

## PRUEBA DEL ANILLO EN LECHE PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE BRUCELOSIS BOVINA

Acosta A.M.<sup>1</sup>, Ortiz M.M.<sup>2</sup>

La Brucelosis en los animales esta descrita y referida



como una entidad nosológica reproductiva caracterizada por aborto, retención de placenta y consecuentemente disminución de la producción láctea e infertilidad en los machos; en consecuencia la *Brucella* es uno de los principales patógenos zoonóticos a nivel mundial que, por su implicancia en salud humana y los rasgos epidemiológicos, es de notificación obligatoria a todos los países miembros de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). El propósito de las pruebas existentes en la actualidad para el

diagnóstico de la infección producida por el género *Brucella* en los diferentes especímenes y en donde el hombre es un huésped heterólogo accidental guardan una estrecha relación con la finalidad de servir como elementos de orientación referencial no sólo en la investigación epidemiológica de la enfermedad, sino por que lleva consecuentemente a un mejor producto pecuario y por ende un desarrollo socio-económico más productivo, incluso permite desarrollar tareas específicas en la toma de decisiones relacionadas con el binomio Ganadería / Medio Ambiente

Es compromiso del Ministerio de Agricultura entre otras actividades, mejorar la Producción Pecuaria Nacional, para lo cual, a través del Servicio Nacional de Sanidad Agraria-SENASA y del Centro de Diagnostico de Sanidad Animal, ponen a disposición de los ganaderos una serie de pruebas diagnósticas, lo cual va a permitir perfeccionar los sistemas de prevención, control y erradicación de enfermedades de mayor interés económico y de salud pública (zoonosis), que son barreras para el comercio internacional y que limitan el acceso a mercados externos de los productos pecuarios peruanos, dentro de estas enfermedades esta la Brucelosis Bovina. Un programa de vigilancia epidemiológica eficiente permite descubrir tempranamente esta enfermedad a bajo costo y mantener áreas libres con garantías de control respecto al producto lácteo o sus derivados y por ende la adecuada rentabilidad de la producción, de lo contrario como se sabe se generan barreras, afectando así muy seriamente el desarrollo socioeconómico sobre todo a pequeños ganaderos por ser el sector de mayor vulnerabilidad en zonas rurales.

Actualmente hay un gran número de pruebas diagnósticas para evidenciar anticuerpos específicos antibrucelares tanto en suero, plasma sanguíneo, leche y en otros fluidos orgánicos como: plasma seminal y mucus vaginal; dichas técnicas varían en sensibilidad y especificidad, desde luego hay que tener en cuenta el momento de su aplicación, se sabe que ninguna prueba serológica aislada es adecuada para todas y cada una de las situaciones epidemiológicas. Por lo tanto, la reactividad de las muestras que son positivas en pruebas de análisis deben confirmarse utilizando una estrategia confirmativa establecida. Es de relevante importancia que los programas y/o sistemas de erradicación estén basados en criterios complementarios de diagnóstico de hato o rebaño ya que en el diagnóstico individual se logran los mejores resultados al aplicarse varios criterios y procedimientos que luego deben ser evaluados en su conjunto.

La Prueba del Anillo en Leche (PAL), también llamada Milk Ring Test (MRT) conocida inicialmente como Abortus Bang Ringprobe (ABR) fue diseñada por Fleishauer (1937) para evidenciar o detectar anticuerpos IgG e IgM atados a los glóbulos de grasa en la leche. En esta prueba se emplea un antígeno preparado a partir de cultivos puros de *B. abortus* S99 o S1119-3 a una concentración celular del 4%, coloreada con hematoxilina y con un pH de 3,3 – 3,7. El antígeno debe estandarizarse frente al OIESS.

La aplicación de la prueba de anillo en leche tiene la ventaja sobre las pruebas serológicas de que las muestras no son tomadas de una manera invasiva, por lo tanto no vamos a estresar al animal con la

<sup>1</sup> Consultor - Ex Profesor Principal a dedicación exclusiva de Microbiología y Serología de la Facultad de Medicina Veterinaria – Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Lima, Perú.

<sup>2</sup> Responsable del Laboratorio de Bacteriología - Centro de Diagnostico de Sanidad Animal – Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA – Ministerio de Agricultura. Perú

consecuente pérdida de producción de leche u otro efecto indeseable como producto del manejo del momento de la toma de la muestra.

La prueba del anillo en leche (PAL) pertenece al grupo de pruebas indirectas empleadas en el *Diagnóstico Presuntivo* de la brucelosis bovina, dado que evidencia o detecta anticuerpos aglutinantes antibrucela frente a la fracción O de la cadena de lipopolisacáridos de la membrana externa del agente etiológico.

