

COMPARACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA BRUCELOSIS BOVINA EN ANIMALES VACUNADOS CON S19 Y RB51.

Ibarra M*, Campos M

Carrera de Agropecuaria, Universidad Politécnica Estatal del Carchi

RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio de campo donde se usaron dos grupos de 6 terneras, de entre 6 y 8 meses de edad, cada uno de raza Holstein mestiza. En donde en el día cero se realizó un muestreo de sangre de los animales y el diagnóstico mediante la prueba de (cELISA) competitiva, posterior a obtener resultados negativos de todos los animales se procedió a la vacunación vía subcutánea de la vacuna S19 y RB51 en cada grupo respectivamente. A partir del tercer mes de la vacunación se procedió a realizar un muestreo de todos los animales y éste se repitió cada dos meses hasta el séptimo mes, y se realizó el diagnóstico serológico mediante las pruebas: Rosa de Bengala (RB), Seroaglutinación en Tubo (SAT), Seroaglutinación en Tubo con 2 Mercaptoetanol (SAT-2Me), y Fluorescencia Polarizada (FPA), que se realizaron en el laboratorio de diagnóstico veterinario de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi. En los resultados las pruebas RB, SAT y SAT-2Me mostraron resultados positivos en animales vacunados con S19 en todos los meses del diagnóstico. La prueba FPA mostró resultados positivos al mes 3 y 5 mientras que al mes siete mostró resultados negativos en animales vacunados con S19. Las pruebas RB, SAT, SAT-2Me y FPA mostraron resultados negativos en animales vacunados con RB51 en todos los meses del diagnóstico.

Palabras clave: brucelosis, S19, RB51, fluorescencia polarizada, diagnóstico

SUMMARY

A field study was carried out with two groups of 6 calves, between 6 to 8 months of age, of "Holstein mestizo" breed. On the zero day, a blood sample was taken from the animals and the diagnosis was made by the competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA),

after negative results were obtained from all the animals, subcutaneous vaccination of the S19 and RB51 vaccines was carried out on each group respectively. From the third month of the vaccination, all the animals are sampled and this sampled was repeated every two months until the seventh month, then serological diagnosis tests as: Rose Bengal (RB), Seroagglutination in Tube (SAT), Seroagglutination in Tube with 2 Mercaptoethanol (SAT-2Me), and Polarized Fluorescence (FPA) were performed, in the laboratory of veterinary diagnostic of the Carchi State Polytechnic University. In the results the RB, SAT and SAT-2Me tests gave positive results in animals vaccinated with S19 in all months of diagnosis. The FPA test revealed positive results at month 3 and 5 while at the seven month negative results appear in all animals vaccinated with S19. The RB, SAT, SAT-2Me and FPA tests showed negative results in animals vaccinated with RB51 in all months of diagnosis.

Key words: brucellosis, S19, RB51, fluorescence polarization, diagnosis.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis bovina es una enfermedad infecto contagiosa que afecta tanto a machos como hembras con afecciones reproductivas, donde el aborto y la baja producción de leche son los síntomas característicos en hembras, mientras que la orquitis y epididimitis son los síntomas característicos en machos.

En la actualidad dentro de los planes de control y erradicación de la brucelosis bovina una de las estrategias más utilizadas es la vacunación masiva de los animales en riesgo, para lo cual se dispone de dos cepas vacunales que son la S19 y la RB51. La S19 es la cepa más utilizada por su capacidad protectora, pero presenta una serie de inconvenientes como es la inferencia en las pruebas diagnósticas, la vacunación de animales adultos y la revacunación (Nicoletti, 1990; Schurig *et al.* 2002).

El principal medio de diagnóstico de la brucelosis bovina es el diagnóstico serológico, ya que el diagnóstico clínico es complicado debido a que el aborto que ocasiona esta enfermedad

solo se presenta en 16% de las vacas infectadas, ocasionando diagnósticos clínicos cruzados con otras enfermedades reproductivas.

La inferencia de anticuerpos vacunales ocasionados por la vacuna S19 ha llevado al desarrollo de un sin número de pruebas diagnósticas para brucelosis bovina, pasando de pruebas de aglutinación, enzimáticas, y de inmunidad celular, pero ninguna de ellas es considerada como “gold standard” ya que existen reacciones falso positivas y falso negativas, por lo que todavía se sigue investigando las características de las pruebas que actualmente se utilizan en los planes de control y erradicación a nivel mundial.

