

Prueba de Rosa de Bengala y/o Tarjeta en el Diagnóstico de Brucelosis Bovina

Martín Ortiz Morera¹, Miguel Acosta Andrade²

La Brucelosis es una zoonosis de distribución mundial, en el hombre tiene una sinonimia variada como: Enfermedad de Bruce, Fiebre Malta, Fiebre Ondulante y otros; el agente causal de la enfermedad pertenece al género *Brucella* cuya presencia determina un cuadro clínico sugerente, aunque inespecífico y que esta unido al antecedente epidemiológico de exposición

Se reconocen tres especies clásicas: *B. abortus* afecta mayormente al ganado bovino, *B. suis* es más frecuente en porcinos y la *B. melitensis* que fundamentalmente ataca a cabras, ovejas y alpacas, pero puede afectar a bóvidos y cerdos y es considerada como la de mayor patogenicidad para el hombre ya que como sabemos este es un huésped accidental no específico sobre todo la especie *melitensis biovariedad 1 y 2*. Las otras especies del género *Brucella* se aprecian como menores dado que no revisten tanta importancia en patología humana

Dentro de las biovariedades de *B. abortus*, la de mayor malignidad para el hombre es. *biovariedad 1*, seguida de las *biovares 3 y 6*; *B. suis* presenta un riesgo de infección humana mucho menor que *B. melitensis* y *B. abortus*, y su distribución geográfica se encuentra mucho más limitada. Las biovariedades 1 y 3 son las que más frecuentemente infectan al hombre y su origen suele ser porcino. Sin embargo, la brucelosis presenta una gran capacidad de adaptación a los cambios sociales y a las modificaciones en las prácticas agropecuarias, lo que con frecuencia da origen a variaciones en el comportamiento epidemiológico y en la distribución geográfica de las diferentes especies y biovariedades de *Brucella* (Rodriguez T y col 2001.)

Para el diagnóstico, se pueden emplear métodos indirectos y directos; el diagnóstico indirecto es el examen serológico, el cual permite detectar la presencia de anticuerpos frente al antígeno específico de la *Brucella*, lo cual es detectable desde la segunda y tercera semana después de la exposición; período en el cual aparecen los anticuerpos aglutinantes frente al antígeno brucelar.

Las pruebas que se emplean en el diagnóstico serológico en forma habitual corresponden a las consideradas: básicas, complementarias y confirmatorias que en conjunto y por selección nos ayudan a establecer el diagnóstico que en definitiva se logra con el aislamiento bacteriológico y tipificación y sus biovariedades del agente causal de la enfermedad que en esta caso la *Brucella*, ayudado por supuesto con la demostración de la presencia de anticuerpos en el suero del y/o animal(es).

En Nuestro país, la prueba tamiz oficial en la ejecución de las actividades del programa de control y erradicación de brucelosis bovina (DS-033-2000-AG-SENASA), es la prueba de Rosa de Bengala, esta prueba pertenece a las pruebas conocidas como pruebas de antígeno tamponado o bufferado, incluso llamado “Card Test”(Pietz 1967;

¹ Laboratorio de Bacteriología – Unidad del centro de Diagnóstico de Sanidad Animal – SENASA- PERÚ.

² Consultor Nacional , ex profesor Principal de microbiología y serología de la Facultad de Medicina Veterinaria de UNMSM y ex becario (Unidad de Brucelosis) del Centro Panamericano de Zoonosis . Buenos Aires Argentina.

Nicoletti 1968; Pitez y Schiff 1968; Ray y Corley 1968; Ladwig 1968; Morgan y col 1969).

En la ejecución de la prueba se puede utilizar tarjetas especiales u otro material, actualmente esta modificada para hacerla en placa de vidrio (aglutinoscopio de Huddleson y Abel 1928.).

En un inicio la prueba de Rosa de Bengala se destinó para sueros de porcinos, posteriormente se modificó el antígeno extendiéndose su aplicación a bovinos, en tal virtud es una prueba que se emplea como tamiz que sumada a otras pruebas complementarias permite su aplicación como prueba calificativa de diagnóstico y vigilancia epidemiológica en áreas y hatos libres de infección brucelar.

El uso de la prueba de Rosa de Bengala por un lado, asociada a otras pruebas confirmatorias, como Fijación del Complemento y Elisa Competitiva y por otro incluyendo el empleo de recursos humanos y económicos permite ejecutar las campañas de control y erradicación de la brucelosis en el país, oportunidad que tienen los ganaderos de acogerse al programa a cargo del Ministerio de Agricultura a través del SENASA.

