

PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS EN OVINOS*

Serological tests for the diagnosis of brucellosis in sheep

Yumaris Árias Linares¹

RESUMEN

Se analizaron 403 muestras de suero sanguíneo de ovinos adultos y jóvenes sin historial de vacunación contra *Brucella*, provenientes de unidades de producción de los municipios Araure, Guanare, Ospino, Papelón y San Genaro de Boconoíto del estado Portuguesa. Los objetivos fueron identificar la presencia de anticuerpos *anti Brucella abortus* mediante el uso de la prueba de rosa de bengala a concentraciones celulares de 3 y 8 %, lenta en tubo y ELISAc y determinar la presencia anticuerpos *anti Brucella abortus* según la edad, sexo y raza del ovino. Para el análisis de laboratorio se usó la prueba oficial de campo para diagnóstico de brucelosis en bovino, rosa de bengala o card test (8 %) y las confirmativas (ELISAc y lenta en tubo). Se incluyó la prueba rosa de bengala modificada al 3 %. El antígeno rosa de bengala se obtuvo del Instituto de Investigaciones Veterinarias, FONAIAP (actual INIA). En el análisis de los datos se aplicó estadística descriptiva como distribución porcentual y frecuencia ($P < 5\%$), pruebas de contingencia ($P < 1\%$) para asociar la proporción de reacciones positivas y negativas entre las pruebas. Para relacionar el grupo racial, edad y sexo con la presencia de anticuerpos, se aplicó pruebas de Chi Cuadrado de independencia ($P < 1\%$). Todas las pruebas mostraron la presencia de anticuerpos *anti Brucella abortus*, con variaciones marcadas en el número de muestras positivas (reaccionantes) entre pruebas. La prueba que detectó el mayor número de muestra reaccionantes fue la lenta en tubo 7,5 %, seguida por rosa de bengala modificada 3 %, luego ELISAc 2,5 % y 0,5 % en rosa de bengala 8 %. No hubo diferencias en las reacciones positivas para la edad, raza y sexo de los animales.

Palabras clave: *Brucella abortus*, reacción, anticuerpos, pequeños rumiantes.

ABSTRACT

403 samples of blood serum from adult and young sheep with no history of vaccination against *Brucella* were analyzed, from production units in the municipalities Araure, Guanare, Ospino, Papelón and San Genaro de Boconoíto in the Portuguese state. The objectives were to identify the presence of *anti Brucella abortus* antibodies by using the rose bengal test at cell concentrations of 3 and 8 %, slow tube and ELISAc and to determine the presence of *anti Brucella abortus* antibodies according to age, sex, and race of the sheep. For the laboratory analysis, the official field test for the diagnosis of brucellosis in bovine, rose bengal or card test (8 %) and the confirmatory tests (ELISAc and slow tube) were used. The 3 % modified rose bengal test was included. The rose bengal antigen was obtained from the Veterinary Research Institute, FONAIAP (now INIA). In the data analysis, descriptive statistics such as percentage distribution and frequency ($P < 5\%$), contingency tests ($P < 1\%$) were applied to associate the proportion of positive and negative reactions between the tests. Chi square tests of independence ($P < 1\%$) were applied to relate the racial group, age, and sex with the presence of antibodies. All tests showed the presence of *anti-brucella abortus* antibodies, with marked variations in the number of positive (reactive) samples between tests. The test that detected the highest number of reactant samples was the slow tube 7.5 %, followed by

(*)Recibido: 10-10-2018

Aceptado: 15-6-2019

¹Programa de Ciencias del Agro y del Mar. Universidad Ezequiel Zamora, UNELLEZ, Guanare, Guanare 3350, Po. Venezuela. y_u_maris@hotmail.com

modified rose bengal 3 %, then ELISAc 2.5 % and 0.5 % in rose bengal 8 %. There were no differences in the positive reactions for the age, breed, and sex of the animals.

Key words: *Brucella abortus*, reaction, antibodies, small ruminants.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis, es una zoonosis producida por distintas especies de bacterias del género *Brucella*. En Venezuela la *Brucella abortus* es la que afecta principalmente a los rebaños bovinos, en cuanto a los ovinos y caprinos existe una alta tasa de positividad a pruebas serológicas con antígenos de *Brucella abortus*, sin presentar síntomas de brucelosis, pueden ser portadores sanos. Como consecuencia de la infección se produce una caída de la producción, lo que ocasiona una merma notablemente en los medios de subsistencia de los productores, además de mantener la infección en el rebaño bovino cuando coexisten en un mismo ambiente y los rebaños infectados son responsables de la transmisión de la *Brucella* de forma directa e indirecta al hombre.