Bajo esta realidad la presente investigación pretende comparar las pruebas diagnósticas RB, SAT, SAT-2Me, y FPA para brucelosis bovina en animales vacunados con S19 y RB51.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en la Finca San Vicente perteneciente a la parroquia El Carmelo cantón Tulcán provincia del Carchi. La población en estudio fueron 12 terneras de entre 6 y 8 meses de edad de raza Holstein mestiza. Las muestras de sangre para el diagnóstico fueron tomadas de la vena coccígea en tubos estériles sin anticoagulante. Previo la vacunación de los animales, considerado como día 0, se realizó un diagnóstico mediante la prueba cELISA (“Competitive Enzyme Linked Inmunosorbent Assay”) prueba considerada como confirmatoria en Ecuador para el diagnóstico de brucelosis bovina por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD). Para la vacunación se emplearon dos cepas de vacunas la Cepa 19 (S19) y RB51, mismas que se aplicaron vía subcutánea en 6 animales la S19 y en los restantes (6) la RB51.

A partir del tercer mes de la vacunación se procedió a realizar un muestreo de todos los animales y se repitió cada dos meses hasta el séptimo mes, y se procedió a realizar el diagnóstico serológico mediante las pruebas: Rosa de Bengala (RB), Seroaglutinación en Tubo (SAT), Seroaglutinación en Tubo con 2 Mercaptoetanol (SAT-2Me), y Fluorescencia

Polarizada (FPA), mismos que se realizaron en el laboratorio de diagnóstico veterinario de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi.

cELISA. La prueba inmuno enzimática competitiva (cELISA) fue realizada por un laboratorio externo, que utiliza el Kit comercial “SVANOVIR® *Brucella-Ab C-ELISA*” de la casa *SVANOVA*, y que al ser un análisis confirmatorio realiza el diagnóstico en duplicado. Para la interpretación de resultados se considera el porcentaje de inhibición (PI), obtenido mediante la substracción de 100 para la división del promedio de densidades ópticas (DO) de las muestras con la DO del conjugado, y su interpretación se realizó con un punto de corte ≥ 30 % de inhibición es diagnóstico positivo y menor a ello negativo.

RB. La prueba Rosa de Bengala se realizó de acuerdo al protocolo establecido por la OIE (21). El antígeno que se emplea es una suspensión bacteriana de *Brucella* coloreada con rosa de bengala. El antígeno y los sueros se ponen a temperatura ambiente por un lapso de 60 minutos, previa su utilización. A continuación, se colocan 30 μ l de cada suero a investigar en una placa de vidrio, a esto se agrega 30 μ l del antígeno, y se mezcla. Se homogeniza la placa por 4 minutos a temperatura ambiente, para luego proceder a la lectura. La interpretación de resultados fue: en la placa que presenta aglutinación el resultado es positivo y sin aglutinación, negativo.

SAT y SAT-2Me. La prueba de aglutinación lenta en tubo (SAT) y aglutinación lenta en tubo en presencia de 2-Mercaptoetanol (SAT-2Me), utilizan como antígeno una suspensión de *Brucella abortus* 1119-3 al 4,5%. La prueba SAT utiliza como diluyente una solución salina fenolada al 0,5%, mientras que el SAT-2Me utiliza como diluyente la solución de 2-mercaptoetanol (0,1 M). El protocolo que se siguió es el propuesto por la OIE (2009), que dice: colocar las muestras y el antígeno a temperatura ambiente por 60 minutos. Luego disponer 80 μ l de suero en el fondo de cada tubo tanto para SAT como para SAT-2Me. Agregar con una pipeta 1 ml de solución de 2-mercaptoetanol (0,1 M) en los tubos de SAT-2Me, y 1 ml de solución salina fenolada al 0,5% en los tubos de SAT. Dejar reposar las mezclas durante 45 a 60 minutos a temperatura ambiente $22 \pm 4^\circ\text{C}$ y posteriormente agregar a cada tubo 1 ml de antígeno diluido al 2% (0,09%) en solución salina fisiológica. Poner en

incubación en cámara húmeda y ambiente oscuro por 24 horas. Para la interpretación de resultados, se consideran: el grado de aglutinación en cada prueba, que pueden clasificarse como: **Aglutinación completa**, es aquella en la que el líquido de la mezcla suero-antígeno aparece transparente, translúcido y la agitación suave no rompe los grumos. **Aglutinación incompleta** es la que muestra la mezcla suero-antígeno parcialmente turbia y una suave agitación no rompe los grumos. **Aglutinación negativa** es aquella en que la mezcla suero-antígeno aparece turbia y una suave agitación no revela grumos. La lectura e interpretación de resultados de la prueba aglutinación lenta en tubo en presencia de 2 mercaptoetanol (“SAT-2Me”), debe realizarse bajo los mismos estándares que la prueba aglutinación lenta en tubo (“SAT”).