La prueba no es otra cosa que un procedimiento cualitativo de ejecución y observación rápida de macro aglutinación hecha en una sola dilución evidenciando principalmente anticuerpos de tipo IgG.

La prueba se fundamenta en la inhibición de algunas aglutinas inespecíficas a pH bajo. Se usa un antígeno corpuscular (B. abortus cepa 1119-3 o Weybridge 99) al 8 % de concentración celular en solución tope estabilizado a pH $3,65 \pm 0,05$. Cuando el antígeno estabilizado en diluyente bufferado se mezcla con el suero o plasma la variación del pH es muy limitada elevándose de 3,65 - 3,85 ($\pm 0,05$). Nielsen et al., 1996, establecieron que esta prueba tiene una sensibilidad del 94% y una especificidad del 100%.

La prueba de tarjeta puede dar reacción positiva antes que las pruebas estándar de seroaglutinación hayan alcanzado los títulos correspondientes a clasificación de reaccionante positivo, lo que se debe probablemente a niveles adecuados de IgG1 que reaccionan con el antígeno tamponado antes que la totalidad de anticuerpos (IgM e IgG2) logren títulos o alcancen ser referenciales como diagnóstico en otros métodos de diagnóstico en otras pruebas convencionales, incluso en terneras vacunadas (cepa 19) entre 3 a 6 u 8 meses de edad se hace negativa rápidamente y no interfiere en el diagnóstico posteriormente a los 24 meses de edad. Sin embargo en ella se presenta **Falsos negativos** limitando por lo tanto a animales con pocos días de evolución así como en otros casos con enfermedad de curso muy prolongado

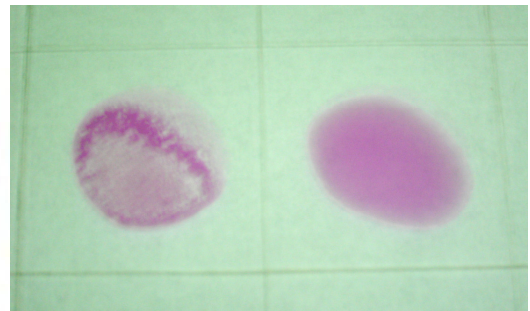
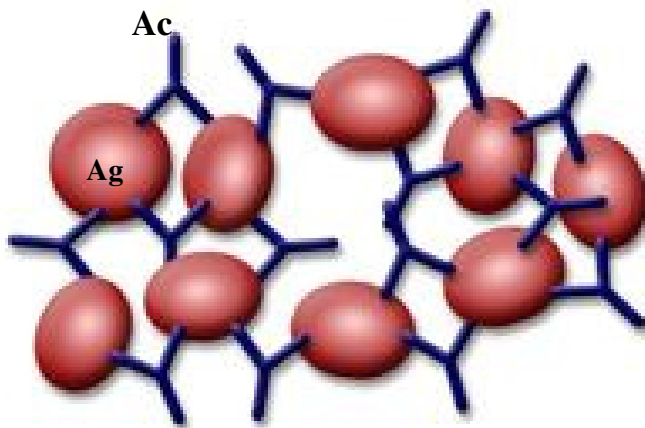
Cuando tardíamente, se vacunan animales con cepa 19 se corre el riesgo de calificar a cierto grupo de animales que dan falsos positivos, por lo que es conveniente recurrir a otras pruebas que discriminen vacunados de infectados como la Fijación del Complemento y Elisa Competitiva, previa notificación de vacunación tardía al momento de entregar la muestra al laboratorio. Esta discriminación se da porque se ha demostrado que existe una buena correlación entre la prueba tamiz y las confirmatorias, porque estas últimas detectan entre otros al mismo tipo de anticuerpos.

La seroaglutinación positiva en tarjeta o Rosa de Bengala indica claramente que:

- Por su simplicidad en la ejecución y lectura así como por el costo se considera conjuntamente con el Test de Angus y Barton (BPA) como pruebas diagnósticas disponibles para propósitos de vigilancia y control de la enfermedad
- En caso de bovinos una reacción positiva a Rosa de Bengala corresponde cuando menos a un título de 1/100 a la prueba lenta de tubo y / o rápida de placa para animales vacunados cuando terneras, inclusive **NO** existe la clasificación de **Sospechoso**, que es frecuente en la prueba de placa y tubo.
- El pH es el factor determinante de la especificidad de la prueba
- El antígeno tiene buena estabilidad a 4 grados C.
- El antígeno se deteriora fácilmente si se expone diariamente a cambios de temperatura ambiente
- También guarda mucha importancia que el antígeno tenga la estabilidad correcta, así como el pH y la concentración celular que exigen las normas de preparación para el biológico.
- Debe reaccionar correctamente a concentraciones que determinen positividad o negatividad de la muestra con el suero OIESS.