Para el diagnóstico de brucelosis en el laboratorio, se usan técnicas que incluyen desde el aislamiento del microorganismo hasta pruebas moleculares que amplían la seguridad en el control de la enfermedad. Los métodos directos usados son cultivo bacteriológico, tipificación y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de especie (Acha y Szyfres 2001; Sidor *et al.* 2013 y Pacheco 2016). En los métodos indirectos se utilizan pruebas serológicas que buscan la presencia de anticuerpos específicos anti-*brucella* en el suero del animal enfermo o infectado, en respuesta a la infección por *Brucella spp.* (Alton *et al.* 1988 y OIE 2008). En la República Bolivariana de Venezuela, según Resolución 036 sobre las Normas de vigilancia, prevención, control y erradicación de la brucelosis bovina (Gaceta Oficial 2017), figuran como pruebas oficiales para tamiz o screening las pruebas serológica rosa de bengala (RBT) y la prueba de aglutinación en placa con antígeno tamponado (BPAT). Están para confirmación definitiva o pruebas complementarias: la prueba lenta en tubo, prueba 2-Mercaptoetanol, ELISA Competitiva, ELISA Indirecto, fluorescencia

polarizada (FPA), fijación de complemento (FC) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El objetivo de esta investigación fue identificar la presencia de anticuerpos anti *Brucella abortus* en ovinos, según la edad, sexo y raza del ovino mediante el uso de la prueba rosa de bengala a concentraciones celulares de 3 y 8 %, lenta en tubo y ELISAc.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron 403 muestras en ovinos hembras y machos, adultos y jóvenes de diferentes fenotipos y sin historial de vacunación contra *Brucella*. Los animales se ubicaron en unidades de producción de los municipios Araure, Guanare, Ospino, Papelón y San Genaro de Boconoíto del estado Portuguesa. Se recolectó por animal muestra de sangre completa en dos tubos al vacío sin anticoagulante y aguja desechable (Vacutainer®). Las muestras colectadas se llevaron al laboratorio para separar el suero sanguíneo mediante centrifugación, se tomaron alícuotas de 2 ml y 5 ml, en tubos eppendorf y se almacenaron a - 20 °C hasta el análisis respectivo.

En el análisis de laboratorio se utilizó la prueba oficial de campo para diagnóstico de brucelosis en bovino como son: la prueba de rosa de bengala (RBT) o card test al 8 % y las recomendadas para confirmación definitiva como: prueba de ELISA Competitiva y prueba lenta en tubo. Además se incluyó una modificación de la prueba de rosa de bengala a una concentración celular de 3 %, modificación a los volúmenes de reacción para la especie caprina y ovina recomendada para mejorar la sensibilidad de la prueba (OIE 2008). Ambos antígenos utilizados para la prueba card test se prepararon en el laboratorio del Instituto de Investigaciones Veterinarias del INIA, en Maracay. La prueba de rosa de bengala al 8 y 3 % se realizó en el

laboratorio de microbiología de la UNELLEZ, Guanare. La prueba lenta en tubo se procesó en el laboratorio zoonosanitario del INSAI, Araure y para la prueba ELISAc se contó con el servicio privado de un laboratorio ubicado en Barquisimeto, estado Lara.

Para el análisis de los datos se aplicó estadística descriptiva como distribución porcentual y frecuencia ($P < 5\%$), pruebas de contingencia ($P < 1\%$) para la proporción de reacciones positivas y negativas entre las pruebas evaluadas y para relacionar grupo racial, edad, sexo se utilizó pruebas de Chi cuadrado ($P < 1\%$). Para este propósito se utilizó el paquete estadístico Statistix 8.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Presencia de anticuerpos de *Brucella abortus* en ovinos

En la Tabla 1 se observa que todas las pruebas utilizadas detectaron la presencia de

Tabla 1. Comparación de cuatro pruebas de diagnóstico de brucelosis en muestras serológicas de ovinos.

Reacción	Rosa de Bengala 8%	Rosa de Bengala 3%	Lenta en tubo	ELISAc
Negativo	401 (99,5 %)	383 (95 %)	307 (92,5 %)	393 (97,5 %)
Positivo	2 (0,5 %)	20 (5 %)	25 (7,5 %)	10 (2,5 %)
Total	403	403	332	403

Para todas la pruebas utilizadas no hubo diferencias en las reacciones positivas para la edad, raza y sexo de los animales, resultados coincidentes con Colmenárez (2006) y Javitt *et al.* (2009).

