

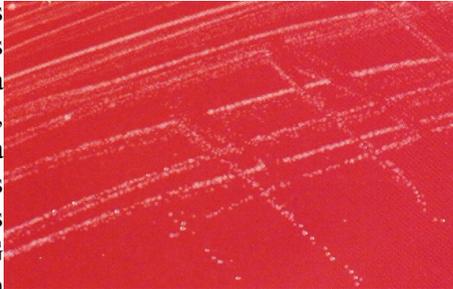
PRUEBAS DIAGNOSTICAS EN BRUCELOSIS BOVINA.

M.V. Miguel Acosta Andrade.¹
M.V. M.C. Martín Ortiz Morera²

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de distribución mundial que sigue siendo una de las principales zoonosis por su repercusión en la economía pecuaria, debido a la presencia de abortos, partos prematuros, crías débiles, infertilidad temporal, y merma en la producción de leche. En América latina, esta considerada como una zoonosis importante por su morbilidad y prevalencia sobre todo en ganado lechero.

Desde el punto de vista de salud pública y bioseguridad debemos señalar que los casos humanos en nuestro medio se presentan con cierta frecuencia, sobretudo en ondas cíclicas por que el hombre no es reservorio natural del agente etiológico, sino mas bien es un huésped accidental del género *Brucella* siendo la de mayor patogenicidad la *Brucella melitensis*.

El diagnóstico definitivo de la enfermedad es mediante el aislamiento bacteriológico del germen por medios de cultivo y procedimientos especiales; así mismo como toda infección durante el desarrollo de la enfermedad se forman anticuerpos cuya presencia son detectables mediante pruebas serológicas invitro. Sabemos que los anticuerpos transeúntes están ligados a fracciones séricas que son las inmunoglobulinas, de ellas la IgM llamadas también macroglobulina 19S y/o madres (que son las más pesadas de las globulinas del grupo gamma) que están presentes en los periodos iniciales de la infección y las IgG o microglobulinas del grupo 7S las que aparecen posteriormente, otras inmunoglobulinas del tipo A y D, siguen siendo estudiadas en Brucelosis, Sin embargo merecen atención las inmunoglobulinas del grupo 12S que se han encontrado en leche de vacas infectadas



El conocimiento sobre la independencia de la producción de anticuerpos como son: las aglutininas, fijadores del complemento, precipitinas, bloqueadores incompletos neutralizantes, etc. así como las propiedades físicas de las diferentes inmunoglobulinas son de importancia vital para el diagnóstico de la infección brucelar.

CRITERIOS PARA ESTABLECER EL DIAGNOSTICO

Los procedimientos y métodos utilizados para establecer el diagnóstico de la brucelosis varían de acuerdo a los objetivos, metas, y disponibilidad de recursos humanos y económicos.

¹ Consultor Nacional y ex profesor principal a dedicación exclusiva Laboratorio de Microbiología y Patología Clínica, Facultad de Medicina Veterinaria - U.N.M.S.M. Lima - Perú.

² Profesional responsable del Laboratorio de Bacteriología – Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal - SENASA Perú

No existe ninguna prueba serológica que aplicada aisladamente pueda descubrir la totalidad de casos en brucelosis, por eso es imprescindible que los programas de control y erradicación se basen en el criterio de diagnóstico de hato. Cuando se aplican varios criterios en el diagnóstico individual se obtienen mejores resultados ya que su interpretación debe hacerse en conjunto. Actualmente se dispone de procedimientos serológicos con valor diagnóstico como son: prueba rápida de placa, prueba de tubo, 2 mercaptoetanol, rosa de bengala y/o tarjeta y fijación del complemento, consideradas fundamentales en los programas de brucelosis animal.

La prueba del anillo en leche se aplica exitosamente en la vigilancia epidemiológica de áreas controladas y libres de infección, así como para descubrir hatos o establos presuntamente infectados y para la tasa de infección de una cuenca lechera.

En los animales de carne y los porcinos se recomienda tomar las muestras de sangre para el examen serológico en las ferias, camales y remates utilizando por su sencillez la prueba de rosa de bengala - card test para los bovinos y las pruebas de precipitación por el rivanol en suero calentado a 56°C y 2 mercaptoetanol para porcinos

PRUEBAS USADAS EN EL DIAGNOSTICO

Prueba de Aglutinación lenta o en Tubo- Es la más antigua para el diagnóstico serológico de la Brucelosis (Wright y Smith, 1897) y sigue siendo una de las mejores siempre que se realice en condiciones normalizadas. El antígeno debe ser elaborado con cepas en fase lisa que son las que tienen las características aglutinogénicas estables. Deberá contener 0.045 % de células suspendidas en solución salina fisiológica fenicada al 0.5 %, cualquier variación o modificación en el contenido celular del antígeno influye considerablemente en la sensibilidad del mismo.