Fundamento

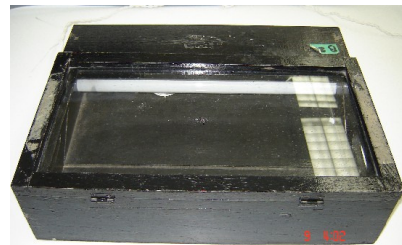
La prueba se basa en la inhibición – inactivación de algunas aglutininas inespecíficas a pH bajo. Es una prueba cualitativa muy sensible que detecta IgG1 y su positividad persiste por mucho tiempo.



Los anticuerpos tienen la capacidad de unirse a dos antígenos y estos a su vez se unen a varios anticuerpos, formando una malla entrelazada observable directamente.

Equipos

- Centrífuga.
- Refrigeradora (2- 4°C).
- Aglutinoscopio.



Materiales

Placa de vidrio dividida en cuadrantes.
Crioviales.
Micropipeta de rango 5-50µL.
Tips con un rango de 20-200µL.
Plumones de tinta indeleble.
Agitadores.

Reactivos

Antígeno rosa de bengala 8 % concentración celular.
Sueros control positivo.

Procedimiento de Ejecución de la Prueba Diagnóstica**Recepción de la muestra**

- Se registran las muestras debidamente identificadas.

Preparación de los sueros

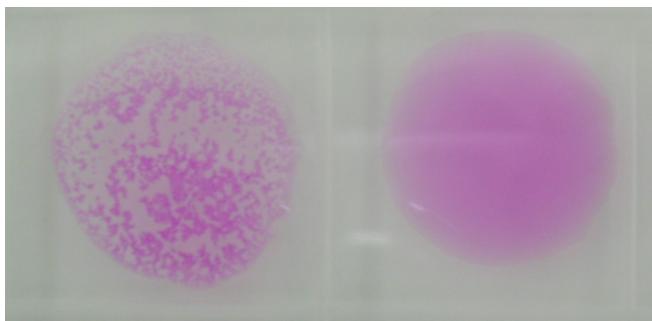
- Los sueros deben ser centrifugados a 2000 rpm / 5-10 minutos.
- Trasvasar los sueros a crioviales o tubos previamente rotulados.
- Confeccionar los inmunogramas en el orden en el que serán distribuidos los sueros en la placa.
- Identificar las placas de acuerdo al número de inmunograma.

Procedimiento:

- El suero y el antígeno deben estar a temperatura ambiente (22°C +/- 4°C).
- Solamente se debe retirar la cantidad de antígeno necesaria para trabajar en ese período.
- Depositar 30µL de suero problema sobre cada cuadrante de la lámina de vidrio.
- Antes de usarlo, homogenizar cuidadosamente el antígeno y depositar 30µL de este cerca al suero problema.
- Mezclar el suero y el antígeno, formando una zona circular u ovalada de aproximadamente 2cm de diámetro.
- Marcar el timer por 4 minutos.
- Levantar la placa y realizar movimientos rotatorios (10-12 por minuto).
- Transcurrido el tiempo proceder a la lectura, sobre fondo blanco.

Resultados

- Para la lectura se realiza haciendo incidir una luz indirecta en la placa de vidrio.
- El resultado de la lectura del diagnóstico se informa como positivo o negativo.
- Las reacciones positivas presentan grumos de aglutinación que pueden ser grandes o pequeños y las negativas tienen ausencia de éstos.