FPA. La prueba de fluorescencia polarizada se realizó según las especificaciones del Kit comercial “Brucella Antibody Test Kit FPA” de la casa *Ellie* (Lote B1001). El kit FPA utiliza un extracto de polisacárido-O (OPS) de la bacteria *Brucella abortus* conjugado con fluoresceína. Los sueros y controles (20µl) se colocan dentro de tubos de boro-silicato más un diluyente (1ml) y se incuban por tres minutos a temperatura ambiente, para realizar una lectura blanca de todas las muestras y controles. Luego se adiciona 10µl del antígeno con fluoresceína en todos los tubos, se incuba por tres minutos a temperatura ambiente, para luego repetir la lectura y obtener los valores de mili-polarización (mP) de todas las muestras y controles. La interpretación de resultados se realizó considerando un punto de corte de ≥ 89.9 mP (Ibarra *et al.* 2017).

El análisis de resultados se realizó mediante el uso de estadística descriptiva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizado el diagnóstico se puede observar que para el caso de las pruebas RB, SAT y SAT-2Me en los animales vacunados con S19 se presentaron resultados positivos en los meses 3 y 5. Para el séptimo mes la prueba RB y SAT-2Me mostró resultados positivos en 5 animales y 1 animal con resultado negativo. La prueba SAT mostró resultado positivo en todos los animales al mes 7.

		Mes 3				Mes 5				Mes 7			
		RB	SAT	SAT-2Me	FPA	RB	SAT	SAT-2Me	FPA	RB	SAT	SAT-2Me	FPA
S19	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Los resultados similares obtenidos para las pruebas RB, SAT y SAT-2Me es atribuido a que las pruebas en estudio tienen el mismo principio de aglutinación sobre lámina, además que como antígeno utilizan una suspensión de *Brucella abortus* tal como lo menciona Ron (2003). Además, Aparicio *et al.* (2003) indican que normalmente las pruebas tamiz o de rutina como RB, SAT, Antígeno Bufferado en Placa (BPA), Prueba de Anillo en Leche (PAL) entre otras son pruebas diagnósticas con características de alta sensibilidad; sin embargo, al momento de diferenciar los animales vacunados de los infectados, su especificidad es baja.

Los resultados positivos obtenidos en las pruebas RB, SAT y SAT-2Me deben ser considerados como falsos positivos, ya que los animales fueron en su inicio vacunados con S19. Esto debido a que las pruebas mencionadas presentan bajo porcentaje de especificidad, debido a reacciones cruzadas con otras bacterias que comparten la cadena O de Brucella, resultados similares fueron descritos por Moriyón & López-Goñi (2000) siendo las bacterias causantes la bacteria *Escherichia hermanni* y *E. coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Francisella tularensis* y *Vibrio cholerae* O:1. *Yersinia enterocolitica* O:9 y otras que posee una cadena O muy próxima a la de *Brucella abortus*. Además, Ron (2003) indica que la vacunación de bovinos con S19 constituye otra reacción cruzada en el diagnóstico de brucelosis, ya que la vacuna tiene la desventaja de producir anticuerpos aglutinales que interfieren en las pruebas de aglutinación.

La prueba FPA en animales vacunados con S19 presentó resultados positivos hasta el quinto mes de muestreo, a partir del séptimo mes se observan resultados negativos. Los resultados positivos que arroja el diagnóstico con FPA se atribuyen a reacciones cruzadas por la vacunación con S19, ya que luego de la vacunación con cepas con epítipo similar al agente

causal, ocasionan la producción de niveles muy altos de anticuerpos en especial de la inmunoglobulina M (IgM) y luego de la inmunoglobulina G (IgG), como fue descrito de igual forma por Nielsen & Col, (1996) citado por Pino, (2000).

Los resultados negativos a partir del séptimo mes se deben a que la prueba FPA es una prueba de alta especificidad en muestras de animales vacunados con S19 como lo describe Martinez, Torioni, Jacobo, & Cipolini, (2008); Cisterna, Conde, Hollender, Martino & Samartino, (2015), donde la especificidad del FPA y por ende su capacidad de discriminar animales vacunados de naturalmente infectados es de 98,60 % y 99,80 % respectivamente.

EL diagnóstico realizado en animales vacunados con la cepa RB51 se presentan resultados negativos en las pruebas RB, SAT, SAT-2Me, y FPA, en todos los meses del muestreo.

		Mes 3				Mes 5				Mes 7			
		RB	SAT	SAT-2Me	FPA	RB	SAT	SAT-2Me	FPA	RB	SAT	SAT-2Me	FPA
RB51	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Los resultados negativos de las pruebas diagnósticas RB, SAT, SAT-2Me y FPA se atribuye a que las pruebas en mención utilizan como antígeno suspensiones de *Brucella abortus*, que es una bacteria de morfología lisa, debido a la presencia de un lipopolisacarido (LPS) de cadena O, (Vargas, 2002) mientras que la vacuna aplicada (RB51) a éste grupo de animales es una cepa mutante rugosa carente de la cadena lateral "O" del lipopolisacarido, lo que evita la producción de anticuerpos serológicos aglutinantes, como lo menciona Schurig *et al.* (1991); Cheville *et al.* (1996); Olsen *et al.* (1996); Samartino *et al.* (2000).