La prueba del anillo en leche se emplea frecuentemente en áreas libres y de control de la enfermedad, ayuda a descubrir establos y/o hatos infectados, incluso es usada ampliamente en Vigilancia Epidemiológica porque permite controlar periódicamente la brucelosis en los establos, además contribuye a descubrir si la infección se ha reinstalado en el establecimiento lechero. La prueba del anillo en leche que es útil en ganado bovino, resulta ineficaz en los pequeños rumiantes (según OIE).



### Principio

Los anticuerpos brucelares contenidos en la muestra, reaccionan con el antígeno coloreado de *Brucella* formando con él un complejo antígeno-anticuerpo que se adhiere a los glóbulos de grasa de la leche que, por su menor densidad ascienden a la superficie del tubo formando una capa de crema a manera de un anillo que se colorea de morado (hematoxilina del antígeno) que por su intensidad varían en matices; desde un morado intenso (positivo) a un blanco cremoso (negativo), el cual es indicativo de que la muestra no contiene aglutininas específicas por lo tanto el antígeno no aglutina permaneciendo la columna de leche uniformemente coloreada de lila.

### Toma de la muestra.

Las muestras de leche deben ser homogéneas es decir con una buena distribución de la crema (grasa) la agitación no debe ser vigorosa, luego mantenerla en reposo y en refrigeración, tomándose en cuenta su procedencia de manera que:

- *Si proviene del campo.*- Debe ser tomada tan pronto se haya llenado el porongo, bidón y/o cualquier otro recipiente que lo contenga y antes que la crema suba a la superficie del depósito. Para lo cual se mezcla bien (no bruscamente), luego se toma en un frasco con un medidor apropiado una cantidad adecuada de muestra, para posteriormente añadir si es necesario pretratar con un conservante (formol al 1% o bronopol al 0,02%) en proporción de 1 mL de solución conservante por cada 10 mL de leche. Luego se procederá a identificar la muestra correctamente y transportarla refrigerada hasta el laboratorio.



- *Si proviene de tanques, lugares de acopio o plantas pasteurizadoras.*- Es recomendable preferir el o los tanques de menor capacidad para poder identificar la procedencia de la muestra de leche. Se debe hacer bien el mezclado de cada tanque para que la crema este bien distribuida y sea representativa, luego se toma en un frasco con un medidor apropiado una cantidad adecuada de muestra, para posteriormente añadir si es necesario pretratar con un conservante (formol al 1% o bronopol al 0,02%) en proporción de 1 mL de solución conservante por cada 10 mL de leche. Luego se procederá a identificar la muestra correctamente y transportarla refrigerada hasta el laboratorio.



### Procedimiento de la Prueba.

Las muestras de leche deben tenerse refrigeradas con un mínimo de 48 a 72 horas; se Llevan a temperatura ambiente incluyendo el antígeno, una hora antes de la realización de la prueba.

Mezclar bien cada frasco que contiene la muestra; para lo cual se invierte varias veces, no violentamente, para resuspender la grasa (crema).

En una gradilla con tubos debidamente rotulados y considerando los controles respectivos, colocar 1 mL de muestra en cada tubo (de diámetro suficiente que permita la formación de una columna de 25 mm)

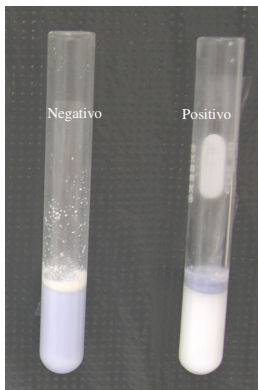
Añadir 30 µL de antígeno para la prueba del anillo en leche a cada tubo y mezclar invirtiendo suavemente el tubo varias veces logrando una distribución uniforme antígeno- leche.

Luego colocar la gradilla en la incubadora a 37°C por una hora y realizar la primera lectura a los 30 minutos y la lectura fin al a los 60 minutos, sin embargo, la refrigeración durante toda la noche a 4°C aumenta la sensibilidad de la prueba y permite una interpretación más fácil.

Es conveniente indicar que el vínculo antígeno-leche es muy importante ya que al aumentar la cantidad de leche en la prueba aumenta la sensibilidad del antígeno y viceversa, de manera que éste principio ha permitido modificar la prueba usándola en muestras de tanques en establos lecheros y camiones cisternas

Ajuste del volumen de muestra por el tamaño del hato

Número de animales de 2 años de edad o más	Volumen de leche para la prueba
Menos de 150	1 mL
150 – 450	2 mL
451 – 700	3 mL



### Interpretación

Lectura	Color del anillo y de la columna de leche
-	Anillo de crema color blanco La columna de leche color lila y/o azulada
+	Anillo y la columna de leche con la crema del mismo color (morado o azulino suave)
++	Anillo de crema el color (morado o azul) es más pronunciado que el resto de la columna de leche
+++	Anillo de crema de color morado o azul marcado; pero la columna de leche se observa con algo de color.
++++	Anillo de crema morado o azul intenso, la columna de leche es de color blanco.

Los resultados en cuanto a las reacciones se clasifican en Negativas y Positivas y su evaluación frente a los establos se ordenan en *Negativos* y *Sospechosos* por que la prueba en si, evidencia una *presunción* de la enfermedad y no la presencia de la misma en el establo o hato.

### Consideraciones y precauciones que deben tomarse en cuenta antes de realizar la prueba del Anillo en Leche (PAL).

- No debe efectuarse el mismo día que se recolecta la muestra de leche por que se corre el riesgo de tener algunos falsos positivos.
- No se puede realizar en leche pasteurizadas por que el calentamiento interfiere con los resultados.
- La homogenización que se realiza durante el proceso de industrialización de la leche y la agitación brusca interfiere con la prueba y consecuentemente en los resultados.
- La escasez o el exceso de crema (grasa) dificulta la lectura e interpretación de la prueba.
- La prueba del anillo en leche puede ser negativa por que hay vacas que no eliminan anticuerpos por la leche, pero son serológicamente positivas por estar infectadas.
- Se califica como una reacción falsa positiva de una muestra de leche a la prueba del anillo cuando, a la serología del o los animales dan resultados negativos, sin embargo es necesario indicar que en algunos casos se detectan anticuerpos en la leche antes que se observen títulos aglutinantes en el suero sanguíneo. Puede encontrarse reacciones falsas positivas por: presencia de calostro, leche de vacas próximas a entrar al período de seca, reacciones inespecíficas cuando se adiciona preservantes a la leche, animales con mastitis, animales con desordenes hormonales y variaciones en el almacenamiento y temperatura de la muestra

- Se conoce que debido a la gran sensibilidad de la prueba, generalmente no dan falsos negativos sobre todo cuando es realizada correctamente.
- En las zonas y áreas libres también se emplea como referente para la recertificación del o los hatos y establos libres de la enfermedad porque su validez como prueba de vigilancia esta relacionada a la frecuencia que se realiza, así tenemos que:
  - Una sola prueba anual (PAL) es indicativa de diagnóstico presuntivo entre un 60 - 70 % de la infección, sin embargo cuando se realizan tres pruebas por año, cada 4 meses, se obtienen mejores resultados en la vigilancia de la enfermedad.

La Prueba de anillo en leche (PAL), tiene una sensibilidad del 99% y una especificidad del 56%(9).

Aunque en la Quinta Edición del Manual de Pruebas de Diagnostico y de Vacunas para Animales Terrestres (Mamíferos, Aves y Abejas) de la OIE referido en el capítulo de Brucelosis Caprina y Ovina (no por *Brucella ovis*) indica que la prueba del Anillo en leche es muy útil en ganado bovino, es considerada inefectiva en pequeños rumiantes. Investigaciones anteriores señalan que esta prueba también se puede efectuar en leche de cabra u oveja si se añade crema de leche bovina negativa o libre de infección (ya que el peso y tamaño de los glóbulos grasos de la leche de los pequeños rumiantes es menor; si es que no se realiza este artificio, la lectura no se podría realizar por la ausencia de la formación del anillo en la parte superior de la columna de leche y en las lecturas positivas se observaría aglutinación en el fondo del tubo y ocasionalmente copos de aglutinación dispersos en la columna de leche). Después de este artificio se puede realizar la prueba en la misma forma que para la leche de vaca. La prueba se incuba a 37°C por 3 horas antes de realizar la lectura correspondiente.

## Bibliografía

1. Centro Panamericano de Zoonosis, OPS / OMS. (1968). Técnicas e interpretación de las pruebas de seroaglutinación para el diagnóstico de la brucelosis bovina Nota técnica 2 / Revisión 1.
2. Casas Olascoaga. (1976). Diagnóstico Serológico de la Brucelosis Centro Panamericano de Zoonosis OPS / OMS Vol. XVIII. 3-4.
3. Centro Panamericano de Zoonosis, OPS / OMS (1971) Elaboración y normalización de antígenos para las pruebas de seroaglutinación de la brucelosis. N. Tec. 3 / Rev.3.
4. Patterson JM , Deyoe BL (1976) Effect of physical properties of milk fat globules on Brucella rings test sensitivity. Journal of Dairy Science, 60:851-856.
5. Mac Millan A (1990). Conventional serological test Animal Brucellosis., 153+197;206
6. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) 2004. Manual de pruebas de diagnostico y de vacunas para animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). Quinta edición.
7. World Health Organization. Technical Report Series N 67. (1953)Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis - second report.
8. G.C. Alton. Lois M. Jones, R.D. Angus, J.M. Verger. (1988) Techniques for the Brucellosis Laboratory-Institut National de la Recherche Agronomique – INRA.
9. Bercovich, 1998: Bercovich Z Maintenance of *Brucella abortus* free herds: A review with emphasis on epidemiology and the problems of diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. Veterinary Quarterly. 1998; 20(3): 81 - 88. [PubMed: 9684294].