**Toma de muestras - recomendaciones**

- ⇒ El material a utilizar en la extracción de sangre y envío de la muestra (tubos, jeringas, etc.) debe estar seco y limpio; los restos de humedad y partículas de

- ⇒ Las muestras de sangre se extraerán sin anticoagulantes en tubos al vacío, por punción venosa, yugular o coccígea de animales identificados.
- ⇒ Identificar, rotulando siempre con claridad, escribiendo con marcador indeleble y no con lápiz.
- ⇒ Inmediatamente después de haber obtenido la muestra de sangre, se debe colocar en plano inclinado para aumentar la superficie de coagulación, así mismo colocar los tubos bajo sombra, en un lugar fijo, no sometido a temperaturas extremas ni movimientos bruscos.
- ⇒ Trasvasar el suero con pipeta o por decantación en las mejores condiciones de seguridad e higiene que sea posible, evitando la hemólisis.
- ⇒ Enviar al laboratorio cantidades representativas de suero, procurar no enviar las mismas los fines de semana o vísperas de feriados. Adjuntar también datos referenciales del estado sanitario del animal y del hato.
- ⇒ Nunca enviar muestras de sangre por transportes públicos, sin que se le haya extraído previamente el suero, pues las mismas arriban siempre hemolizadas y sin valor para análisis serológicos.

Características generales y operativas de las pruebas diagnósticas															
PRUEBA	Concentr. Celular	pH del Antígeno	Colorante empleado	Tiempo Lectura	Isotipos que detecta			Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	IgM	IgG1	IgG2	IgA	Vacunado /Infectado	
															ng/mL
					Rosa de Bengala	8%	3,65 +/-0,05	Rosa de Bengala	4 min		IgM (+/-)	IgG1	IgG2		94
Prueba del anillo en leche	4%	3,3-3,7	hematoxilina	1 hora	IgA	IgM	IgG1 (+/-)		89						+/+
Prueba lenta en tubo (Wright)	4,50%	6,4-7,0	-----	48 horas		IgM	IgG1 (+/-)	IgG2	75.1	99.3	20	(-)	125	650	+/+
Prueba 2 mercaptoetanol	4,50%	6,4-7,0	-----	48 horas			IgG1 (+/-)	IgG2	59.9	99.2	(-)	1500	2600	(-)	+/+
Fijación del complemento	4,50%	6,4-7,0	-----	48 horas		IgM		IgG1	97.5	99.9	(-)	210	(-)	(-)	+/+
Elisa I. Ig G1	-----	-----	-----	2-3 horas		IgG1			94,44 ± 2,2%	96,35 ± 3,1%	(-)	105	(-)	(-)	+/+
Elisa I. a L					IgA	IgM	IgG1	IgG2			45	120	120	110	-/+
Elisa C. LPS - s				2-3 horas	IgA	IgM	IgG1	IgG2	99.7	100	<10	<10	<10	<10	-/+
Nielsen et al, 1996															
Brucelosis - Enrique pennimpede y col. Avances en medicina veterinaria															
Brucelosis: una revisión práctica. Hugo Abel Castro y col. Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires.															
Microbiología veterinaria - Stanchi y col. 2005															
Kang'ethe, E.K. & col. 2000															
(****) Nielsen KH, Kelly L, Gall D, Nicoletti P, Kelly W. 1995															

Bibliografía

- ⇒ Acosta A. M. y col. 1973. Brucelosis en Alpaca y en el Hombre. Rev. Investigación Pecuaria (Perú Lima)1.p.37
- ⇒ Acosta A. Miguel, Ortiz Martín. Brucelosis Caprina. Laboratorio de Bacteriología. Unidad del Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal – Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Revista de Ciencias Veterinarias Vol. 21. N 2. 2005. Lima Perú.
- ⇒ A. Rodríguez Torres y col. 2001. Manual de Brucelosis. España Castilla León
- ⇒ Casas Olascoaga R. 1976. Diagnóstico serológico de la Brucelosis – Zoonosis – OMS-OPS –Centro Panamericano de Zoonosis – CEPANZO.
- ⇒ Jordi Sierra Álvarez y Pere Godoy G. Incidencia, Etiología y Epidemiología de la Brucelosis en una rural de la provincia de Lleida Facultad de Medicina. Universidad de Lleida.
- ⇒ Kang'ethe, E.K.1. Arimi, S.M.1, Omore, A.O2,3, McDermott, J.J.3, Nduhiu, J.G.1, Macharia J.K.1 and Githua, A1. 3rd All Africa Conference on Animal Agriculture. 6 – 9 November 2000. The prevalence of antibodies to *Brucella abortus* in marketed milk in kenya and its public health implications.
- ⇒ Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2004. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). Quinta edición. P. 445.
- ⇒ Nielsen KH, Kelly L, Gall D, Nicoletti P, Kelly W. Vet Immunol Immunopathol 1995 Jun; 46(3-4): 285-91 Agriculture Canada, Animal Diseases Research Institute, Nepean, Ont. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis.