

DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS ANIMAL: IMPLEMENTACIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS

Diagnostic of animal brucellosis. Implementation of new technologies

Samartino, L, Schust*, M., Piazza. E-. Salustio, E., Conde, S.

INTRODUCCION

La brucelosis es una enfermedad infecto contagiosa producidas por bacterias del género *Brucella* que afecta la salud humana por contagio directo con placentas, fetos o secreciones uterinas o por consumir contaminados fundamentalmente leche y sus derivados. La brucelosis afecta la salud animal ocasionando generalmente abortos en la mayoría de las especies domésticas, y generando además un impacto económico negativo en la industria ganadera debido a las pérdidas originadas en la disminución de la producción de carne y leche y disminución de valor de reventa de los animales infectados.

La transmisión de la enfermedad en cualquiera de las especies afectadas se hace durante el parto u aborto de animales infectados. El aborto se produce generalmente al superar la mitad de la gestación y la cantidad de brucelas eliminadas en este acto es la fuente principal de contagio. En Argentina, por ejemplo, existe un programa Nacional de control y erradicación de la brucelosis bovina que emplea como técnicas de diagnóstico al BPA, como tamiz, a la lenta en tubo de Wright y 2 mercaptoetanol (2ME) como confirmatoria y a la fijación de complemento como definitiva son las establecidas para el control y erradicación de la brucelosis bovina.

Esta metodología si bien ha contribuido al control de la brucelosis en distintos países, tiene el inconveniente de emplear métodos subjetivos, donde las pruebas de Wright y 2ME tardan 48 horas de duración al igual que la FC Por lo tanto para solucionar estos aspectos, se han ido desarrollando los enzimo inmunoensayos, (ELISAs) y la polarización fluorescente (FPA) que recientemente se han incorporado al programa de control. Ambas técnicas, además de su excelente

sensibilidad y especificidad son capaces de diferenciar animales vacunados con cepa 19 aquellos infectados con cepas de campo.

El diagnóstico definitivo de cualquier enfermedad es obtenido por aislamiento e identificación del agente. Mientras que, los métodos directos son inviables cuando se trabaja con rebaños. Así, las operaciones de certificación de rebaños libres se apoyan en el serodiagnóstico, teniéndose en cuenta en la elección de las pruebas a ser aplicadas, a sus características intrínsecas, al costo y a la practicidad de la ejecución. Se establecen las pruebas de rutina, a intervalos regulares, con sacrificio de los animales positivos, hasta la obtención de tres o mas pruebas negativas para todos los animales de reproducción. Como el diagnóstico positivo significa la remoción del animal de la población, las características de sensibilidad y especificidad de las pruebas se tornan muy importantes, pues resultados falso-positivos significan sacrificar animales sanos, y resultados falso-negativos significan dejar fuentes de infección en contacto con animales sanos.

El desempeño de los tests utilizados en el serodiagnóstico de la brucelosis se basa fundamentalmente en la detección de las IgG1. El test mas difundido es el Rosa de Bengala (RB), que es cualitativo, rápido, barato, de simple ejecución y posee óptima sensibilidad y buena especificidad.

El 2-mercaptoetanol (ME), además de poseer buena especificidad (NIELSEN, 1995), puede también presentar buena sensibilidad. Las desventajas son el tiempo para la realización del test, gran volumen de reactivos y material de vidrio y utilización de reactivos tóxico.

El test de fijación de complemento (FC) es lo que presenta mejor correlación con los aislamientos en animales, natural o experimentalmente, infectados, lo que llevó a su adopción como test de referencia para la validación de otros tests serológicos.

* Isanma@cnia.inta.gov.ar

INTA, CICV, Instituto Patobiología, CC 77 Morón, Buenos Aires, Argentina

El test de polarización fluorescente (FPA) puede ser ejecutado en un laboratorio simple o en el campo. Es rápido y de fácil ejecución, requiere volúmenes menores de suero y no es afectado por la hemólisis. Además es capaz de distinguir animales vacunados de no vacunados, aunque no exista una explicación razonable para este fenómeno.

En los países del Mercosur, se utiliza, como tamiz, el RB, el test del anillo, el test de Huddleson y el test de antígeno buferado en placa (BPA). Para confirmar los resultados del tamiz, los países emplean, principalmente, el FC, el Rivanol, el 2-ME y los tests inmunoenzimáticos (ELISA), utilizados en Argentina y Chile. En Brasil, los tests oficiales del Programa Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis y de la Tuberculosis (PNCEBT) son el rosa de bengala (RB), el 2-ME y el FC (<http://www.agricultura.gov.br>). En Argentina, son ejecutados los mismos tests, aunque el RB es substituido por BPA. En Uruguay, el 2-ME no es utilizado. Existen varios tests utilizando antígeno acidificado buferado, como BPA y RB (Por ello podemos ver que en todos los países se usan siempre una batería de técnicas, sin embargo, no siempre son las mismas

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS PRUEBAS

Para comprender la necesidad de utilizar una técnica u otra debemos considerar dos elementos muy conocidos pero frecuentemente no recordados: la sensibilidad y especificidad de las mismas. Entendemos por sensibilidad de una prueba, el grado de capacidad que tiene para detectar animales infectados por el agente etiológico específico, en nuestro caso por *Brucella*. De esta manera, si la prueba que usamos da reacciones positivas en 98 animales de 100 bovinos infectados, decimos que la prueba tiene 98% de sensibilidad. El 2% restante son "falsos negativos". En un programa de erradicación interesa mucho que la prueba empleada sea lo suficientemente sensible para que el grado de error por "falsos negativos" sea el menor posible, ya que el objetivo es eliminar todo foco de infección de un rodeo.

La sensibilidad de una prueba se puede expresar en la siguiente fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{verdaderos positivos (infectados)}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

Ninguna prueba es capaz de descubrir el 100% de bovinos infectados en todos los rodeos.

Por especificidad, en cambio, medimos el grado de capacidad de la prueba en detectar el mayor número de infecciones y el menor número de "falsos positivos". Una prueba altamente específica será la

que dé menos reacciones de "falsos positivos". Si de 100 animales no infectados, la prueba da reacciones positivas en 5 animales, decimos que la misma tiene una especificidad del 95%. Una prueba poco específica es causa por consiguiente, del sacrificio de animales sanos y de pérdidas económicas innecesarias. Ninguna prueba serológica, sin embargo, es 100% específica.

La especificidad se puede expresar en la siguiente fórmula:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{verdaderos negativos (no infectados)}}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

Si nosotros quisiéramos dar a una prueba mayor sensibilidad, disminuiría a la vez la especificidad. Por ejemplo, si disminuyéramos la densidad del antígeno para la prueba de seroaglutinación, aumentaríamos la sensibilidad pero a la vez reduciríamos la especificidad.

La eficacia de una prueba diagnóstica depende de su sensibilidad y especificidad, valores que miden la proporción de "falsos negativos" y de "falsos positivos" respectivamente. La importancia de estos parámetros pueden ir cambiando a medida que se reduce la prevalencia de la infección.

NUEVAS TÉCNICAS

Polarización fluorescente

Entre las nuevas técnicas, consideramos profundizar la descripción de la polarización fluorescente que es la que más recientemente se ha incorporado en diversos países para el diagnóstico de la brucelosis.

El FPA es una técnica sencilla que puede realizarse en el laboratorio y en otras circunstancias en el campo. Es una prueba homogénea que al no requerir la separación de los compuestos analizados es muy rápida de efectuar. El mecanismo se basa en la rotación aleatoria de las moléculas en solución. El tamaño molecular es el factor principal que influencia la velocidad de rotación. Por ejemplo, una molécula pequeña gira a una velocidad más alta que una molécula grande. En este caso la molécula pequeña es el antígeno (*Brucella abortus*) marcado con isotiocianato de fluoresceína que emitirá una reacción que puede medirse por la luz polarizada. Sin embargo, si esta molécula se une a los anticuerpos en solución aumentará su tamaño la velocidad de rotación de las mismas descenderá provocando una medida menor.

El FPA se hace en tubos aunque puede hacerse en placas de 96 pocillos, luego de diluir el suero bovino 1-100 en buffer específico se coloca en 2 ml de dicho buffer y se lee en un lector de polarización de

Polarización Fluorescente

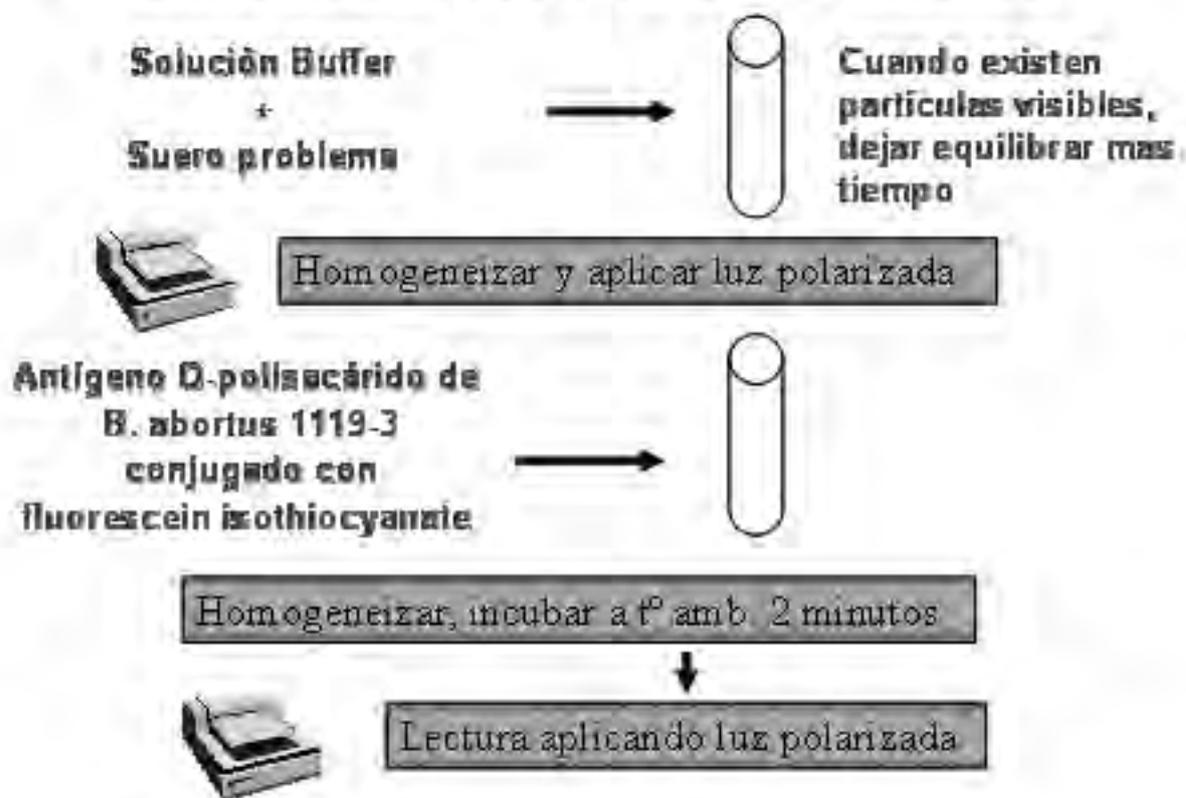


Figura 1. Diagrama de la realización del ensayo de FPA

fluorescencia (Sentry 100), lo que otorgara la lectura en blanco (Figura 1). Seguidamente se le agrega el antígeno, se espera 2 minutos, se vuelve a leer y se obtiene el resultado definitivo. Las medidas de lectura se expresan en unidades de milipolarización (umP) y cada país debe efectuar su validación para determinar el corte de la misma. Por ejemplo Canadá, determinó que el corte para el diagnóstico serológico de bovinos debe ser 90 umP, sin embargo este país NO vacuna contra la brucelosis bovina. Entonces aquellos países que no vacunan o que emplean la vacuna RB51 de *B. abortus* que no induce títulos serológicos, podrían utilizar esta medida, aunque siempre es conveniente efectuar un estudio propio. Aquellos países que utilicen la vacuna cepa 19 para la prevención de la brucelosis bovina deben emplear otro corte. De todos modos, esta técnica es capaz de discriminar animales vacunados con cepa 19 de aquellos infectados con *B. abortus* a partir de los 45-60 días post vacunación contribuyendo en una gran medida a evitar la eliminación de animales falso positivos. Lo mismo debe ser considerado cuando se vacuna con REV 1 para prevenir la brucelosis caprina.

Esta técnica, se emplea actualmente para el diagnóstico de brucelosis bovina, porcina y caprina donde obviamente los puntos de corte varían en cada especie. Además, diversos trabajos concluyen que es una excelente técnica para el diagnóstico de brucelosis en búfalos, bisontes y camélidos. También se han presentado trabajos indicando la factibilidad de usar este método con sangre entera.

Una de las ventajas prácticas de esta técnica es la facilidad de la implementación y su rapidez, lo que permite obtener un diagnóstico rápido y preciso en pocos minutos, lo que contribuye a una comunicación rápida del mismo con lo que eso implica en el control de esta enfermedad.

REFERENCIAS

1. Alton, G., Jones, L, Angus, R., Verger, J. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory, INRA Paris.
2. Samartino, L., Gregoret, R., Gall, D., Nielsen, K. Fluorescence polarization assay: Application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. J. Of Immunassay, 20 (3), 115-126. 1999.
3. Nielsen, K., Gall, D., Smith, P., Kelly, W., Heneghan, T., Walsh, B., Rojas, X., Perez, B., Buffoni, L., Salustio, E., Gregoret, R., Samartino, L., Dajer, A., Luna, E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. Vet. Micro. 80 163-170 .2001.
4. Samartino, L. Brucellosis in Argentina. Vet Micro, 90 (1-4) 2002
5. Samartino. L., Gil, A., Elzer, P. Capacity building for surveillance and control of bovine and caprine brucellosis. Capacity Building for Surveillance and Control of Zoonotic Diseases. FAO/WHO/OIES Expert and Technical Consultation. 7 FAO Animal Production and Health. 2006.
6. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 2004. OIE, Paris.