Los antígenos muy diluidos son hipersensibles y dan generalmente falsos positivos, mientras que un antígeno de alto contenido celular produce el efecto contrario

En ciertas ocasiones y por necesidad y dentro de ciertos límites se pueden usar antígenos más o menos sensibles con respecto al estándar siempre que los resultados se expresen en Unidades Internacionales (UI). Para ello se requiere utilizar el suero Patrón Internacional (PISAb) distribuido en ampollas de 1 ml conteniendo 1.000 UI de aglutinación en dilución con el antígeno estándar (al 0.045%) .

En caso que el antígeno empleado de un título de 1/500 con el suero internacional y que por otro lado un suero problema reaccione a título de 1/100 con dicho antígeno se interpreta de la manera siguiente:

$$\frac{1000 \times 100}{500} = 200 \text{ U.I. x ml}$$

Lo que indica que el antígeno está trabajando al 50 % de su capacidad con respecto al suero patrón PISAb de manera que el título del suero problema con el antígeno trabajado corresponde a un 1/200 UI

Un título de 1/100 UI es considerado significativo de infección en animales vacunados y de 1/200 UI en animales vacunados a temprana edad. En otras

especies animales la presencia de 1/50 UI esta relacionada estrechamente con la infección y es titulo de positivo para él diagnostico de rutina.

El grado de aglutinación en cada una de las distintas diluciones puede clasificarse como: **Completa (+)** formación de grumos evidentes. **Incompleta (1)** presencia de grumos finos. **Negativo (-)** ausencia de grumos mezcla suero/antígeno homogénea.

Prueba de Aglutinación en placa, también llamada rápida o de Huddleson quien en 1920 preparó un antígeno concentrado para usarlos en pruebas de aglutinación en placas, tan es así que el método se ha extendido en todo el mundo, aunque hay algunos países de América que ya vienen discontinuando su uso porque sus resultados no son tan constantes como la prueba de tubo, debido a pequeños errores manuales en la ejecución rutinaria de la prueba.

Prueba del Anillo en Leche PAL-(Feishauer1920).- Aunque se puede emplear en distintas especies de animales es de particular utilidad para detectar rebaños bovinos infectados por ser una prueba presuntiva, se ha diseñado para descubrir la presencia de aglutininas en la leche. Este

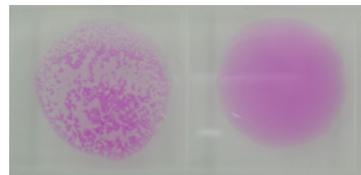


antígeno tiene una concentración celular de 4% y un pH de 4,0, coloreado con hematoxilina o en su defecto pueden usarse sales de Tetrazolio, el antígeno posee una gran sensibilidad por su baja concentración celular y no tiene capacidad amortiguadora. El complejo antígeno/anticuerpo se adhiere a la superficie de los glóbulos de grasa y ascienden con ellos a la superficie formando una reacción. Si la muestra no tiene aglutininas no se colorea, formando un anillo de color blanco. Si por el contrario la muestra presenta un anillo de color azul, se considera positiva. La prueba permite un control más rápido, su costo es considerablemente menor, y su exactitud radica en mezclas de leches de varios rebaños (tanques, cisternas, porongos y en cierto casos animales individuales), la exactitud de la prueba radica en la mezcla de varias vacas cuando menos de 20 - 25 animales. El porcentaje de grasa de la muestra de leche influye sobre los resultados de la prueba de anillo en leche, porque la formación del anillo de crema dependerá del porcentaje de grasa de la leche.



La prueba de vigilancia mediante la PAL, se puede usar para la recertificación de hatos libres y su eficacia depende de la frecuencia con se realicen. Una única prueba indica la infección hasta el 60-70 % de sensibilidad y con una segunda prueba a los 90 días de intervalo, muestra un 95 de efectividad para detectar hatos infectados. Se tiene fidedigna información que con tres muestreos consecutivos de PAL durante el año dan resultados negativos a la prueba serológica.