CONCLUSIONES

Para la vacunación de animales contra brucelosis existen dos tipos de vacunas, que son la S19 y la RB51, vacunas vivas, que muestran grados de inmunidad similar, pero que en ocasiones desencadenan la producción de anticuerpos aglutinantes que interfieren en las pruebas diagnósticas serológicas. Para el caso de las pruebas diagnósticas RB, SAT y SAT-2Me realizadas de animales vacunados con S19 muestran resultados positivos hasta el séptimo mes de muestreo, mientras que la prueba FPA utilizada en el mismo grupo de animales dio resultados negativos al séptimo mes del diagnóstico, denotando la capacidad de ésta de diferenciar animales vacunados.

Para el caso de animales vacunados con RB51, las pruebas RB, SAT, SAT-2Me y FPA mostraron resultados negativos en todos los meses del diagnóstico, comprobando que esta cepa vacunal no interfiere en las pruebas diagnósticas tamiz usadas para el diagnóstico de brucelosis bovina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aparicio, A., Díaz, E., Hernández, L., Pérez, R., Alfonseca, E., & Suárez, F. (2003). Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con brucelosis y revacunado con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19. México.
- Cheville, N.; Olsen, S.; Jensen, A.; Stevens, M.; Palmer, M.; Florance, A. (1996) Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. *American Journal of Veterinary Research*. 57 :1153-1156.
- Cisterna, C., Conde, S., Hollender, D., Martino, P., & Samartino, L. (2015). Diagnóstico serológico de brucelosis en caprinos: Comparación de técnicas. *SCIELO*, 8.
- Ibarra M., Benavides H., Salgado R., Gutiérrez M., García J., Peña J., Herrera D., Mina J., Campos M., Puga B. (2017), Determining a Diagnostic Cut-Off on Fluorescence Polarization Assay (FPA) for Bovine Brucellosis in Carchi, Ecuador. *Open Journal of Animal Science*, 7, 425-432.

Martinez, D., Torioni, S., Jacobo, R., & Cipolini, M. (2008). Evaluación de las pruebas ELISA competitivo y Polarización fluorescente (FPA) para el diagnóstico de brucelosis en búfalos. Obtenido de Secretaria General de Ciencia y Técnica: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/investigacion/com2008/V-025.pdf>

Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD). (2009). Programa Nacional de Control de la brucelosis Bovina, MAG-AGROCALIDAD, Ecuador.

Moriyón, I., & López-Goñi, I. (2000). Estructura Genética y Fisiología del Género *Brucella*. Navarra, Pamplona, España: Universidad de Pamplona.

Nicoletti, P. (1990) Vaccination, pag. 283-299. En: Animal Brucellosis, Ed. Nielsen, K & Duncan, J.R. - CRC Press, Boca Raton, USA, 1st edition. 453 pag

Olsen, S.C., Evans, D., Hennager, S.G., Cheville, N.F., Stevens, M.G. (1996) Serologic responses of *Brucella abortus* strain 19 calfhood-vaccinated cattle following adult vaccination with strain RB51. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 8 : 451–454.

Organización Mundial de Sanidad Animal. OIE. Chapter 2.1.4. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) [Internet]. París – Francia. OIE [update 2016 may; cited 2016 sep]. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCCELL_OSIS.pdf

Pino, C. A. (2000). Diagnóstico de brucelosis bovina mediante técnicas de unión primaria en leche y suero y la comparación con las técnicas tradicionales. Obtenido de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2000/fvp657d/doc/fvp657d.pdf>

Ron, J. (2003). Validación de Técnicas Diagnósticas para la detección de Brucelosis y Estudio epidemiológico en una Región Andina del Ecuador. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/269929264>.

Samartino, LE.; Fort, M.; Gregoret, R.; Schurig, GG. (2000). Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calthood vaccination with strain 19 in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine.*, 45: 193-199.

Schurig, GG.; Roop, RM.; Bagchi, T.; Boyle, S.; Buhrman, D.; Sriranganathan, N. (1991) Biological properties of RB51, a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology.*, 28 :171-188.

Schurig, G., Sriranganathan, N., Corbel, M. (2002) Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary Microbiology.*, 90 : 479-496.

Vargas, O. (2002). Brucellosis in Venezuela. *Veterinary Microbiology.* pp. 39-44.