Comparación entre pruebas

Al correlacionar cualitativamente los resultados entre pruebas (Tabla 2), se observó que el número de muestras positivas para las pruebas rosa de bengala al 8 % vs ELISAc y lenta en tubo no fue significativa ($P > 0,05$), es decir, muestras que fueron detectadas positivas con una prueba, en otra no fue diagnosticada con el mismo resultado. Sin embargo, hubo correlación positiva y altamente significativa ($P < 0,01$) entre rosa de bengala al 3 % vs: ELISAc, rosa de bengala al 3 % y lenta en tubo, esto significa que la muestra

anticuerpos *anti Brucella abortus* en las muestras evaluadas, con variaciones marcadas en el número de positivos (reaccionantes) entre pruebas. La que detectó el mayor número de muestras positivas fue la lenta en tubo (7,5 %) y la menor fue rosa de bengala oficial (0,5 %). Rosa de bengala modificada fue considerablemente superior a la prueba oficial. Estos resultados coinciden con los de Lord *et al.* (1987), quienes reportaron mayor porcentaje de animales reactivos con la prueba lenta en tubo. Si se compara rosa de bengala 8 % y 3 %, se asemeja a los resultados citados con Díaz *et al.* (1999), quienes concluyeron que la prueba rosa de bengala al 8 % para el diagnóstico de la brucelosis en caprinos, es inadecuada debido a su baja sensibilidad, por lo que es recomendable la utilización del antígeno rosa de bengala preparado a una concentración del 3 %.

La prueba de ELISAc detectó 2,5 %, intermedia entre rosa de bengala modificada y la lenta en tubo.

diagnosticada como positiva o reaccionante en una de las pruebas, expresa igual resultado con las otras pruebas.

Existió correlación significativa entre ELISAc y lenta en tubo, lo que se evidencia en la Tabla 3, porque cinco muestras positivas detectadas por lenta en tubo a dilución de 1:25 (2) y 1:50 (3) también resultaron positivas con ELISAc, sin embargo cinco (5) muestras positivas en ELISAc no reaccionaron en lenta en tubo, ni en otra prueba. La interpretación es que toda prueba positiva a lenta en tubo a diluciones de 1:25 y 1:50 resultan con igual reacción para ELISAc, no así para la reacción positiva detectada por ELISAc. En este sentido, D'Pool *et al.* (2004), McGiven *et al.* (2003) y Nielsen *et al.* (2005) refieren que las técnicas de ELISAc para el diagnóstico de brucelosis pueden identificar títulos de anticuerpos

significativamente más bajos de los que pueden detectar otras pruebas como rosa de bengala, lenta en tubo o fijación de complemento.

Candelo (2009) comenta que debido a los bajos niveles de anticuerpos aglutinantes, las pruebas de aglutinación en placa y tubo, poseen un valor limitado, esto hace necesario aplicar criterios estrictos de interpretación, es común considerar positivas reacciones de 1:25, sin embargo, se recomienda registrar como positivos los reactores a la dilución 1:50.

De igual manera, los datos de la Tabla 2 indican que no hay diferencia estadística ($P > 0,05$) entre las pruebas ELISAc y rosa de bengala 8 %, lo que significa que entre éstas no hubo casos positivos coincidentes. Cinco muestras positivas con ELISAc no fueron diagnosticadas por rosa de bengala al 8 % (Tabla 3). En tal sentido, Valeris y Boscan (2012) argumentaron que casos positivos a brucelosis a través de la prueba de ELISAc y negativos con rosa de bengala, puede deberse a que esos anticuerpos de alta avidéz detectados en ELISAc no eran aglutinantes, requisito para ser detectados en la prueba rosa de bengala.

En el caso de rosa de bengala 8 % respecto a la lenta en tubo, solo una muestra resultó positiva en ambas pruebas. Hubo reaccionantes en lenta en tubo que no se detectaron con rosa de bengala al 8 %. La prueba que detectó el mayor número de reaccionantes fue la lenta en tubo con títulos hasta 1:50, resultado que coincide con Lord *et al.* (1987), quienes reportaron que el mayor porcentaje de animales reactores fueron detectados con el uso de la prueba lenta en tubo.

Al comparar rosa de bengala 8 y 3 % respecto a ELISAc, se evidenció que todas las muestras reaccionantes en las dos primeras pruebas también mostraron positividad en la ELISAc lo que evidenció una correlación positiva entre estas tres pruebas.

Tabla 2. Correlación cualitativa (contingencia) entre pruebas diagnósticas de brucelosis en muestras serológicas de ovinos.

Prueba	Rosa de Bengala 3 %	Rosa de Bengala 8 %	Lenta en tubo
ELISAc	17,04 **	0,02 ns	5,14 *
Rosa de Bengala 3%		20,5 **	45,84 **
Rosa de Bengala 8%			0,08 ns

*= ($P < 0,05$), **= ($P < 0,01$), ns= no significativo.

Tabla 3. Correlación entre las pruebas con resultados positivos para anticuerpos anti *Brucella abortus* en ovinos.

Prueba	Positivos	Elisac	RB 3%	RB 8%	Lenta en tubo
ELISAc	5	5			
RB 3 %	3	+	+		
RB 8%	1	+	+	+	+
Lenta en tubo UI/ml					
1:25	1	+	+		
1:25	7		+		
1:25	1	+	+	+	
1:25	1				
1:50	1		+		
1:50	3	+	+		

RB. Rosa de bengala

CONCLUSIONES

Se demostró la presencia de anticuerpos contra *Brucella abortus* en la especie ovina, sin diferencias de edad, sexo y raza.

Hubo variabilidad marcada en el número de muestras positivas (reaccionantes) detectados por las diferentes pruebas.

La prueba que detectó el mayor número de muestras positivas fue la lenta en tubo y la menor fue rosa de bengala oficial. Rosa de bengala modificada fue considerablemente superior a la prueba oficial.

Se observó que todas las muestras reaccionantes en la prueba rosa de bengala 8% y 3% mostraron la misma reacción positiva en la prueba ELISAc. Por lo que sumado a la rapidez y objetividad de la técnica ELISAc, hace que esta última se proponga como una herramienta útil a considerar en la especie ovina para el diagnóstico de anticuerpos específicos anti-*Brucella abortus*.

REFERENCIAS

Acha, P. y Szyfres, B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud- Organización Mundial de la Salud. 3ra Edición. Publicación Científica y Técnica 1 (580): 28-57.

Alton, G., Jones, L., Angus, R., and Pites, D. 1988. Techniques for the Brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, Francia. 190 p.

Candelo de Arriojas, N. 2009. Todo lo que se debe saber sobre brucelosis en bovinos. CENIAP HOY (Maracay, Venezuela). N° 4. Mimeo.

Colmenárez, M. 2006. Seroprevalencia de brucelosis caprina en explotaciones intensivas y extensivas de diferentes sectores de los municipios Iribaren y Jimenez, estado Lara. Trabajo Especialista en

Medicina Veterinaria Preventiva UCLA, Decanato de Ciencias Veterinarias. Barquisimeto. 47 p.

Díaz, A., Blasco, J. y Suárez, F. 1999. Prueba de tarjeta modificada para el diagnóstico de la brucelosis caprina Vet. Méx. 30(4): 307-311.

D'Pool, G., Rivera, S., Torres, T., Pérez, M., García, A., Castejón, O. y Rojas, N. 2004. Prevalencia de brucelosis bovina mediante Elisa competitivo en el municipio La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela. Revista Científica, FCV-LUZ. XIV(2): 168-176.

Gaceta Oficial. 2017. República Bolivariana de Venezuela. Ministerio del Poder Popular para la Agricultura Productiva y Tierras. Normas sobre la vigilancia, prevención, control y erradicación de la brucelosis bovina. Año CXLIV. mes XII (41.249). Resolución DM/N 036.

Javitt, M., Páez, Z., Duran, J. y Meléndez, I. 2009. Seroprevalencia de la brucelosis en pequeños rumiantes. Municipio Torres. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. 10 (8). 1-13. [Revista en línea] En: <http://www.veterinaria.org/revistas/redve> [mayo de 2017].

Lord de V., Nieto S., Sandoval, E., Meléndez, G. y Ruiz, R. 1987. Brucelosis en caprinos: estudios serológicos y bacteriológicos en Venezuela. [Artículo en línea]. En: <http://apriscodonantonio.blogspot.com/2012/04/brucelosis-en-caprinos-estudios.html>. [febrero de 2017].

McGiven, J., Tucker, J. and Prett, J. 2003. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT and ELISA. Journal Immunological Methods 278:171-178.

Nielsen, K., Gall, D., Smith, P., Bermudez, R., Moreno, F., Renteria, T., Ruiz, A., Aparicio,

L., Vazquez, S., Dajer, A., Luna, E., Samartino, L. and Halbert, G. 2005. Evaluation of serological tests for detection of caprine antibody to *Brucella melitensis*. Small Rumin Res. 56: 253-258.

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal 2008. Brucelosis bovina. En Manual de la OIE sobre animales terrestres. 16^a edición. Edit. Office International des Epizooties, Paris, France. pp. 684-713.

Pacheco, N. 2016. Etiopatogenia de la brucelosis en las diferentes especies. XIX Curso de brucelosis bovina, Portuguesa. Venezuela. DC.

Sidor, I., Dunn, J., Tsongalis, G., Carlson, J. and Frasca, S. 2013. A multiplex real-time polymerase chain reaction assay with two internal controls for the detection of *Brucella* 74 species in tissues, blood, and feces from marine mammals. J. Vet. Diagn. Invest. 25: 72-81.

Valeris, R. y Boscan, L. 2012. Seroprevalencia de leptospirosis y brucelosis en explotaciones caprinas del municipio Mauroa, estado Falcón, Venezuela. Revista Científica FCV-LUZ. 22(3): 231-237.