis limits marketing of milk and its byproducts, besides producing losses due to abortions, decrease of milk production and loss of productive animals. Sale of non pasteurized milk and cheese constitute one of the most important public health problems, because nearly 20 % of the total milk production is marketed in this manner, thus favoring brucellosis transmission to human beings.

SEROPREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA BRUCELOSIS

- C, Salvatierra-Izaba B, Tapia-Coyer R, *et al.* Seroepidemiología de la brucelosis en México. *Salud Pública Méx* 1992;34(2):230-240.
- Ocadiz GJ. Epidemiología en animales domésticos: Control de enfermedades. 2ª ed. México: Editorial Trillas; 1990.
 - SAGAR. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Manual de actualización técnica para la aprobación del Médico Veterinario como unidades de verificación en tuberculosis y brucelosis bovina. México. 1996.
 - Cortéz LM, Díaz E, Vázquez J, Ontiveros L. Comparación de tres cepas de *Brucella melitensis* para la obtención de antígeno polisacárido B utilizado en el diagnóstico de la brucelosis bovina. *Téc Pecu Méx* 1987;25(2):155-162.
 - Daniel WW. Biostatistics: A foundation for analysis in the health sciences. 5th ed. New York, USA: John Wiley & Sons; 1987.
 - INDRE/SAGAR: Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Manual de procedimientos de laboratorio. Brucelosis 19. México, 1996.
 - Nielsen K, Gall D, Jolley M, Leishman G, Balsevicius S, Smith P, *et al.* A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody of brucella abortus. *J Immunol Methods* 1996;(195):161-168.
 - Epi info 6. A word processing database and statistics program for public health. (version 6.04d). Center For Disease Control & Prevention, USA. 2001.
 - Dixon J. BMDP: Statistical software manual. USA: UCLA Press; 1993.
 - Salman MD, Hernández JA, Braun I. A seroepidemiological study of five bovine diseases in dairy farms of the coastal region of Baja California, Mexico. *Prev Vet Med* 1990;(9):143-153.
 - Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.* London, UK: Saunders; 2000.
 - Salman MD, Meyer ME. Epidemiology of bovine brucellosis in the Mexicali Valley, Mexico: Literature review of disease-associated factors. *Am J Vet Res* 1984;45(8):1557-1560.
 - Plommet M, Fensterbank R, Renoux G, *et al.* Brucellose bovine experimentale. XII Persistence a l' age adulte de l'infection congenitale. *Ann Rech Vet* 1973;(4):419-435.
 - Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions.* 2nd ed. New York, USA: John Wiley; 1981.