Prueba de Tarjeta y/o Rosa de Bengala (Pietz,1967, Nioleyyi, 1966, Ray y Carley 1968, Morgan y Col,1968). También llamada del antígeno tamponado por su capacidad de mantener estable un pH determinado; en consecuencia es un procedimiento cualitativo mas no cuantitativo de aglutinación rápida, de aglutinación macroscópica que se realiza en una sola dilución y que detecta principalmente inmunoglobulina del tipo G1

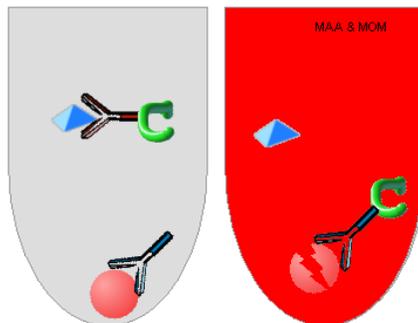


igualmente reacciona ante las IgM pero no en su totalidad como tampoco lo hace con las IgG2, el colorante empleado es el Rosa de Bengala a un pH 3.65 con un volumen celular del orden de 8 %. El tiene una estabilidad de conservación 4°C; pero puede deteriorarse si se expone repetidamente a cambios de temperatura ambientales. Es muy importante que el antígeno reúna las cualidades necesarias para la realización de la prueba de lo contrario los resultados pueden ser falseados. Actualmente hay algunos países de América que ya vienen discontinuando su uso por darle prioridad a la prueba del antígeno bufferado en placa.

AL PRINCIPIO ESTA PRUEBA FUE IDEADA PARA ANIMALES DE CARNE Y PORCINOS. POSTERIORMENTE SE MODIFICO PARA HACERLA EXTENSIVA A GANADO BOVINO, ES UNA PRUEBA QUE SE USA COMO TAMIZ O DESCARTE IGUALMENTE COMO COMPLEMENTARIA O ALTERNATIVA DE OTRAS PRUEBAS BASICAS

Prueba de Fijación del Complemento.- Esta técnica fue aplicada al diagnóstico de la brucelosis tanto humana como animal en tiempos remotos, sin embargo recientemente se ha extendido su uso en especial para diferenciar las reacciones dudosas. En la actualidad para detectar animales infectados se considera esta prueba más sensible que las otras pruebas de aglutinación por que dan menos reacciones inespecíficas y por las introducciones que se vienen dando en modificar la técnica en general, siendo una de las

- ▶ Antígeno
- ▶ Anticuerpo Br.
- ▶ Complemento
- ▶ Sistema Hemolítico
- Eritrocito
- ▶ Hemolisina



modificaciones de Sapuldin y Robinsón (1951) que es una modificación de la técnica de Colmes basada en la fijación al frío y 100% de hemólisis. Así como el uso de técnicas cuantitativas basadas en el 50% de hemólisis que se están extendiendo cada día más. Se ha demostrado que la correlación entre la infección y la reacción positiva es más

estrecha y coincidente en esta prueba que en la seroaglutinación. Además que los anticuerpos heteroespecíficos producen menos problemas que en la aglutinación.

En el hombre se emplea tanto para el diagnóstico de la brucelosis aguda como para la crónica y el método de elección es la fijación en frío a 4°C. Las variables que tienen mayor influencia en la exactitud y sensibilidad de la prueba es el antígeno y binomio tiempo/temperatura de fijación del complejo antígeno/anticuerpo/complemento en la primera fase 1 de la reacción.

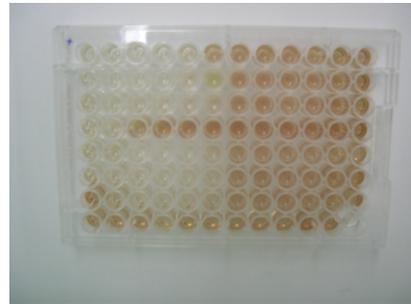
Se ha demostrado que las cabras vacunadas o infectadas experimentalmente con Brucella melitensis Rev 1, la actividad fijadora del complemento esta restringida a la fracción IgG.

2 Mercaptoetanol (M Anderson Col. 1964).- Es una prueba selectiva que detecta las IgG, se basa en que los anticuerpos IgM con configuración de pentámero se degradan en 5 unidades semejantes por la reducción de los enlaces disulfuros debido a la acción de ciertos compuestos que contienen el radical tilo tales como el 2 mercaptoetanol, cisteína y el ditiotreitól, estas unidades contienen poseen constantes de sedimentación 7S y peso molecular del orden de 180,000 conservando sus características de antigenicidad pero

pierden la actividad de anticuerpo plurivalente y se comportan como anticuerpos univalentes aún cuando las subunidades están integradas por dos cadenas pesadas y dos livianas que al combinarse con el antígeno no originan complejos completamente grandes como para precipitar o aglutinar. La prueba se usa cómo evidencia presuntiva de la presencia de anticuerpos de IgG. La prueba del 2 Mercaptoetanol debe usarse siempre de manera paralela a la prueba del tubo. La concentración del antígeno es doble que la del tubo para compensar la dilución que resulta de agregar al suero una solución del 2 mercaptoetanol por que el antígeno no debe utilizarse fenol. El mercaptoetanol se prepara en frascos color caramelo y debe guardarse como máximo por espacio de 7 días a refrigeración, porque pierde su capacidad reductora por oxidación.

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).- Es una prueba rápida por la que un anticuerpo o antígeno se une a una enzima como medio para detectar una relación entre el anticuerpo y el antígeno.

Es una prueba que desde el punto de vista de sensibilidad, ha demostrado que durante la fase aguda de la infección existe una respuesta de anticuerpos clásicos: aumento de IgM e IgG, que a lo largo del proceso el título de IgM va descendiendo. Sin embargo algunos autores indican todo lo contrario, los anticuerpos IgM no vuelven a elevarse de forma significativa en los casos de una nueva recaída o reinfección, la IgM puede detectarse con títulos decrecientes durante unos 8 a 10 meses, en los casos que evolucionan a la curación, la IgG específica puede ser detectada con títulos que van disminuyendo progresivamente durante unos 30 meses y solo se elevan en los casos de reinfección o recaída. El problema de la utilización de esta prueba surge de la poca experiencia clínica que existe para correlacionar los resultados con la evolución clínica. Algunos autores han planteado desde ya la realización de ELISA total, es decir IgM+IgG+IgA como prueba diagnóstica única de gran sensibilidad para la búsqueda de anticuerpos.



Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).- Actualmente se viene trabajando con dedicación y esmero en esta prueba, ya que tiene una sensibilidad muy alta en los resultados evaluativos. La prueba permite la detección de secuencias específicas del ácido desoxirribonucleico (ADN) del agente causal del proceso infeccioso detectando la presencia de la bacteria en el huésped, y no la presencia y/o ausencia de anticuerpos en suero de los animales sospechosos.

Detección de productos bacterianos: ácidos nucleicos.- El desarrollo de las técnicas de amplificación genómica y su aplicación al diagnóstico e identificación microbiana ha despertado un gran interés entre los diferentes grupos que se dedican al estudio e investigación de la brucelosis. Estas técnicas se basan en la reproducción «in vitro» del fenómeno de replicación del ADN bacteriano (técnicas PCR o polymerase chain reaction y sus derivadas). Para ello se selecciona el segmento de ADN a amplificar cuya secuencia de nucleótidos (normalmente entre 200 y 800) reúna las características de especificidad (la secuencia sólo se encuentra en el ADN del género o especie microbiana objeto de estudio), ámbito (la secuencia se encuentra en todos los individuos de ese género o especie) y estabilidad (la región seleccionada ha de ser muy estable y sufrir pocas mutaciones). Se añaden dos secuencias de pocos nucleótidos (denominadas primers o iniciadores o cebadores) que son complementarias a las secuencias de

nucleótidos de los extremos de la región de ADN seleccionada para su amplificación. Por último, se añade una ADN - polimerasa (taq polimerasa) y los cuatro nucleótidos, y siguiendo unas condiciones cíclicas muy estrictas de tiempo y temperatura en un termociclador, se consigue obtener millones de copias de ADN idénticos a los de la región acotada. Una vez obtenidas estas copias (amplificadas), se procede a su identificación por diferentes métodos, de los que el más utilizado es la hibridación con sondas ADN específicas para la región acotada. En muchas circunstancias se utiliza como plantilla objeto de la amplificación una región de Aro ribosómico, en cuyo caso es necesario realizar previamente una conversión del ARN a ADN complementario (ADNc) por acción de una transcriptasa reversa

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta A. Miguel. Importancia de las pruebas bacteriológicas y serológicas en el diagnóstico de la brucelosis. Seminario de epidemiología de las zoonosis. Instituto Nacional de Salud. Ministerio de Salud. Perú - Lima. 1978.
2. Casas Olascoaga R. Diagnóstico serológico de la brucelosis. Boletín CEPANZO volumen XIV. 1976.
3. Szyfres Boris. Taxonomía del género Brucella. Gaceta veterinaria - tomo XXXIII 1971.
4. García Carrillo C. "Métodos para el diagnóstico de la brucelosis". Gaceta veterinaria - tomo XXXII. 1970.
5. Rodríguez A. y col. Manual de Brucelosis. 2001.